

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ НАН БЕЛАРУСИ»

УДК 547.92+573.6+577.175

САВЧУК  
АЛИНА ЛЕОНИДОВНА

**ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БРАССИНОСТЕРОИДОВ:  
РАЗРАБОТКА МЕТОДОЛОГИИ, СИНТЕЗ АНАЛИТИЧЕСКИХ  
КОМПОНЕНТОВ, ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия

Минск, 2016

Научная работа выполнена в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси».

**Научный руководитель:** **Литвиновская Раиса Павловна,**  
доктор химических наук, доцент, главный научный сотрудник лаборатории химии стероидов Института биоорганической химии НАН Беларуси

**Официальные оппоненты:** **Михайлопуло Игорь Александрович,**  
доктор химических наук, член-корреспондент НАН Беларуси, профессор, главный научный сотрудник лаборатории химии нуклеотидов и полинуклеотидов Института биоорганической химии НАН Беларуси

**Ламан Николай Афанасьевич,**  
доктор биологических наук, академик, профессор, заведующий лабораторией роста и развития растений Института экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси

**Оппонирующая организация:** Государственное научное учреждение «Институт физико-органической химии НАН Беларуси»

Защита состоится «28» февраля 2017 г. в 10.00 на заседании Совета по защите диссертаций Д 01.21.01 в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» по адресу: 2200141, г. Минск, ул. Академика Купревича, 5/2 в зале заседаний Ученого Совета, e-mail: babitskaya@iboch.bas-net.by, тел. (017) 267-85-53.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Я.Коласа НАН Беларуси.

Автореферат разослан «27» января 2017 г.

Ученый секретарь  
совета по защите диссертаций Д 01.21.01  
кандидат химических наук



С.В. Бабицкая

## ВВЕДЕНИЕ

Брассиностероиды (БС) – гормоны растений, играющие важную роль в регуляции роста, развития и ряда ключевых физиологических функций. БС проявляют свое биологическое действие в очень низких концентрациях. Благодаря своим свойствам стероидные фитогормоны являются основой принципиально новых экологически безопасных препаратов для растениеводства (Эпин, Эпин плюс) и животноводства (Бравидефен, Апибрассин). В последние годы получили развитие исследования физиологических эффектов БС у животных и человека, ориентированные на создание новых лечебно-профилактических средств. Их результатом, например, явилась разработка на основе 24-эпибрассинолида (ЭБР) биологически активной добавки к пище «Фитонол», рекомендованной в качестве восстановительного, общеукрепляющего и адаптогенного средства.

Количественное определение стероидных фитогормонов важно как для изучения их роли, особенностей естественного распределения и закономерностей метаболизма в растениях, так и для целей эффективного применения синтетических фитогормонов в качестве активных ингредиентов новых препаратов. Однако количественное определение БС представляет весьма сложную и дорогостоящую задачу, поскольку содержание их в растениях составляет менее  $10^{-5}\%$ .

В связи с расширяющимся применением БС и постоянно возрастающим интересом к данному классу растительных гормонов, актуальной является задача разработки новых высокоэффективных и доступных методов количественного анализа БС как в природных объектах, так и в препаратах на их основе. Наиболее перспективным подходом в данном случае является иммунохимический анализ, который позволяет определять низкие концентрации стероидных гормонов при несложном приборном оснащении.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Связь работы с научными программами (проектами), темами.** Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2011-2015 гг. (раздел 2, подраздел 2.2 «Биологически активные синтетические и природные соединения, биополимеры, биорегуляторы, аминокислоты и их производные, наноструктурированные белки, нуклеиновые кислоты и их компоненты», подраздел 2.7 «Новые лекарственные средства и биокорректоры различных заболеваний, фармацевтические субстанции, современные диагностические тест-системы, технологии их производства, оценки качества и безопасности»). Диссертационная работа является частью плановых исследований, выполненных в рамках ГПОФИ «Создание биорациональных химических средств защиты растений новых поколений» (Биорациональные пестициды-2), задание 1.05 «Раз-

работать научные основы рационального и эффективного применения препаратов на основе brassinостероидов в посевах сельскохозяйственных и лесных культур, в т.ч. в условиях природных и антропогенных стрессов» (№ ГР 20093211); ГП «Импортозамещающая фармпродукция, п/п «Фармсубстанции и готовые лекарственные средства», задание Ф 14 «Разработать и освоить технологию производства фармсубстанции оригинального отечественного препарата антихолестеринемического действия – декрехола на основе эпибрасиностероидов» (№ ГР 20102263); ГПНИ «Фундаментальная и прикладная медицина и фармация», п/п «Химфармсинтез», задание 2.10 «Синтез природных и модифицированных стероидов, разработка научных основ их применения в лечебной и профилактической медицине» (№ ГР 20114746); гранта БР ФФИ № Х12Р-169 «Брасиностероиды как регуляторы формирования защитных систем и повышения продуктивности растений при солевом стрессе» (№ ГР 20123483); гранта БР ФФИ № Х13К-094 «Роль фосфатидной кислоты в реализации биологического действия природных brassinостероидов и их синтетических аналогов в процессе адаптации метаболизма растений к действию стрессов» (№ ГР 20131432); гранта БР ФФИ № Х14Р-139 «Взаимодействие brassinостероидов и цитокининов при адаптации растений к условиям солевого стресса: возможные механизмы и биотехнологические применения» (№ ГР 20143316).

**Цель и задачи исследования.** Цель диссертационной работы – разработка методологии иммунохимического определения БС в растительных объектах, физиологических жидкостях и brassinостероидсодержащих препаратах.

Поставленная цель достигалась решением следующих задач:

- Синтез аналитических компонентов и разработка тест-системы для иммуноферментного определения 6-оксобрасиностероидов.
- Синтез новых конъюгатов БС с флуоресцентными метками и исследование их в качестве меченых антигенов.
- Разработка метода количественного определения БС на основе конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА-I).
- Комплексное применение группоспецифичных иммуноферментных тест-систем для определения индивидуальных БС.
- Разработка нового высокочувствительного экспресс-метода иммуноферментного определения БС (ИФА-II) в растительных объектах.
- Применение разработанных методов для количественного определения БС в растительных объектах, физиологических жидкостях, brassinостероидсодержащих препаратах.

**Научная новизна.** Впервые осуществлен синтез конъюгатов 28-норкастастерона с бычьим сывороточным альбумином и пероксидазой хрена, на их основе предложен метод количественного определения 6-оксобрасиностерои-

дов и разработана первая иммуноаналитическая тест-система для его выполнения, позволяющая расширить группы анализируемых БС, а в комбинации с другими системами ИФА – определять содержание индивидуальных БС.

Осуществлен первый синтез 6-дезоксо-28-норкастастерона и усовершенствованный синтез 6-дезоксопроизводных других БС через соответствующие ксантогенаты для тестирования специфичности антител к индивидуальным стероидным фитогормонам и возможного использования в качестве компонентов новых тест-систем для анализа БС.

Впервые синтезированы конъюгаты 24-эпикастастерона с нитробензофураном, флуоресцеином, порфирином и комплексоном  $\text{Eu}^{3+}$ , обладающие эффективными флуоресцентными свойствами и высокой связывающей способностью с антителами, специфичными к 24-эпибрассиностероидам. Разработана тест-система для лантанидного иммунофлуориметрического анализа (ЛИФМА) 24-эпибрассиностероидов.

Разработан двухстадийный метод иммуноферментного определения БС, основанный на принципе разделения фаз взаимодействия определяемого и меченого антигенов с антителами, что позволяет проводить измерения БС в растительных объектах без многостадийной пробоподготовки с высокой чувствительностью.

Впервые с использованием метода ИФА проведено определение содержания эндогенных БС ряда брассинолида, 24-эпибрассинолида и 28-гомобрассинолида в растениях и продуктах питания растительного происхождения. Разработаны методы количественного анализа БС в физиологических жидкостях и брассиностероидсодержащих препаратах.

С применением метода ИФА впервые изучена динамика содержания эндогенных БС в процессе адаптации растений к абиотическим и биотическим факторам стресса, что расширяет представления о стресс-протекторных свойствах гормонов данного класса.

Впервые на крысах линии Вистар с применением ИФА проведены фармакокинетические исследования 24-эпибрассинолида и изучено его распределение в органах.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Первый синтез иммуногена и меченого антигена на основе 26-гидрокси-28-норкастастерона и разработка метода определения 6-оксобрассиностероидов и иммуноферментной тест-системы для его реализации.
2. Первый синтез 6-дезоксо-28-норкастастерона и синтез других 6-дезоксопроизводных через соответствующие ксантогенаты с применением в качестве ключевой стадии метода радикально-инициированного деоксигенирования ксантогенатов.

3. Синтез новых флуоресцентно-меченых конъюгатов 24-эпикастастерона на основе производных 6-*O*-карбоксиметилоксиима. Разработка тест-системы ЛИФМА для определения 24-эпибрассиностероидов.
4. Высокочувствительный экспресс-метод ИФА, в основе которого лежит принцип разделения фаз взаимодействия определяемого и меченого антигенов с антителами.
5. Определение содержания индивидуальных БС в растениях с использованием сочетания нескольких группоспецифичных иммуноаналитических тест-систем.
6. Обнаружение изменения уровня эндогенных БС в растениях в ответ на действие экстремальных факторов.
7. Первое определение фармакокинетических параметров 24-эпибрассинолида с применением метода ИФА.

**Личный вклад соискателя ученой степени** заключается в проведении экспериментальной части работы, разработке методик, установлении структуры полученных соединений, анализе литературных данных. Постановка задач, подготовка материалов и интерпретация результатов для научных публикаций осуществлялась совместно с д.х.н., доц. Литвиновской Р.П. и акад. НАН Беларуси, проф. Хрипачом В.А. Анализ ВЭЖХ-МС БС был проведен совместно с к.х.н. Барановским А.В. Иммунизация животных, отбор образцов крови и получение антисывороток выполнена Миранцовой Т.В. (СООО «Хемма-Тест», Минск). Синтез конъюгатов 24-эпикастастерона с комплексоном  $\text{Eu}^{3+}$  и разработка ЛИФМА БС проводились совместно с н.с. ЛХБГ Куприенко О.С. Образцы растений предоставлены проф. Кравцом В.С. (ИБОНХ НАН Украины), к.б.н. Ефимовой М.В. (Том ГУ, РФ), к.б.н. Манжелесовой Н.Е. (ИЭБ НАН Беларуси). Манипуляции с животными, связанные с изучением фармакокинетики, проводились в Лаборатории токсикологии под руководством к.м.н. Насека В.М.

**Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов.**

Материалы диссертационной работы были представлены в виде докладов на VI Междунар. науч. конф. «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, 2009), Всеросс. симп. «Растения и стресс» (Москва, 2010), III Конгр. физиков Беларуси «Spin & protonic Beams at Interface» (Минск, 2011), VII Междунар. конф. Radostim «Фитогормоны, гуминовые вещества и другие биорациональные пестициды в сельском хозяйстве» (Минск, 2011), V Междунар. конф. «Химия, структура и функция биомолекул» (Минск, 2014), 3<sup>rd</sup> Int. Symp. «Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design» (Lviv, 2012), Int. Conf. «Plant Diseases and Resistance Mechanisms» (Vienna, 2013), Междунар. науч.-практ. конф. «Инновационные агротехнологии в условиях смены климата» (Мелитополь, 2013), VIII Всеросс. конф. «Химия и технология растительных веществ» (Калининград, 2013), VI Междунар. науч.-практ. конф.

«Агротехнический метод защиты растений от вредных организмов» (Краснодар, 2013), 22<sup>nd</sup> Conf. on Isoprenoids (Prague, 2014), Междунар. конф. «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий» (Калининград, 2014), XI Укр. биохим. конгр. (Киев, 2014), 23<sup>rd</sup> Conf. on Isoprenoids (Минск, 2016), Междунар. науч.-практ. конф. «Белорусские лекарства» (Минск, 2016). Лауреат конкурса на лучшую научную работу молодых ученых Института биоорганической химии НАН Беларуси (2015 г). Лауреат стипендии Президента для молодых ученых (2016 г). Премия Европейского фитохимического общества за лучший устный доклад на конференции (23<sup>rd</sup> Conf. on Isoprenoids, 2016 г).

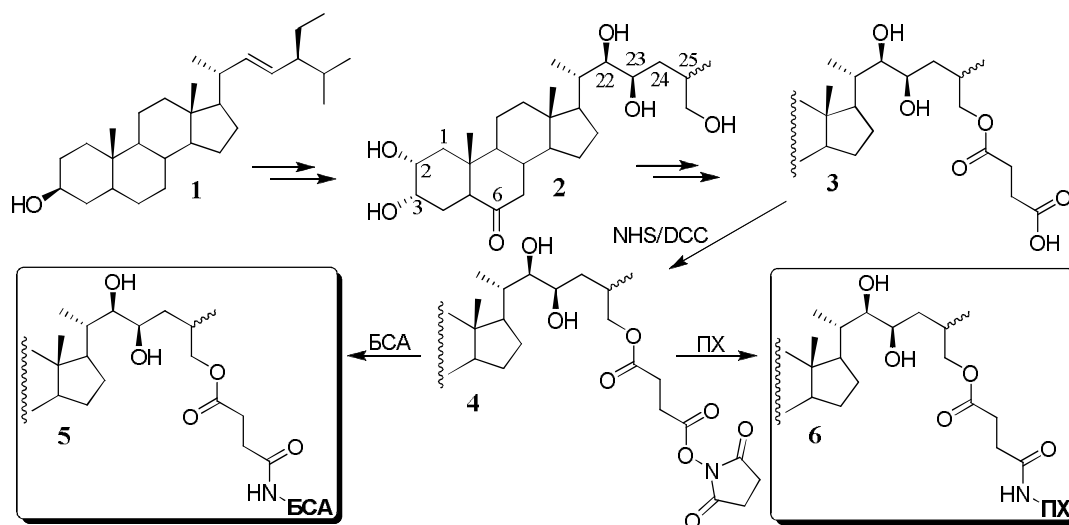
**Опубликование результатов диссертации.** По материалам диссертации опубликовано 38 печатных работ, из них 13 статей (в том числе 10 в международных научных изданиях) общим объемом 8,1 авторских листа, тезисы 20 докладов. Получены 3 патента РБ, зарегистрированы 2 ТУ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из оглавления, перечня сокращений и условных обозначений, введения, общей характеристики работы, трех глав, заключения, библиографического списка и приложения. В главе 1 приводится обзор литературных данных по методам выделения БС из растительных объектов и их анализа за последние 15 лет. Глава 2 посвящена обсуждению результатов собственных исследований. Глава 3 содержит экспериментальные данные. Работа изложена на 153 страницах, содержит 16 рисунков, 18 схем и 21 таблицу и приложения А-Д. Список цитируемой литературы включает 212 ссылок.

#### ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

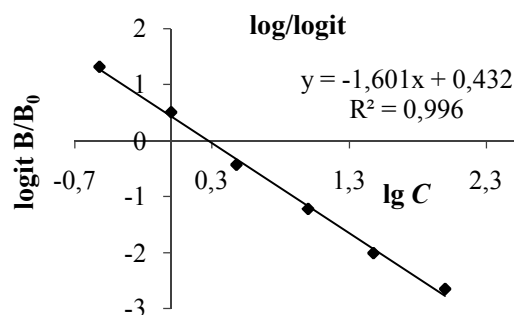
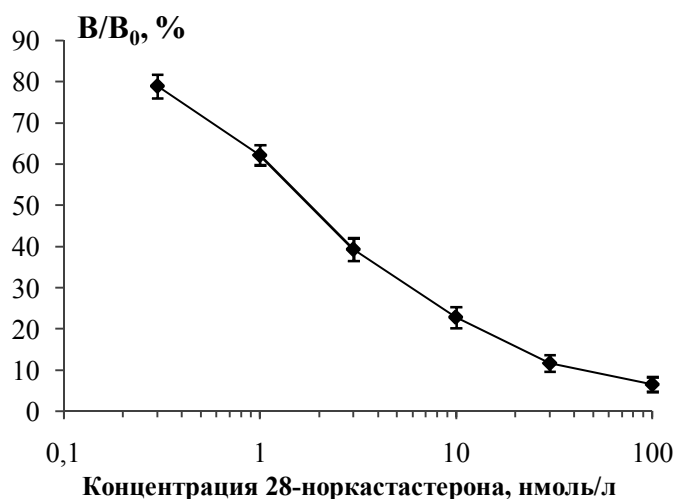
**Иммуноферментная тест-система для определения 6-оксобрассиностероидов.** Ранее в Лаборатории химии стероидов совместно с Лабораторией химии белковых гормонов Института биоорганической химии НАН Беларуси разработаны иммуноферментные тест-системы по определению БС в водных растворах для соединений ряда 24-эпибрассинолида (24-эпиБС) – ИФА-ЭБС, брассинолида (24*S*-метилБС) – ИФА-БРС, 28-гомобрассинолида (28-гомоБС) – ИФА-ГБС и 7-окса-6-оксобрассиностероидов (В-лактон-БС) – ИФА-Лактоны. Данные тест-системы являются группоспецифичными и определяют сумму БС соответствующего ряда, что не позволяет делать различие между содержанием В-лактон-БС и их биосинтетических предшественников, в частности 6-оксобрассиностероидов (6-оксоБС). Метод определения последних предложен в настоящей работе. Использован подход к получению гаптена с линкером при концевом атоме углерода боковой цепи. Исходным веществом для синтеза конъюгатов с белками послужил 26-гемисукцинат (22*R*,23*R*)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22,23,26-пентагидрокси-5 $\alpha$ -холестан-6-она **3**, ресинтез которого был осуществлен из стигмастерина **1** в 18 стадий. Конъюгат **5** 28-норкастастерона с бычьим сыворо-

точным альбумином (БСА) получали взаимодействием *N*-оксисукцинимидного эфира гемисукцината **4** с БСА в смеси диоксан:0,1 М NaHCO<sub>3</sub> (1:1) (pH 8,5) с последующей очисткой путем диализа.



Синтез конъюгата **6** 28-норкастастерона с пероксидазой хрена (ПХ) для использования в ИФА в качестве меченого антигена осуществляли взаимодействием *N*-оксисукцинимидного эфира **4** с ПХ в смеси диоксан:0,1 М NaHCO<sub>3</sub> (1:2) с последующей очисткой на сефадексе G-25.

Антисыворотки, содержащие поликлональные антитела к 28-норкастастерону, получены путем иммунизации кроликов конъюгатом 28-норкастастерон-БСА **5**. В результате тестирования отобраны антисыворотки с высоким титром, использование которых в сочетании с меченым антигеном **6** послужило основой для разработки метода определения 6-оксоБС и иммуноферментной тест-системы (ИФА-Кетоны) для его реализации. В основе метода лежит одновременное конкурентное взаимодействие немеченого антигена и меченого антигена с антителами, а количество детектируемых иммунных комплексов обратно пропорционально концентрации аналита. Аналитический рабочий диапазон составил 0,3-100 нмоль/л, чувствительность – 0,3 нмоль/л (Рисунок 1).

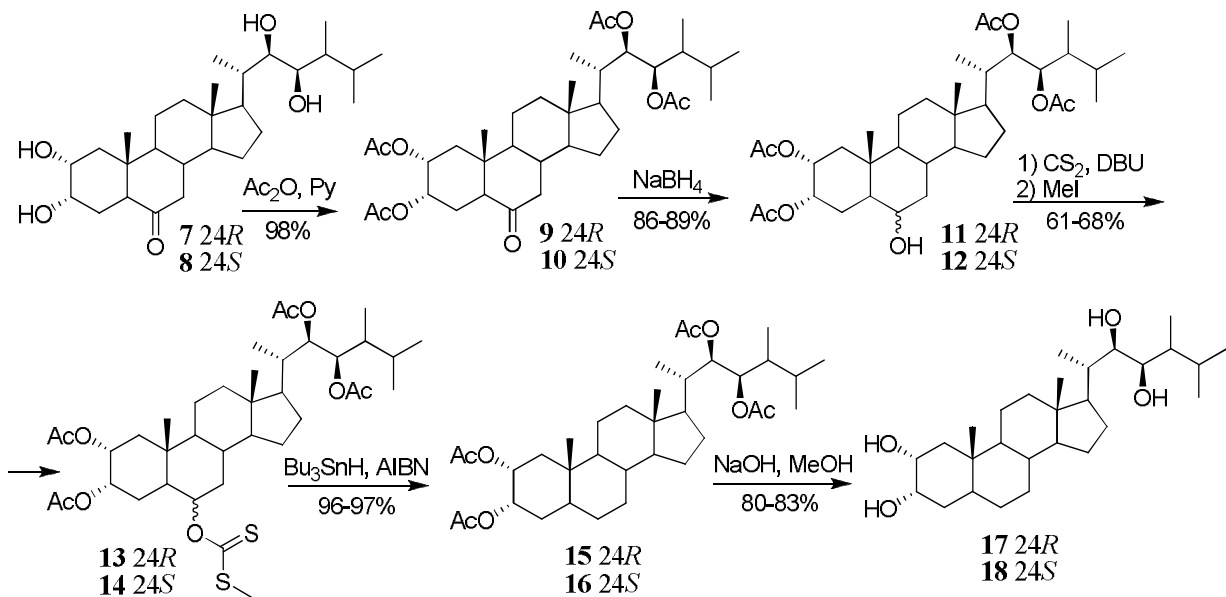


**B** и **B<sub>0</sub>** – сигналы в присутствии и в отсутствии определяемого антигена в системе

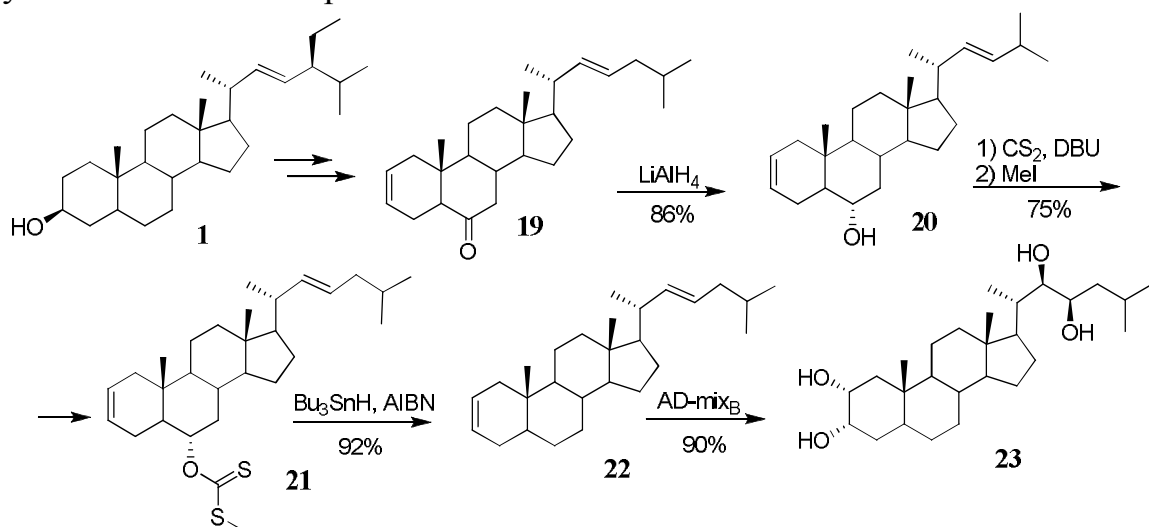
Рисунок 1 – Калибровочная кривая для ИФА-1 6-оксоБС (ИФА-Кетоны)



Для изучения специфичности полученной антисыворотки посредством определения перекрестной реакции содержащихся в ней антител к 28-норкаастерону синтезированы некоторые 6-дезоксобрассиностероиды (6-дезоксoBC), в частности 6-дезоксо-24-эпикаастерон, 6-дезоксокаастерон и 6-дезоксо-28-норкаастерон. Синтез 6-дезоксо-24-эпикаастерона **17** и 6-дезоксокаастерона **18** проводили из соответствующих тетраацетатов **9** и **10** через ксантогенаты, что исключает изомеризацию по С-5 центру стероидной молекулы. Применение этой схемы включает восстановление 6-кетогруппы соединений **9** и **10** натрийборгидридом с образованием смеси спиртов по С-6 **11** и **12**, трансформацию их в ксантогенаты **13** и **14**, радикальное деоксигенирование последних и снятие защитных группировок.



6-Дезоксо-28-норкаастерон **23** получен из  $5\alpha$ -холест-2,22-диен-6-она **19**, доступного из стигмастерина **1**.



Удаление 6-кетогруппы проводили ксантогенатным методом, затем полученное 6-дезоксопроизводное **22** дигидроксилировали по Шарплесу в присутствии хирального лиганда. Образовавшийся целевой тетраол **23** является основ-

ным продуктом реакции, в качестве побочного соединения выделен его 22*S*,23*S*-диастереомер.

Оценка перекрестной реакции антител к 28-норкастастерону с различными БС и стероидами других классов показала, что полученная тест-система позволяет определять 6-оксоБС (кастастерон, 24-эпикастастерон, 28-гомокастастерон и 28-норкастастерон) с высокой степенью специфичности. Антитела к 28-норкастастерону проявляют незначительную кросс-реактивность с В-лактон-БС (0,3-1,6%), 6-дезоксоБС (0,16-0,24%) и практически не связывают синтетические интермедиаты (0,01-0,19%), а также стероиды других классов, в том числе и близкие по структуре – экидистероиды.

**Количественное определение БС в растительных объектах методом ИФА-I.** Проблема доступности и практичности количественного анализа БС в растениях решается в данной работе с использованием разработанных ранее (ИФА-ЭБС, ИФА-БРС, ИФА-ГБС, ИФА-Лактоны) и в настоящей работе (ИФА-Кетоны) иммуноферментных тест-систем. Метод количественного определения БС включает традиционную процедуру пробоподготовки растительного образца и иммуноферментный анализ (ИФА-I), в основе которого лежит одновременное конкурентное взаимодействие антигена и меченого антигена с антителами. Процедура пробоподготовки представляет собой выделение брасиностероидной фракции (БС-фракции) из растительного материала с использованием экстракционных (вода-этилацетат, циклогексан-80%-ный метанол) и хроматографических (препаративная ТСХ) методов.

Количественное определение содержания 24-эпиБС, 24*S*-метилБС и 28-гомоБС в образцах картофеля показало, что в клубнях картофеля наблюдается относительно высокое содержание 24-эпиБС, а наименьшее – 28-гомоБС. В корнеплодах моркови отмечено большее содержание 24*S*-метилБС, а наименьшее – 24-эпиБС. Полученные данные подтверждены независимым методом ВЭЖХ-МС. Для этого БС-фракцию, выделенную после препаративной ТСХ, подвергали дополнительному хроматографированию (ВЭЖХ). Выделенную ВЭЖХ-фракцию, содержащую БС, модифицировали 3-(дансиламино)фенилборной кислотой. Результаты количественного определения БС методами ИФА-I и ВЭЖХ-МС свидетельствуют о сопоставимости полученных данных.

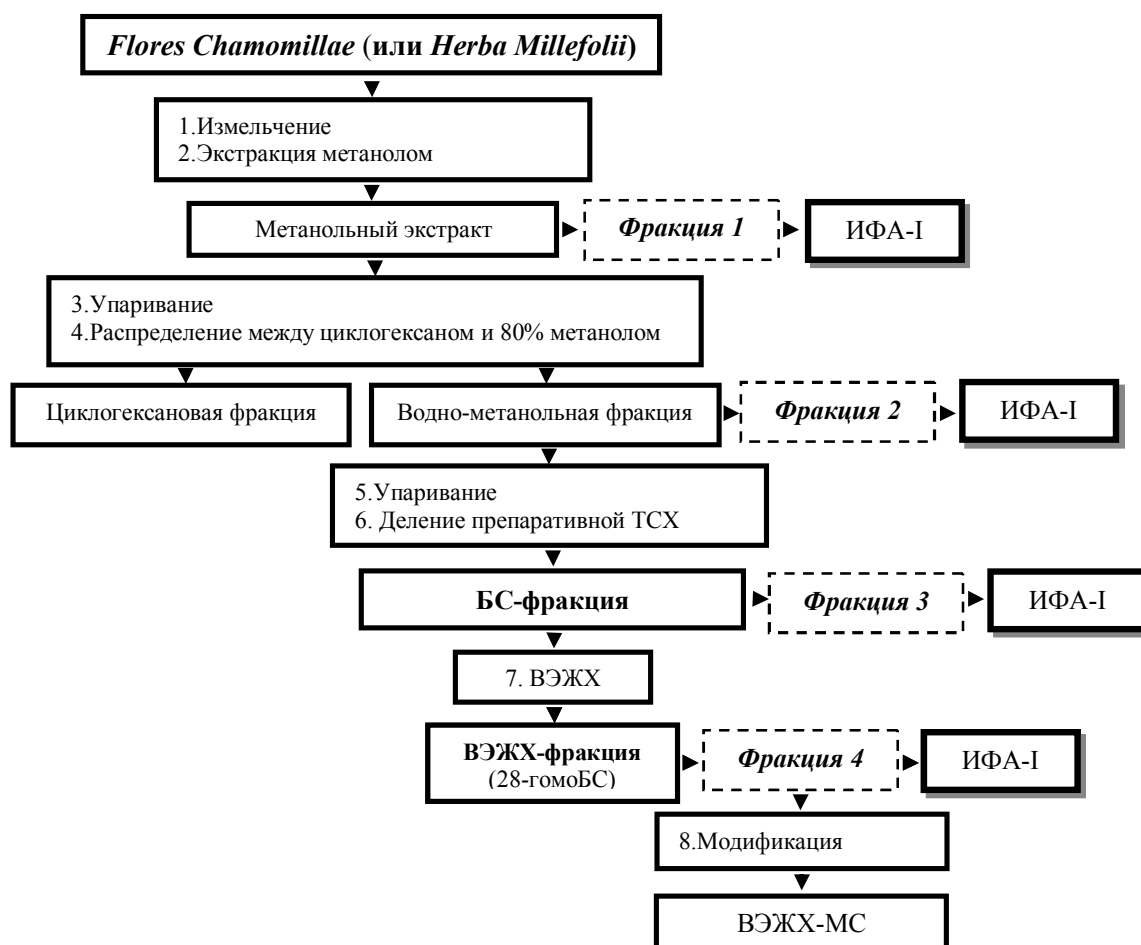
Методом ИФА-I исследован ряд продуктов питания растительного происхождения (фрукты, соки, чайные листья, зёрна гречки, риса и кофе). Показано, что содержание 24-эпиБС в исследуемых образцах обычно превышает содержание 24*S*-метилБС и 28-гомоБС.

Данные ИФА-I по изучению содержания эндогенных БС в различных тканях кукурузы *Zea mays* L. показали, что самый низкий уровень БС отмечен в 3-суточных этиолированных проростках растений, значительно больше их со-

держится в корнях, а самый высокий уровень зарегистрирован в эндосперме и зародышах семян кукурузы. Данный факт может свидетельствовать о ключевой роли БС на начальных стадиях онтогенеза растений.

**Комплексное применение группоспецифичных иммуноферментных тест-систем для определения индивидуальных БС.** Комплексное применение разработанной в настоящей работе тест-системы (ИФА-Кетоны) и созданных ранее тест-систем ИФА-ГБС и ИФА-Лактоны позволило анализировать содержание индивидуальных стероидных гормонов, в частности 28-гомобрасинолида (ГБР) и 28-гомокастастерона (ГКС), в растениях, что было продемонстрировано на примере лекарственных сборов – цветков ромашки аптечной (*Flores Chamomillae*) и травы тысячелистника (*Herba Millefolii*).

Процедуру пробоподготовки проводили, используя набор экстракционных и хроматографических методов (**Схема 1**). Образец, полученный после препаративной ТСХ, дополнительно фракционировали с помощью ВЭЖХ. Выделяли ВЭЖХ-фракцию, содержащую смесь 28-гомоБС, основываясь на временах выхода стандартных образцов ГБР и ГКС.



**Схема 1 – Выделение БС-фракции из сухого растительного материала**

Поскольку в составе полученной ВЭЖХ-фракции содержится преимущественно два указанных гормона, суммарное значение результатов

анализа с помощью ИФА-Лактоны и ИФА-Кетоны должно быть эквивалентно результату анализа с помощью ИФА-ГБС. Для цветков ромашки сумма значений  $3,99 \pm 0,20$  нг/г сух. веса (ИФА-Кетоны), отражающее уровень ГКС *Фракции 4*, и  $20,35 \pm 0,41$  нг/г (ИФА-Лактоны), отражающее уровень ГБР *Фракции 4*, хорошо согласуется с результатом  $24,75 \pm 1,06$  нг/г, полученным с помощью ИФА-ГБС и отражающим общее содержание 28-гомоБС в той же фракции. Для образцов травы тысячелистника (*Фракция 4*) также наблюдалась эквивалентность суммарного значения результатов анализа с помощью ИФА-Лактоны ( $10,9 \pm 0,21$  нг/г) и ИФА-Кетоны ( $3,13 \pm 0,56$  нг/г) с результатом анализа с помощью ИФА-ГБС ( $12,0 \pm 2,55$  нг/г).

Согласно методу ВЭЖХ-МС содержание ГБР составило  $23,47 \pm 3,20$  нг/г и  $13,0 \pm 1,19$  нг/г для образцов ромашки и тысячелистника, соответственно, что сопоставимо с результатами, полученными с помощью ИФА-Лактоны.

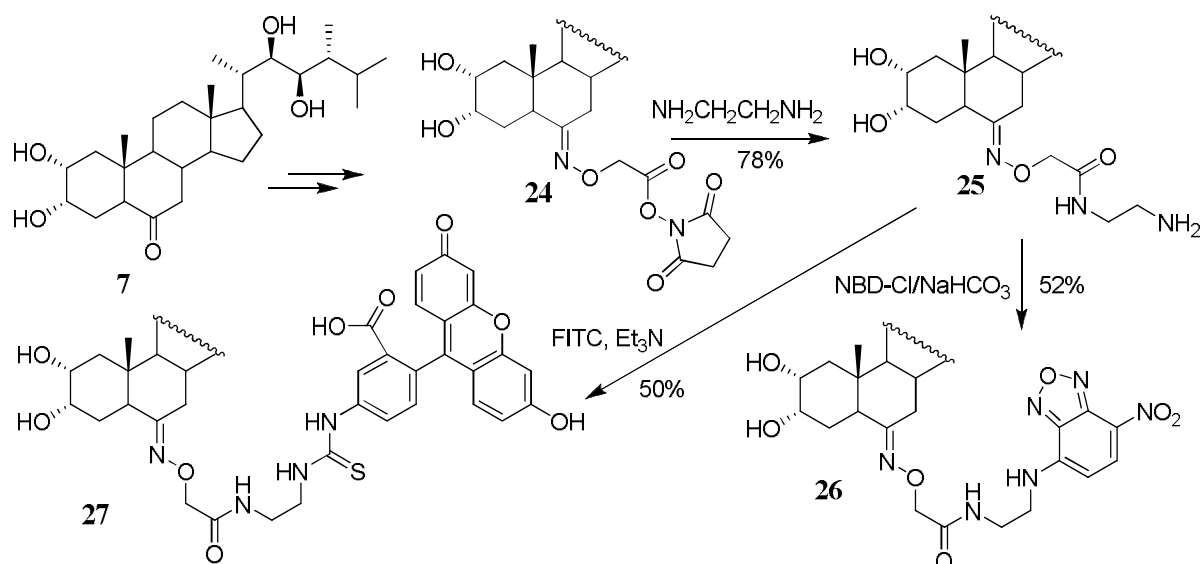
В образцах ромашки и тысячелистника с помощью ИФА-Лактоны и ИФА-Кетоны установлено общее содержание брассиностероидных лактонов и их биосинтетических предшественников – кетонов (*Фракция 3*). Результаты показали, что в случае травы тысячелистника соотношение брассиностероидных лактонов и кетонов составляет 1:1, в то время как в цветках ромашки содержание лактонов превышает содержание кетонов в 5 раз.

В процессе проведения процедуры пробоподготовки растительных образцов изучено изменение результатов ИФА-I в зависимости от степени очистки растительного экстракта. Анализ *Фракций 1* и *2* дал ложнозавышенный результат (в 2-5 раз), что, вероятно, объясняется эффектом матрикса, который может оказывать влияние как на взаимодействие антител с БС, так и на активность фермента в составе конъюгата брассиностероид-ПХ.

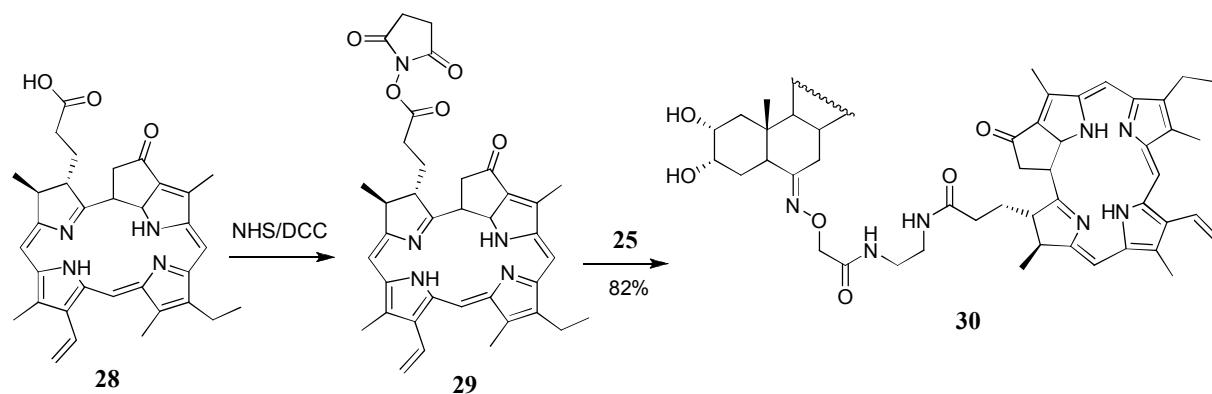
**Синтез новых флуоресцентно-меченых конъюгатов 24-эпикастастерона.** Использование соединений небелковой природы для мечения БС может быть решением проблемы, связанной с влиянием растительного матрикса на результаты ИФА-I. С этой целью синтезированы конъюгаты БС с люминофорами различной природы в качестве флуоресцентно-меченых антигенов для иммунохимического анализа БС.

Конъюгат **26** 24-эпикастастерона (ЭКС) с нитробензофуразаном синтезировали через амин **25**, полученный взаимодействием *N*-оксисукцинимидного эфира **24** с этилендиамином в диоксане. Обработка амина **25** эквимолекулярным количеством 7-хлор-4-нитробензофуразана в метаноле дала целевой конъюгат **26**.

Конъюгат **27** ЭКС с флуоресцеином получен при взаимодействии амина **25** с эквимолекулярным количеством изотиоцианата флуоресцеина в метаноле.



Для синтеза конъюгата **30** ЭКС с порфирином последний взаимодействием с *N*-гидроксисукцинимидом в присутствии дициклогексилкарбодиимида в диоксане превратили в *N*-оксисукцинимидный эфир **29**, который в последующей реакции с амином **25** дал конъюгат **30**.



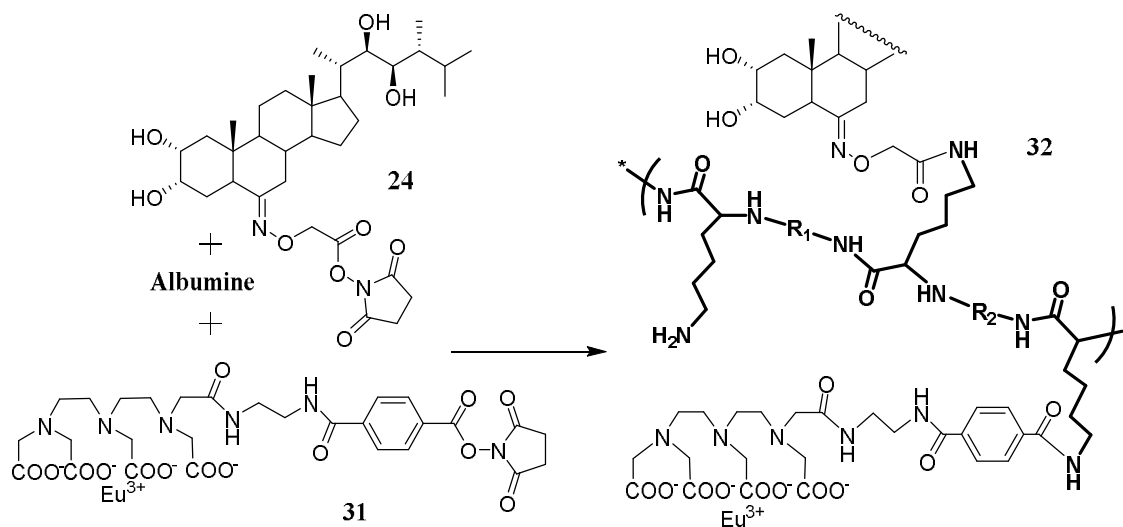
Возможность использования синтезированных конъюгатов в качестве меченых антигенов для иммунофлуоресцентного анализа БС определяется, прежде всего, их флуоресцентными свойствами (Таблица 1) и иммунореактивностью. Перекрестная реакция антител к 24-эпиБС с конъюгатами **26**, **27** и **30** составила около 100%, т.е. данные соединения могут быть использованы в качестве флуоресцентно-меченых антигенов в иммунохимическом анализе.

Таблица 1. – Спектрально-флуоресцентные характеристики

Соединение	$\lambda_{\text{max}}^{\text{п}}$ <sup>1)</sup> , нм	$\lambda_{\text{max}}^{\text{ф}}$ <sup>2)</sup> , нм
конъюгат <b>26</b> ЭКС с нитробензофурозаном (раствор $10^{-5}$ моль/л в этаноле)	331 463	535
конъюгат <b>27</b> ЭКС с флуоресцеином ( $10^{-5}$ моль/л в буферном растворе (0,05М Трис, pH 7,5))	489	524
конъюгат <b>30</b> ЭКС с порфирином (раствор $10^{-5}$ моль/л в этаноле)	413 667	674

1)  $\lambda_{\text{max}}^{\text{п}}$  – длина волны максимума полосы поглощения; 2)  $\lambda_{\text{max}}^{\text{ф}}$  – длина волны максимума полосы флуоресценции.

По разработанной в Лаборатории химии белковых гормонов методике получен комбинированный конъюгат ЭКС **32** с комплексонатом  $\text{Eu}^{3+}$ . В качестве белка-носителя использовали альбумин человека,  $\epsilon$ -аминогруппы остатков лизина которого модифицировали *N*-оксисукцинимидными эфирами **24** и **31**. Совместное использование специфических антител к 24-эпиБС и конъюгата **32** ЭКС с комплексонатом  $\text{Eu}^{3+}$  в качестве меченого антигена послужило основой для создания тест-системы лантанидного иммунофлуориметрического анализа 24-эпиБС (ЛИФМА-ЭБС). Аналитический рабочий диапазон составил 1-100 нмоль/л, чувствительность – 0,3 нмоль/л.

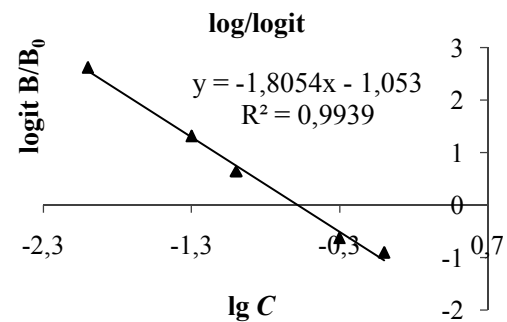
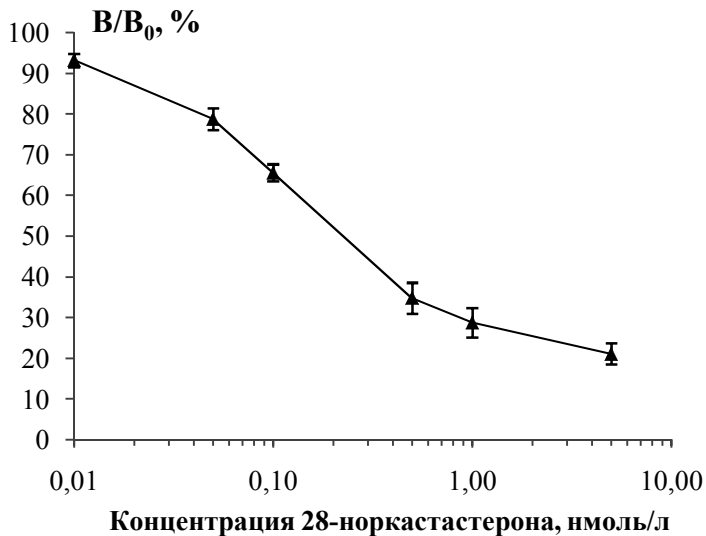


С использованием ЛИФМА-ЭБС провели количественное определение 24-эпиБС в 10-дневных проростках озимой пшеницы сорта Капылянка. Анализ БС *Фракций 1* и *2* (*Схема 1*) дал завышенный результат как в случае ИФА-ЭБС, так и в случае – ЛИФМА-ЭБС, причем результаты анализа различаются более чем на 20%. Данный факт свидетельствует о том, что растительный матрикс по-разному влияет на активность конъюгата brassinостероида с ферментом и комплексонатом  $\text{Eu}^{3+}$ . Содержание 24-эпиБС *Фракции 3*, установленное с помощью ИФА-ЭБС и ЛИФМА-ЭБС, составило  $24,9 \pm 1,56$  и  $25,5 \pm 3,04$  нг/г, соответственно. Сопоставимость полученных данных подтверждает достоверность результатов метода ЛИФМА при определении БС в растительных объектах в случае использования фракций после очистки ТСХ.

**Разработка экспресс-метода анализа БС.** С целью отказа от многостадийной пробоподготовки и для устранения негативного влияния матрикса разработан двухстадийный метод иммуноанализа БС в растительных образцах (ИФА-II). Особенность метода заключается в разделении процедуры иммуноанализа на два этапа. На первом этапе в лунках с иммобилизованными антителами находятся калибровочные пробы и анализируемые образцы, на втором (после промывки лунок) – конъюгат БС-ПХ. Процедура пробоподготовки сводилась к гомогенизации растительных образцов в буферном растворе

(рН 7,4), центрифугировании, разведении супернатанта и его использовании для анализа.

Преимущества метода ИФА-II по сравнению с ИФА-I представлены на примере ИФА-Кетоны. Калибровочная кривая построена в диапазоне концентраций 0,01-5 нмоль/л (**Рисунок 2**), аналитический рабочий диапазон составил 0,01-1 нмоль/л, чувствительность – 0,01 нмоль/л. Повышение чувствительности определения БС при использовании ИФА-II вместо ИФА-I позволяет в большей степени разводить экстракты растительных образцов буферным раствором (рН 7,4), существенно уменьшая влияние матрикса на взаимодействие антител с БС.



**Рисунок 2 – Калибровочная кривая для ИФА-II 6-оксоБС**

Применимость двухстадийного метода анализа показана также для ИФА-ЭБС и ИФА-ГБС. Калибровочная кривая для данных тест-систем, построенная в диапазоне концентраций 0,01-5 нмоль/л, имела вид аналогичный кривой, полученной для ИФА-Кетоны. Аналитический рабочий диапазон и параметры тест-систем также близки к соответствующим значениям ИФА-Кетоны.

Результаты определения 28-гомоБС в цветках ромашки (*Flores Chamomillae*) с помощью ИФА-II ( $22,50 \pm 1,20$  нг/г) хорошо согласуются с данными, полученными методами ИФА-I ( $24,75 \pm 1,06$  нг/г) и ВЭЖХ-МС ( $23,47 \pm 3,20$  нг/г). Общее содержание 6-оксоБС в образцах ромашки, измеренное методами ИФА-II и ИФА-I, оказалось близким и составило  $38,33 \pm 3,21$  и  $36,00 \pm 1,88$  нг/г, соответственно.

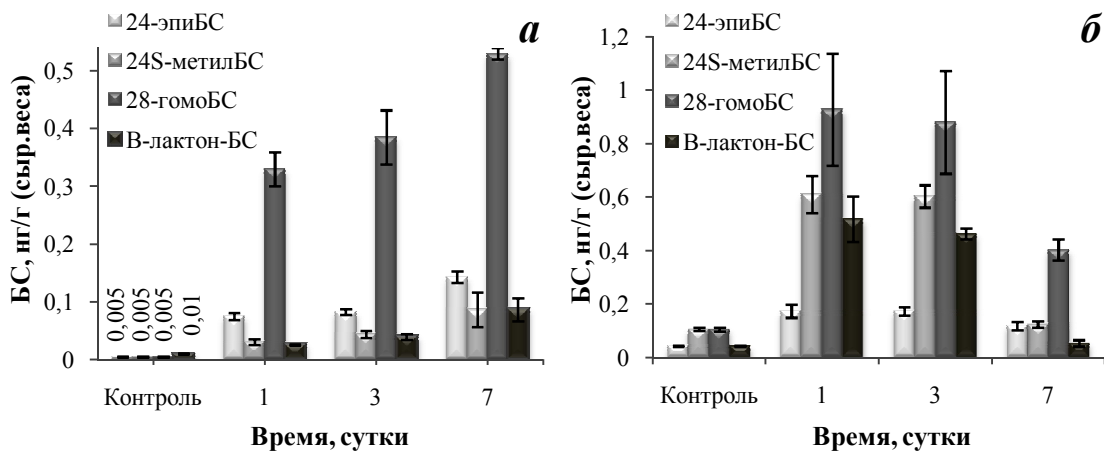
Содержание 24-эпиБС в 10-дневных проростках пшеницы, определенное методом ИФА-II, составило  $23,4 \pm 1,74$  нг/г, что также сопоставимо с результатами ИФА-I ( $24,9 \pm 1,56$  нг/г) и ЛИФМА ( $25,5 \pm 3,04$  нг/г).

**Изменение уровня эндогенных БС в растениях при стрессовом воздействии.** Обработка БС повышает устойчивость растений к абиотическим и биотическим стрессорам: неблагоприятным температурам, избыточному засолению, высокому содержанию в почве тяжелых металлов, воздействию

патогенов, пестицидов и др. Однако до сих пор не изучена динамика уровня эндогенных БС в условиях стресса и в процессе адаптации растений.

Методом ИФА-I проведена оценка изменения содержания основных групп БС – 24S-метилБС, 24-эпиБС, 28-гомоБС и В-лактон-БС в процессе адаптации растений к абиотическим (холод, засоление, свет) и биотическим (патогены) факторам стресса.

Изучение влияния **холодового стресса** на уровень эндогенных БС проводили на образцах кукурузы *Zea mays* L. Обнаружено, что в условиях действия низких температур на 3-суточные этиолированные проростки наблюдалось повышение уровня эндогенных БС в первые сутки адаптации, через трое суток и оставалось на высоком уровне на протяжении семи суток эксперимента (**Рисунок 3а**). В корнях в условиях холодного стресса уровень БС также резко возрастал в течение первых трех суток, при этом на седьмые сутки содержание БС несколько снизилось, но оставалось выше уровня контроля (**Рисунок 3б**).



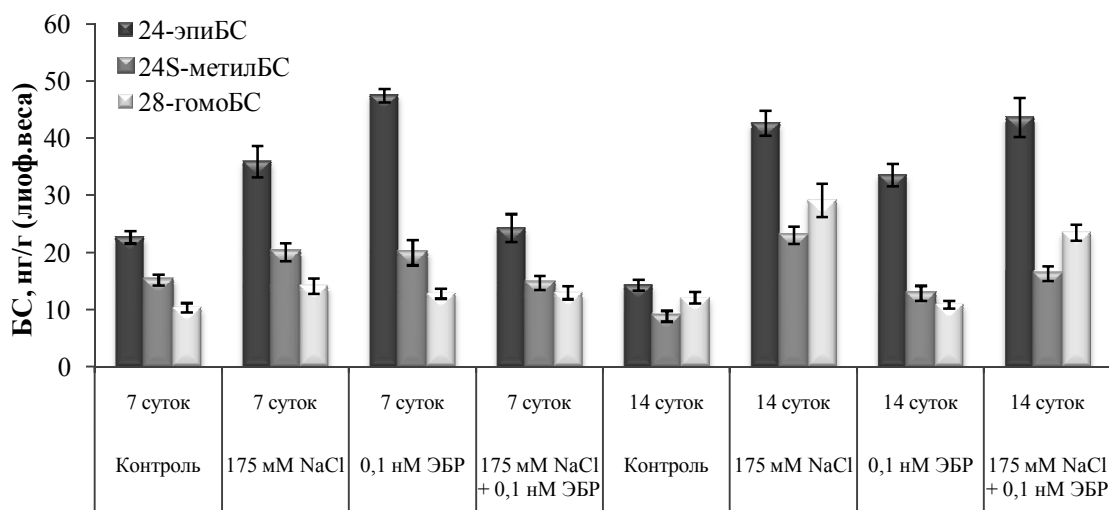
**Рисунок 3 – Влияние холодного стресса на уровень эндогенных БС (нг/г сыр. веса) в проростках (а) и корнях (б) кукурузы через 1, 3 и 7 суток от начала воздействия (n=3, p≤0,05)**

Исследования **воздействия темноты и света** (зеленого и белого) на уровень эндогенных БС проводили на проростках ячменя *Hordeum vulgare* L. (16 ч). В листьях 8-суточных этиолированных проростков ячменя, не подвергнутых каким-либо воздействиям (контроль), наблюдалось повышенное содержание 24S-метилБС по сравнению с 24-эпиБС и 28-гомоБС, уровень которых ниже в 1,3 и 2,2 раза, соответственно. Суммарное содержание всех анализируемых групп БС на зеленом свете было на 20-35 % выше, чем в темноте и на белом свете. На свету наблюдался дифференцированный ответ. Так, при воздействии белого света повышалось содержание лишь двух групп гормонов – 24S-метилБС и 24-эпиБС (в 1,3 – 1,4 раза по сравнению с темновым вариантом), а зеленого – содержание всех исследованных групп БС (в 1,4 – 1,6 раза).

Исследование влияния **солевого стресса** на уровень эндогенных БС проводили на 26-суточных растениях рапса *Brassica napus* L. Показано, что воздей-



ствие NaCl стимулировало накопление в растениях всех анализируемых эндогенных БС (**Рисунок 4**). Наблюдаемый эффект значительно усиливался через 14 суток солевого воздействия. Внесение в питательную среду экзогенного ЭБР способствовало полному или частичному (через 7 и 14 суток воздействия соответственно) снижению эффекта NaCl на накопление не только 24-эпиБС, но и 24S-метилБС и 28-гомоБС в растениях рапса. Одним из возможных объяснений наблюдаемого эффекта может быть подавление экзогенным гормоном биосинтеза эндогенных БС.



**Рисунок 4 – Влияние ЭБР и NaCl на уровень эндогенных БС (нг/г лиоф. веса) в растениях рапса через 7 и 14 суток от начала воздействия (n=4, p≤0,05)**

Объектами исследования влияния **биотического стресса** на уровень эндогенных БС служили растения ярового ячменя сорта Дивосный и споры ленинградской популяции гриба *Helminthosporium teres* Sacc. (*H. teres*). Оценка влияния инфицирования грибом 12-суточных проростков ярового ячменя на гормональный брассиностероидный статус растений показала, что уже через 2 суток после заражения уровень эндогенных БС всех изученных групп значительно снижается (**Таблица 2**). При этом для 24-эпиБС он остается низким на протяжении всего периода наблюдения (7 суток), а для 24S-метилБС и 28-гомоБС заметно возрастает, приближаясь к уровню контроля. Полученные данные могут свидетельствовать о постепенной адаптации растения к стрессу, вызванному патогеном.

**Таблица 2. – Содержание эндогенных БС (нг/г лиоф. веса) в образцах здоровых и инфицированных грибом *H.teres* проростков ячменя (n=4, p≤0,05)**

Образец	t*, сутки	24-эпиБС	24S-метилБС	28-гомоБС
Контроль	2	17,49 ± 0,70	6,74 ± 0,75	22,57 ± 2,33
Зараженные грибом <i>H.teres</i>		13,81 ± 1,67	2,35 ± 0,27	11,03 ± 0,63
Контроль	7	17,78 ± 0,76	7,23 ± 0,79	20,26 ± 2,83
Зараженные грибом <i>H.teres</i>		13,10 ± 2,24	4,92 ± 0,09	15,50 ± 1,29

\* Время после заражения образцов грибом *H.teres*.

Таким образом, с применением метода ИФА-I показано изменение (повышение или снижение) уровня БС в ответ на абиотические и биотические факторы стресса, что свидетельствует о вовлечении данной группы фитогормонов в регуляцию стрессоустойчивости растений.

**Фармакокинетика 24-эпибрассинолида в организме крыс.** Исследования последних лет показали, что БС обладают рядом положительных свойств в отношении млекопитающих, включая антипролиферативное, противовирусное, нейропротекторное, антидиабетическое и антихолестеринемическое действие. Одним из важных этапов разработки новых медицинских препаратов являются фармакокинетические исследования действующего вещества.

Проведены фармакокинетические исследования ЭБР на крысах линии Вистар при внутрижелудочном (в/ж) и внутрибрюшинном (в/б) введении (1 мг на 1 кг массы тела крысы) с использованием тест-системы ИФА-ЭБС. Распределение ЭБР в органах и тканях животных изучали после однократного в/ж введения в той же дозировке. Для определения концентрации ЭБР в плазме был предложен конкурентный прямой метод ИФА-I. Калибровочные растворы готовили путем последовательного разведения исходного раствора стероида интактной плазмой, меченый антиген растворяли в буферном растворе (рН 7,4).

Показано, что при приеме внутрь ЭБР всасывается быстро. Максимальная концентрация в плазме крови отмечается через 5-10 мин и составляет порядка 4-6 нг/мл. Попадая в кровоток, ЭБР, вероятно, обратимо связывается с белками плазмы крови. Содержание ЭБР в тканях желудка достигает максимума через 10 минут, а через 6 ч оно сопоставимо с таковым в других органах. Наибольшее накопление брассиностероида происходит в печени и тонком кишечнике. Заметное содержание ЭБР отмечено в почках. Остальные органы (сердце, селезенка) и ткани (мышцы, сальник) незначительно накапливают ЭБР.

Анализ экспериментальных фармакокинетических кривых и оценка параметров однокамерной модели с учетом всасывания позволили получить фармакокинетические параметры ЭБР. Снижение концентрации ЭБР в плазме характеризуется временем половинного убывания, которое равно порядка 50 мин. Общее среднее время присутствия препарата в организме (MRT) составляет ~ 70 мин. Величина кажущегося объема распределения ( $V_d$ ) – 168 л/кг. Фармакокинетические параметры ЭБР линейны в диапазоне доз 0,1-1 мг/кг. Абсолютная биодоступность ЭБР составляет 35%.

**Определение БС в брассиностероидсодержащих препаратах.** На основе ИФА-I разработаны методы количественного определения БС в ветеринарном препарате «Бравидефен», биологически активной добавке «Фитонол», разрабатываемом в настоящее время лекарственном средстве холестеринснижающего действия «Декрехол».

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные научные результаты диссертации

1. Реакцией *N*-оксисукцинимидного эфира 26-гемисукцината 26-гидрокси-28-норкастастерона с бычьим сывороточным альбумином и пероксидазой хрена впервые получены соответствующие иммуноген и меченый антиген, ставшие основой для разработки метода количественного определения 6-оксобраassinостероидов и первой иммуноферментной тест-системы для его осуществления. Показано, что сочетание нескольких группоспецифичных иммуноаналитических тест-систем позволяет определять содержание индивидуальных стероидных гормонов в растениях [9, 17, 18, 25, 34-36].
2. Исходя из соответствующих 6-оксопроизводных с применением в качестве ключевой стадии метода радикально-инициированного деоксигенирования ксантогенатов, позволяющего предотвратить возможную изомеризацию по С5-центру, впервые осуществлен синтез 6-дезоксо-28-норкастастерона, а также получены 6-дезоксокастастерон и 6-дезоксо-24-эпикастастерон для определения специфичности антител к индивидуальным стероидным фитогормонам и возможного использования в качестве компонентов новых тест-систем для анализа браassinостероидов [3, 32].
3. Осуществлен синтез новых конъюгатов 24-эпикастастерона с нитробензофуразаном, флуоресцеином, порфирином и комплексоном  $\text{Eu}^{3+}$ , ключевым соединением в схемах синтеза является 6-*O*-карбоксиметил оксим 24-эпикастастерона. Установлено, что полученные конъюгаты обладают эффективными флуоресцентными свойствами и высокой связывающей способностью с антителами, специфичными к 24-эпибраassinостероидам. С использованием высокомолекулярного конъюгата 24-эпикастастерон-комплексонат  $\text{Eu}^{3+}$  разработана тест-система для лантанидного иммунофлуориметрического анализа 24-эпибраassinостероидов [1, 8, 11, 16, 30].
4. Разработан высокочувствительный экспресс-метод иммуноферментного определения браassinостероидов, в основе которого лежит принцип разделения фаз взаимодействия определяемого и меченого антигенов с антителами, что позволяет существенно повысить чувствительность анализа и проводить измерения БС в растительных объектах без многостадийной пробоподготовки [9, 25].
5. На основе конкурентного иммуноферментного анализа разработаны методы количественного определения браassinостероидов в растительных объектах, физиологических жидкостях и браassinостероидсодержащих препаратах. Впервые с применением данного метода обнаружено изменение стероид-гормонального статуса растений в ответ на абиотические и биотические факторы стресса, что свидетельствует о вовлечении браassinостероидов в регуляцию стрессоустойчивости растений [2, 4-7, 12-15, 19-24, 26, 27, 29, 31, 37, 38].

6. Впервые на крысах линии Вистар с использованием метода иммуноферментного анализа определены основные фармакокинетические параметры 24-эпибрассинолида и изучено его распределение в органах [10, 28, 33].

### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

Иммуноферментный анализ используется как метод контроля содержания БС в ветпрепарате Бравидефен и биологически активной добавке «Фитонол» [37, 38].

Разработанные методы количественного определения БС могут использоваться для дальнейшего изучения их роли, метаболизма и распространенности в растительном мире.

Флуоресцентно-меченые БС могут использоваться в качестве высокочувствительных сенсоров в аналитических системах и при исследовании взаимодействий фитогормонов в различных биологических средах.

Результаты исследования фармакокинетики ЭБР могут быть использованы при разработке медицинских препаратов на его основе.

### **Список публикаций соискателя**

*Статьи в рецензируемых научных журналах:*

1. Синтез и спектрально-люминесцентные свойства новых конъюгатов брассиностероидов для иммунофлуоресцентного анализа / Т.Ф. Райченок, Р.П. Литвиновская, В.Н. Жабинский, М.Э. Райман, **А.Л. Куртикова**, П.С. Минин // Химия природных соединений. – 2012. – Т. 48, №2. – С. 239-242.
2. Иммуноферментный анализ содержания эндогенных брассиностероидов в продуктах питания растительного происхождения / В.А. Хрипач, Р.П. Литвиновская, **А.Л. Куртикова**, С.В. Драч, А.Г. Прядко, Т.В. Миранцова, А.В. Барановский // Докл. НАН Беларуси, сер. хим. – 2013. – Т. 57, №2. – С. 63-69.
3. Индолил-3-ацетоксипроизводные брассиностероидов: синтез и рострегулирующая активность / Р.П. Литвиновская, П.С. Минин, М.Э. Райман, Г.А. Жилицкая, **А.Л. Куртикова**, К.Г. Кожарнович, М.В. Деревянчук, В.С. Кравец, В.А. Хрипач // Химия природных соединений. – 2013. – Т.49, № 3. – С. 408-414.
4. Influence of brassinosteroids on plant cell alternative respiration pathway and antioxidant systems activity under abiotic stress conditions / M.V. Derevyanchuk, O.I. Grabelnyh, R.P. Litvinovskaya, V.K. Voinikov, **A.L. Sauchuk**, V.A. Khripach, V.S. Kravets // Biopolymers and Cell. – 2014. – Vol. 30, №6. – P. 436-442.
5. Иммуноферментные тест-системы для оценки стероид-гормонального статуса растений при биотическом стрессе / Р.П. Литвиновская, **А.Л. Савчук**, Н.Е. Манжелесова, С.Н. Полянская, В.А. Хрипач // Известия РАН, сер. хим. – 2014. – №9. – С. 2184-2188.

6. Наноструктурированные комплексы стероидного фитогормона: новый подход к защите от вирусной инфекции / И.В. Насонов, М.И. Лихачева, П.А. Киселев, Н.И. Бовдей, **А.Л. Савчук**, В.Н. Жабинский, Р.П. Литвиновская, Н.Б. Хрипач // Докл. НАН Беларуси, сер. биол. – 2014. – Т. 58, №6. – С.53-56.
7. Физиологические механизмы повышения солеустойчивости растений рапса brassиностероидами / М.В. Ефимова, **А.Л. Савчук**, Дж.А.К. Хасан, Р.П. Литвиновская, В.А. Хрипач, В.П. Холодова, Вл.В. Кузнецов // Физиология растений. – 2014. – Т.61, №6. – С. 778-789.
8. Новый подход к иммунохимическому определению brassиностероидов / **А.Л. Савчук**, О.С. Куприенко, Р.П. Литвиновская, О.В. Свиридов, В.А. Хрипач // Докл. НАН Беларуси, сер. хим. – 2015. – Т. 59, №1. – С. 63-67.
9. A new ELISA for quantification of brassinosteroids in plants / A.G. Pradko, R.P. Litvinovskaya, **A.L. Sauchuk**, S.V. Drach, A.V. Baranovsky, V.N. Zhabinskii, T.V. Mirantsova, V.A. Khripach // Steroids. – 2015. – Vol. 97. – P.78-86.
10. Стероидные гормоны растений: медицинские аспекты и фармакокинетические исследования / **А.Л. Савчук**, Р.П. Литвиновская, В.М. Насек, Е.В. Санько-Счисленок, В.Н. Жабинский, В.А. Хрипач // Фармацевтический бюллетень. – 2015. – №3-4. – С.84-98.
11. Brassinosteroid-BODIPY conjugates: Design, synthesis, and properties / M. Malachowska-Ugarte, C. Sperduto, Y.V. Ermolovich, **A.L. Sauchuk**, M. Jurášek, R.P. Litvinovskaya, D. Straltsova, I. Smolich, V.N. Zhabinskii, P. Drašar, V. Demidchik, V.A. Khripach // Steroids. – 2015. –Vol. 102. – P. 53-59.
12. Роль brassиностероидов в адаптации функционирования митохондрий растений *in vivo* при действии абиотических стрессов / М.В. Деревянчук, О.И. Грабельных, Р.П. Литвиновская, В.К. Войников, **А.Л. Савчук**, В.А. Хрипач, В.С. Кравец // Доповіді НАН України. – 2015. – №1. – С.153-158.
13. Влияние ауксинового производного brassиностероида на регуляцию роста и развития растений в условиях солевого стресса / М.В. Деревянчук, Р.П. Литвиновская, **А.Л. Савчук**, В.А. Хрипач, В.С. Кравец // Доповіді НАН України. – 2015. – №3. – С.148-151.

*Тезисы докладов:*

14. Определение эндогенных brassиностероидов в растениях методом иммунохимического анализа / **А.Л. Куртикова**, С.В. Драч, Р.П. Литвиновская, В.А. Хрипач // Регуляция роста, развития и продуктивности растений : материалы VI-ой Междунар. научн. конф., Минск, 28-30 окт. 2009 г. / Ин-т эксп. ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси; редкол.: Г.Н. Алексейчук [и др.]. – Минск, 2009. – С. 88.
15. Анализ содержания эндогенных brassиностероидов в кукурузе в условиях температурного стресса / В.А. Хрипач, Р.П. Литвиновская, С.В. Драч, **А.Л. Куртикова**, В.С. Кравец, С.В. Кретинин, М.В. Деревянчук // Растения и стресс :

тез. докл. Всероссийского симпозиума, Москва, 9-12 ноябр. 2010 г. / Ин-т физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН; редкол.: Вл.В. Кузнецов [и др.]. – Москва, 2010. – С. 378-379.

16. Флуоресценция конъюгатов биологически активных brassinosteroidов / Т.Ф. Райченок, Р.П. Литвиновская, В.Н. Жабинский, М.Э. Райман, **А.Л. Куртикова**, П.С. Минин // Spin & protonic Beams at Interface : сб. тезисов III Конгресса физиков Беларуси, посвящ. 100-летию со дня рождения акад. Ф.И. Федорова, Минск, 25-27 сент. 2011 г. / Ин-т физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси; ред.: С.Я. Килин. – Минск, 2011. – С. 81-82.

17. Содержание brassinosteroidов в некоторых лекарственных сборах / **А.Л. Куртикова**, С.В. Драч, Р.П. Литвиновская, В.А. Хрипач // Фитогормоны, гуминовые вещества и другие биорациональные пестициды в сельском хозяйстве : сб. материалов VII Междунар. конф. молодых ученых Radostim, Минск, 2-4 ноябр. 2011 г. / Ин-т биоорг. химии НАН Беларуси. – Минск, 2011. – С.108.

18. Enzyme immunoassay for 6-oxo-brassinosteroids / **A.L. Kurtsikova**, R.P. Litvinovskaya, A.G. Pryadko, T.V. Novik, V.A. Khripach // Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design : abstracts of 3<sup>rd</sup> Int. Symposium, Lviv, 17-23 sept. 2012. / Ivan Franko National University of Lviv. – Lviv, 2012. – P. 85.

19. Resistance to diseases and steroid hormonal status of plants / V.A. Khripach, R.P. Litvinovskaya, M.I. Zavadskaya, **A.L. Kurtsikova**, V.N. Zhabinskii // Plant Diseases and Resistance Mechanisms : abstracts of Int. conf., Vienna, 20-22 febr. 2013. / Vienna Int. Plant Conference Association. – Vienna, 2013. – P.74.

20. Brassinosteroidы и болезнеустойчивость растений / М.И. Завадская, В.Н. Жабинский, Н.М. Чащина, Р.П. Литвиновская, **А.Л. Куртикова**, В.А. Хрипач // Инновационные агротехнологии в условиях смены климата : материалы Междунар. научно-практ. конф., Мелитополь, 7-9 июня 2013 г. – Мелитополь, 2013 – С.55-57.

21. Стероид-гормональный статус и устойчивость растений к фитопатогенам / Р.П. Литвиновская, **А.Л. Куртикова**, Н.Е. Манжелесова, С.Н. Полянская, В.А. Хрипач // Химия и технология растительных веществ : материалы VIII Всероссийской конф., Калининград, 7-10 окт. 2013 г. / Ин-т химии Коми НЦ УрО РАН; редкол.: А.В. Кучин [и др.]. – Сыктывкар, 2013 г. – С. 134.

22. Стероидные гормоны растений: природный фактор защиты от фитопатогенов / В.А. Хрипач, Р.П. Литвиновская, **А.Л. Куртикова**, М.И. Завадская, В.Н. Жабинский, Н.М. Чащина // Агротехнический метод защиты растений от вредных организмов : материалы VI Междунар. научно-практ. конф., Краснодар, 17-21 июня 2013 г. / Кубанский гос. аграрный ун-т им. И.Т. Трубилина. – Краснодар, 2013. – С. 360-363.

23. Влияние brassinosteroidов на устойчивость растений к засолению / **А.Л. Савчук**, Р.П. Литвиновская, М.В. Ефимова, А.К. Хасан, В.П. Холодова, В.В.

Кузнецов, В.А. Хрипач // Химия, структура и функции биомолекул : материалы V междунар. науч. конф., посвящ. 40-летию Инст. биоорг. химии и 85-летию НАН Беларуси, Минск, 4-6 июня 2014 г. / Ин-т биоорг. химии НАН Беларуси; редкол.: Ф.А. Лахвич [и др.]. – Минск, 2014. – С. 159-160.

24. Influence of brassinosteroids on activity of alternative oxidase respiration pathway in the model system *Arabidopsis thaliana* under stress conditions / V.S. Kravets, M.V. Derevyanchuk, R.P. Litvinovskaya, **A.L. Sauchuk**, V.A. Khripach // Химия, структура и функции биомолекул : материалы V междунар. науч. конф., посвящ. 40-летию Ин-та биоорг. химии и 85-летию НАН Беларуси, Минск, 4-6 июня 2014 г. / Ин-т. биоорг. химии НАН Беларуси; редкол.: Ф.А. Лахвич [и др.]. – Минск, 2014. – С. 14.

25. Immunoassay of brassinosteroids / **A. Sauchuk**, A. Pradko, R. Litvinovskaya, T. Mirantsova, V. Khripach // Abstracts of 22<sup>nd</sup> Conference on Isoprenoids, Prague, 7-10 sept. 2014. / Institute of Chemical Technology; eds.: R. Řápková, M. Jurášek, P. Drašar. – Prague, 2014. – P. s116-s117.

26. Влияние хлоридного засоления брассиностероидов в растениях рапса на разных этапах онтогенеза / М.В. Ефимова, **А.Л. Савчук**, Р.П. Литвиновская, А.К. Хасан, В.А. Хрипач // Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий : материалы Междунар. конф., Калининград, 19-25 мая 2014 г. : в 2 ч. / Калинингр. гос. техн. ун-т; ред. Е.С. Роньжиной. – Калининград, 2014. – С.165-166.

27. Brassinosteroids activates chaperones synthesis in *Zea mays* L. plants under salinity / M.V. Derevyanchuk, R.P. Litvinovskaya, **A. Sauchuk**, V.A. Khripach, V.S. Kravets // Материалы XI Украинского биохим. конгресса, 6-10 октября 2014 г. / Ukrainian biochemical journal. – 2014. – Vol. 86, №5. – P. 148.

28. 24-Epibrassinolide pharmacokinetic studies / **A.L. Sauchuk**, R.P. Litvinovskaya, V. Nasek, E. Sanko-Schislenok // Abstracts of 23<sup>rd</sup> Conference on Isoprenoids, Minsk, 4-7 Sept. 2016. / Ин-т. биоорг. химии НАН Беларуси; eds.: V. Khripach and V. Zhabinskii. – Minsk, 2016. – Весці НАН Беларусі, сер. хім. – 2016. – №3. – P. 51-52.

29. Anikeyev, V.I New anti-stress activity test for brassinosteroids / V.I. Anikeyev, **A.L. Sauchuk** // Abstracts of 23<sup>rd</sup> Conference on Isoprenoids, Minsk, 4-7 Sept. 2016. / Ин-т. биоорг. химии НАН Беларуси; eds.: V. Khripach and V. Zhabinskii. – Minsk, 2016. – Весці НАН Беларусі, сер. хім. –2016. – №3. – P. 63.

30. Time-resolved fluoroimmunoassay for quantitative determination of brassinosteroids in plants / O. Kuprienko, **A.L. Sauchuk**, R.P. Litvinovskaya, O. Sviridov // Abstracts of 23<sup>rd</sup> Conference on Isoprenoids, Minsk, 4-7 Sept. 2016. / Ин-т. биоорг. химии НАН Беларуси; eds.: V. Khripach and V. Zhabinskii. – Minsk, 2016. – Весці НАН Беларусі, сер. хім. –2016. – №3. – P. 87-89.

31. Immunostimulatory properties of Bravidefen, a brassinosteroid-based drug, in chickens / M.I. Likhacheva, I.V. Nasonov, R.P. Litvinovskaya, **A.L. Sauchuk** // Abstracts of 23<sup>rd</sup> Conference on Isoprenoids, Minsk, 4-7 Sept. 2016. / Ин-т. биоорг. химии НАН Беларуси; eds.: V. Khripach and V. Zhabinskii. – Minsk, 2016. – Весті НАН Беларусі, сер. хім. –2016. – №3. – Р. 99-100.
32. Test-systems for immunoassay of 6-deoxobrassinosteroids / **A.L. Sauchuk**, R.P. Litvinovskaya, A.G. Pradko, T.V. Mirantsova // Abstracts of 23<sup>rd</sup> Conference on Isoprenoids, Minsk, 4-7 Sept. 2016. / Ин-т. биоорг. химии НАН Беларуси; eds.: V. Khripach and V. Zhabinskii. – Minsk, 2016. – Весті НАН Беларусі, сер. хім. – 2016. – №3. – Р. 109.
33. Фармакокинетические исследования 24-эпибрассинолида / **А.Л. Савчук**, Р.П. Литвиновская, В.М. Насек, Е.В. Санько-Счисленок, В.А. Хрипач // Белорусские лекарства : Сб. материалов Междунар. научно-практ. конф., Минск, 17-18 ноября 2016 г. / Ин-т. биоорг. химии НАН Беларуси; редкол.: С.А. Усанов, Е.Н. Калиниченко, П.Т. Петров. – Минск, 2016. – С. 239-242.

*Патенты:*

34. Конъюгат 28-норкастастерона с бычьим сывороточным альбумином в качестве иммуногена : пат. 19354 Респ. Беларусь : МПК С07J51/00 (2006.01) / В.А. Хрипач, Р.П. Литвиновская, В.Н. Жабинский, С.В. Драч, А.В. Антончик, **А.Л. Куртикова**, А.Г. Прядко, Т.В. Миранцова, В.Д. Матвеевцев ; дата публ.: 30.12.2013.
35. Конъюгат 28-норкастастерона с пероксидазой хрена в качестве меченого антигена для иммуноферментного определения 6-оксобрассиностероидов : пат. 19355 Респ. Беларусь : МПК С07J51/00 (2006.01) / В.А. Хрипач, Р.П. Литвиновская, В.Н. Жабинский, С.В. Драч, А.В. Антончик, **А.Л. Куртикова**, А.Г. Прядко, Т.В. Миранцова, В.Д. Матвеевцев ; дата публ.: 30.12.2013.
36. Способ количественного определения 6-оксобрассиностероидов и тест-система для его осуществления : пат. 19398 Респ. Беларусь : МПК G01N33/53 (2006.01) / В.А. Хрипач, Р.П. Литвиновская, В.Н. Жабинский, С.В. Драч, А.В. Антончик, **А.Л. Куртикова**, А.Г. Прядко, Т.В. Миранцова, В.Д. Матвеевцев ; дата публ.: 30.12.2013.

*Технические условия:*

37. Набор реагентов для определения 24-эпибрассинолида в медицинских препаратах, биологически активных добавках и физиологических жидкостях методом иммуноферментного анализа. Технические условия ВУ: 100185129.098-2008, изм. №1. – Введ. 21.05.2009. – Минск : Белорус. гос. ин-т стандартизации и сертификации, 2009. – 17 с.
38. Препарат ветеринарный «Бравидефен». Технические условия ВУ: 600049853.267-2015. – Введ. 24.06.2016. – Минск : Белорус. гос. ин-т стандартизации и сертификации, 2016. – 16 с.

*Савчук -*



## РЕЗЮМЕ

Савчук Алина Леонидовна

### **Иммунохимический анализ brassinosterоидов: разработка методологии, синтез аналитических компонентов, прикладные аспекты**

**Ключевые слова:** brassinosterоиды, ИФА, ЛИФМА, гаптены, иммуногены, меченые антигены, фармакокинетика.

**Цель работы:** разработка методологии иммунохимического определения БС в растительных объектах, физиологических жидкостях и brassinosterоидсодержащих препаратах.

**Методы исследования:** ИФА, ЛИФМА, ЯМР-, ИК-, УФ-спектроскопия, ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС, современные методы препаративного органического синтеза.

**Полученные результаты и их новизна:** Впервые получены конъюгаты 28-норкастастерона с БСА и ПХ, которые послужили основой для разработки метода количественного определения 6-оксоБС и иммуноферментной тест-системы для его реализации. Осуществлен первый синтез 6-дезоксо-28-норкастастерона и усовершенствованный синтез других 6-дезоксоБС через соответствующие ксантогенаты. Синтезированы новые конъюгаты 24-эпикастастерона с нитробензофуразаном, флуоресцеином, порфирином и комплексонатом европия в качестве флуоресцентно-меченых антигенов. Разработана тест-система для лантанидного иммунофлуориметрического анализа (ЛИФМА) 24-эпиБС. Разработан экспресс-метод иммуноферментного определения БС, основанный на принципе разделения фаз взаимодействия антигена и меченого антигена с антителами. Впервые обнаружено изменение уровня эндогенных БС в растениях в ответ на стрессовое воздействие. Впервые определены фармакокинетические параметры 24-эпибрассинолида.

**Рекомендации по использованию:** ИФА используется как метод контроля содержания БС в ветпрепарате «Бравидефен» и биологически активной добавке «Фитонол». Разработанные методы количественного определения БС могут использоваться для дальнейшего изучения их роли, метаболизма и распространенности в растительном мире. Флуоресцентно-меченые БС могут использоваться в качестве высокочувствительных сенсоров в аналитических системах и при исследовании взаимодействий фитогормонов в различных биологических средах. Результаты исследования фармакокинетики 24-эпибрассинолида могут быть использованы при разработке медицинских препаратов на его основе.

**Область применения:** органическая и биоорганическая химия, химия природных соединений, агрохимия, медицина.

**РЭЗЮМЭ**

Саўчук Аліна Леанідаўна

**Імунахімічны аналіз брасінастэроідаў: распрацоўка метадалогіі, сінтэз аналітычных кампанентаў, прыкладныя аспекты**

**Ключавыя словы:** брасінастэроіды, ІФА, ЛПФМА, гаптэны, імунагены, мечаныя антыгены, фармакакінэтыка.

**Мэта работы:** распрацоўка метадалогіі імунахімічнага вызначэння БС ў раслінных аб'ектах, фізіялагічных вадкасцях і брасінастэроідзмяшчальных прэпаратах.

**Метады даследавання:** ІФА, ЛПФМА, ЯМР-, ІЧ-, УФ-спектраскапія, ВЭВХ, ВЭВХ-МС, сучасныя метады прэпаратыўнага арганічнага сінтэзу.

**Атрыманыя вынікі і іх навізна:** Упершыню атрыманы кан'югаты 28-норкастэроону з БСА і ПХ, якія паслужылі асновай для распрацоўкі метаду колькаснага вызначэння 6-кетаБС і імунаферментнай тэст-сістэмы для яго рэалізацыі. Ажыццяўлены першы сінтэз 6-дэзокса-28-норкастэроону і ўдасканалены сінтэз іншых 6-дэзоксаБС праз адпаведныя ксантагенаты. Сінтэзаваны новыя кан'югаты 24-эпікастэроону з нітрабензафуразанам, флуарэсцэінам, парфірынам і камплексанатам еўропія у якасці флуарэсцэнтна-мечаных антыгенаў. Распрацавана тэст-сістэма для лантаніднага імунафлуарыметрычнага аналізу (ЛПФМА) 24-эпіБС. Распрацаваны экспрэс-метад імунаферментнага вызначэння БС, заснаваны на прынцеце раздзялення фаз ўзаемадзеяння антыгена і мечанага антыгена з антыцэламі. Упершыню выяўлена змяненне ўзроўню эндагенных БС ў раслінах у адказ на стрэсавае ўздзеянне. Упершыню вызначаны фармакакінэтычныя параметры 24-эпі-брасіналіду.

**Рэкамендацыі па выкарыстанні:** ІФА выкарыстоўваецца як метад кантролю колькасці БС у ветпрэпараце «Бравідэфен» і біялагічна актыўным дадатку «Фітанол». Распрацаваныя метады колькаснага вызначэння БС могуць выкарыстоўвацца для далейшага даследавання іх ролі, метабалізму і распаўсюджанасці ў раслінным свеце. Флуарэсцэнтна-мечаныя БС могуць выкарыстоўвацца ў якасці высокаадчувальных сэнсараў ў аналітычных сістэмах і пры даследаванні ўзаемадзеянняў фітагармонаў ў розных біялагічных асяроддзях. Вынікі даследавання фармакакінэтыкі 24-эпібрасіналіду могуць быць выкарыстаны пры распрацоўцы медыцынскіх прэпаратаў на яго аснове.

**Галіна выкарыстання:** арганічная і біяарганічная хімія, хімія прыродных злучэнняў, аграхімія, медыцына.

## SUMMARY

Sauchuk Alina Leanidauna

### **Immunochemical analysis of brassinosteroids: development of methodology, synthesis of analytic components, applied aspects**

**Key words:** brassinosteroids, ELISA, TR-FIA, haptens, immunogens, labeled antigens, pharmacokinetics.

**The aims of the study:** elaboration of the methodology for immunochemical determination of BS in plants, physiological fluids, brassinosteroid containing preparations.

**Methods of investigation:** ELISA, TR-FIA, NMR-, IR-, UV-spectroscopy, HPLC, HPLC-MS, modern methods of preparative organic synthesis.

**Obtained results and their novelty:** For the first time conjugates 28-norcastasterone with BSA and HRP as components for development of 6-oxoBS quantification method and enzyme immunoassay test system for its realization have been prepared. The first synthesis of 6-deoxo-28-norcastasterone and improved synthesis of other 6-deoxoBS as antigens have been accomplished via corresponding xanthates. New conjugates 24-epicastasterone with nitrobenzofurazan, fluorescein, porphyrin and europium complex as fluorescent labeled antigens have been synthesized. Test system for time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA) of 24-epiBS has been developed. The rapid and sensitive method has been elaborated for BS quantitative determination that is based on the separation of the interaction phases of antigen and labeled antigen with antibodies. For the first time change of the level of endogenous BS in plants in response to stress has been discovered. The first pharmacokinetic studies of 24-epibrassinolide has been carried out.

**Application guidelines:** ELISA is used as a control method of the content BS in veterinary preparation "Bravidefen" and food supplement "Fitonol". The developed methods for the BS quantification can be used for further study of their role, metabolism and natural distribution. Fluorescent labeled BS can be used as high sensitive sensors in analytical systems and in the study of interactions phytohormones in various biological environments. The results of pharmacokinetic studies of 24-epibrassinolide can be used in the development of medical products based on it.

**Fields of application:** organic and bioorganic chemistry, chemistry of natural compounds, agrochemistry, medicine.