



ORIGINAL ARTICLE

Haemolymph of Cold-Adapted Baikal Endemic Amphipods as a Promising Source for Screening of Novel Natural Products

Axenov-Gribanov D.V. ^{1,2*}, Protasov E.S. ¹, Voytsekhovskaya I.V. ¹,
Shatilina Z.M. ^{1,2}, Rzhechitskiy Y.A. ¹, Dimova M.D. ¹, Kostka D.V. ¹,
Lubyaga Y.A. ^{1,2}, Timofeyev M.A. ¹

¹ Institute of Biology at Irkutsk State University, Irkutsk, 3 Lenin str., Russia

² Baikal Research Centre, Irkutsk, 21 Lenin str., Russia

*E-Mail: denis.axengri@gmail.com

Received September 2, 2017

The aim of this study was to assess the possibility to use Baikal endemic amphipods as a source for screening of novel natural products. Analysis of amphipod's *E. verrucosus* hemolymph by HPLC-MS was performed for the first time. A number of natural products with new molecular mass for Baikal endemic macroinvertebrates were found. We found a compound as chrysin by comparison of MS¹, MS² profiles and molecular mass of natural products registered in Dictionary of Natural Products and MZ-cloud databases. Also, we found new compound with mass 493.80277 Da, circulating in the amphipod's hemolymph.

Key words: amphipoda, hemolymph, dereplication, Baikal, natural products

В последние годы возросла потребность общества в новых лекарственных препаратах. Среди ключевых причин необходимости разработки новых препаратов — стремительный рост множественной резистентности микроорганизмов к ранее разработанным и внедренным в медицинскую практику антибиотикам (Jenke-Kodama, Dittman, 2009). Стоит отметить, что проблема антибиотикорезистентности микроорганизмов является одной из важнейших в современной фармацевтике и биомедицине (Laxminarayan *et al.*, 2013). Существует ряд причин развития антибиотикоустойчивости микроорганизмов, которые сводятся к адаптациям генетического аппарата микроорганизмов, происходящим вследствие бесконтрольного применения антибиотиков и лекарственных препаратов (Blair *et al.*, 2015).

В связи с этим, были сформированы ряд глобальных трендов, направленных на ограничение распространения антибиотикорезистентности микроорганизмов (Stadler, Dersch, 2017). Для решения данной задачи требуется комплексный и мультидисциплинарный подход, в т.ч.: (1) профилактика и контроль инфекций, вызванных антибиотикорезистентными патогенами; (2) развитие новых лекарственных препаратов; (3) модификация и усовершенствование современных и новых антибиотиков (Stadler, Dersch, 2017).

Одной из основных задач является разработка новых лекарственных соединений на основе новых источников и биологических ресурсов. Одним из таких уникальных биологических ресурсов выступает экосистема озера Байкал и его обитатели. Байкал представляет собой одну из самых необычных экосистем планеты, как со стороны структурной сложности, эндемизма и таксономического разнообразия населяющей его фауны, так и стороны специфичного (подчас экстремального) характера условий среды, в которых вынуждены обитать представители фауны озера. По своему возрасту (25-30 млн. лет) Байкал существенно отличается от большинства других водоемов, существование которых ограничено не более чем несколькими десятками тысяч лет (Berkin *et al.*, 2009). Фауна

Байкала чрезвычайно разнообразна и широко представлена большим количеством форм и видов. По последним данным, в Байкале описано 2638 видов и подвидов животных (Rusinek *et al.*, 2012). Большинство обитателей озера Байкал эндемики, обладающие специализированными экофизиологическими характеристиками и адаптированные к обитанию в экстремальных условиях: холодной, низкоминерализованной и насыщенной (зачастую перенасыщенной) кислородом среде (Kozhova, Izmet'eva, 1998; Rusinek *et al.*, 2012).

Всю толщу Байкала – от уреза воды до максимальных глубин – населяют эндемичные (в том числе экстремофильные) организмы, формирующие в зонах каждой из глубин свои уникальные сообщества. Доминантными обитателями Байкала, как по составу, так и по численности видов, являются сообщества многочисленных бентосных макробеспозвоночных, в частности - амфипод (Amphipoda, Crustacea).

В то же время, работ, направленных на оценку состава специфических природных соединений, синтезируемых эндемичными амфиподами озера Байкал или входящими в состав их гемолимфы, проведено не было.

MATERIALS AND METHODS

Объектом настоящего исследования были выбраны байкальские эндемичные амфиподы вида *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstf., 1858). Для исследования использовали взрослых особей, которых вылавливали в литоральной зоне озера Байкал (0-1,5 м) в районе пос. Листвянка с использованием гидробиологического сачка.

Данный вид является одним из самых широко распространенных в Байкале и является типичным обитателем литорали, встречается повсеместно под камнями, начиная с глубины в несколько сантиметров до 10-15 м. *E. verrucosus* является фитофагом и имеет зимний период размножения (Bazikalova, 1945).

В рамках данного исследования у амфипод проводили отбор гемолимфы с применением скарификаторов и микрокапилляров. Полученные

образцы гемолимфы смешивали с метанолом в соотношении 1:5. Образцы центрифугировали в течение 3 минут при 14 000 rpm. Далее полученный экстракт анализировали с применением подходов высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Ultimate 3000 (Dionex), сопряженном с масс-спектрометром высокого разрешения LTQ Orbitrap (Thermo Fisher Scientific). Для разделения применяли линейный градиент растворителей (вода : ацетонитрил) от 5% до 95% в течение 18 минут на колонке Acquity UPLC BEH C18, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 100 mm. Детекцию масс в диапазоне 160-2500 Да проводили при положительной ионизации. Поиск и идентификацию соединений проводили с применением базы данных Dictionary of natural products (CRC-press) и базы данных масс-спектров MS² M/Z-Cloud с точностью до 5 ppm и применением алгоритма HighChem HighRes. Для идентификации соединений в качестве источника выделения природных метаболитов указывали источник «ракообразные» и/или «гемолимфа». Анализ каждого образца проведен трехкратно.

RESULTS AND DISCUSSION

Хроматограмма масс соединений, обнаруженных в гемолимфе амфипод *E. verrucosus* представлена на рис. 1.

Согласно материалам, полученным в ходе проводимых работ, в гемолимфе амфипод обнаружено 25 основных пиков (соединений). При этом 10 пиков характеризовались массой, превышающей 2500 Да.

В табл. 1 приведены массы обнаруженных пиков (соединений) и их основные аддукты. Так, согласно крупнейшей базе данных природных соединения – Dictionary of Natural products, объединяющей информацию по более чем 250 000 природных соединений, установлено, что 14 из найденных нами соединений ранее не были обнаружены в ракообразных или гемолимфе иных организмов. Кроме того, выявлено, что в гемолимфе амфипод вида *E. verrucosus* присутствует один пик (соединение), характеризующийся новой массой - 493.80277 Да. Данная масса не зарегистрирована в базе данных Dictionary of natural products.

Природные соединения, выделенные из макробеспозвоночных, зачастую обладают множественной биологической активностью. Так, из краба *Hyas araneus* был выделен пептид, состоящий из 37 аминокислот - Аразин 1, который обладает антимикробным действием (Stensvag et al., 2008). Другим примером пептидов с биологической активностью, являются соединения семейства панеидины (panaeidins), выделенные ранее из гемолимфы креветок *Litopenaeus vannamei* и *Panaeus setiferus*, обладающие как антибактериальной, так и противогрибковой активностью (Destoumieux et al., 1997, 2000), а также нейропептиды пенеустатины (penaeustatins), выделенные из *Panaeus monodon* (Kwok et al., 2006).

Помимо антагонистических эффектов, у ракообразных были обнаружены соединения, обладающие биолюминесцентными свойствами, например – Ципридина билуциферол (cypridina biluciferol), выделенный из остракод *Cypridina* sp. Также, были выделены иммуно- и нейромодуляторы Val(1)-SIF амид и SDRNFLRF амид из лобстера *Homarus americanus* (Christie et al., 2006; Weimann et al., 1993).

В настоящее время в базе данных Dictionary of Natural products зарегистрировано всего 178 соединений, выделенных из различных ракообразных. При этом лишь одно соединение – Эхиненон - Echinone, 3',4'-Дегидро-β,β-каротин-4-ол. 3',4'-Дегидро-4-гидрокси-β-каротин (MM 550.866) - было выделено из байкальского эндемичного вида амфипод *Pallasea cancelloides* (Czeczuga, 1980).

Оценивая схожесть MS¹ и MS² профилей соединений, указанных в табл. 1 и 2, и массу соединения (с аддуктами), было предварительно установлено, что в гемолимфе байкальских эндемичных амфипод *E. verrucosus* может присутствовать соединение Хризин (chrysin, 5,7-Dihydroxyflavone). Стоит отметить, что ранее данное соединение было обнаружено в цветах растений *Passiflora incarnata*, *Oroxylum indicum*, грибах *Pleurotus ostreatus* и сотах пчел. Данное природное соединение обладает выраженной противогрибковой активностью, подавляет рост бактерий *Pseudomonas*

aeruginosa и *Ralstonia solanacearum*. Кроме того, хризин является вазорелаксантом (Duarte *et al.*, 2001). Вероятно, присутствие хризина у

исследованного нами *E. verrucosus* можно объяснить поступлением его вместе с растительной пищей, так как данные амфиподы являются фитофагами.

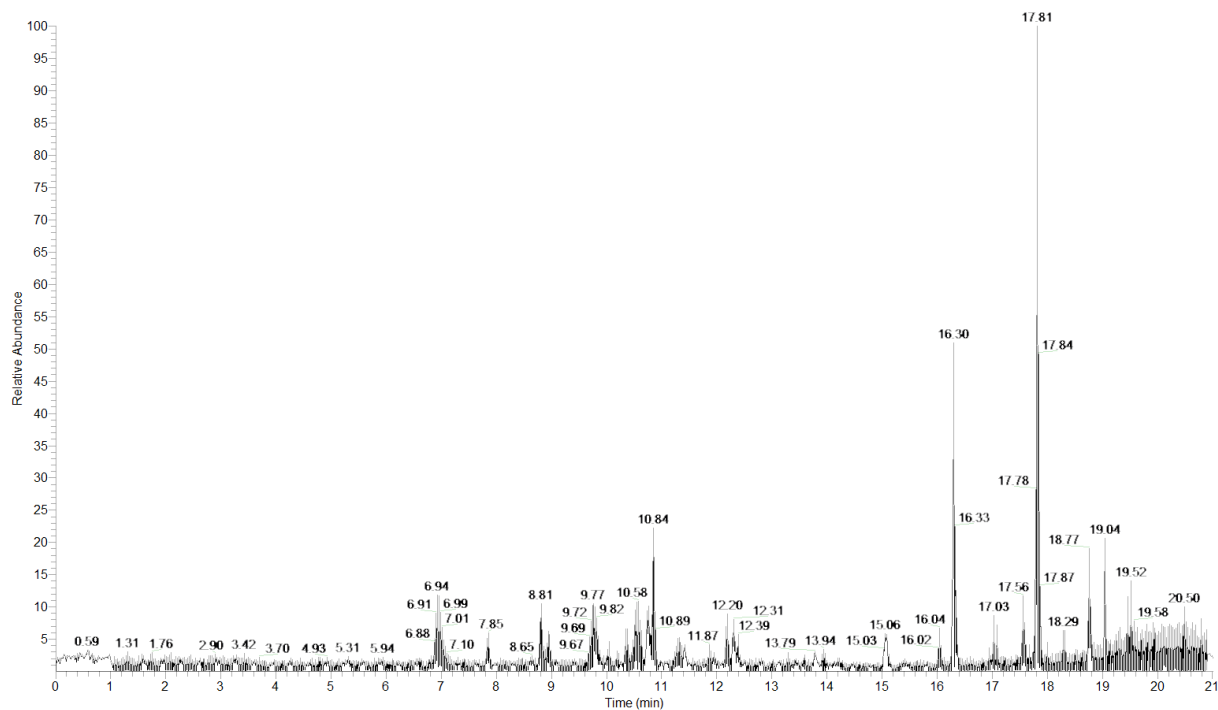


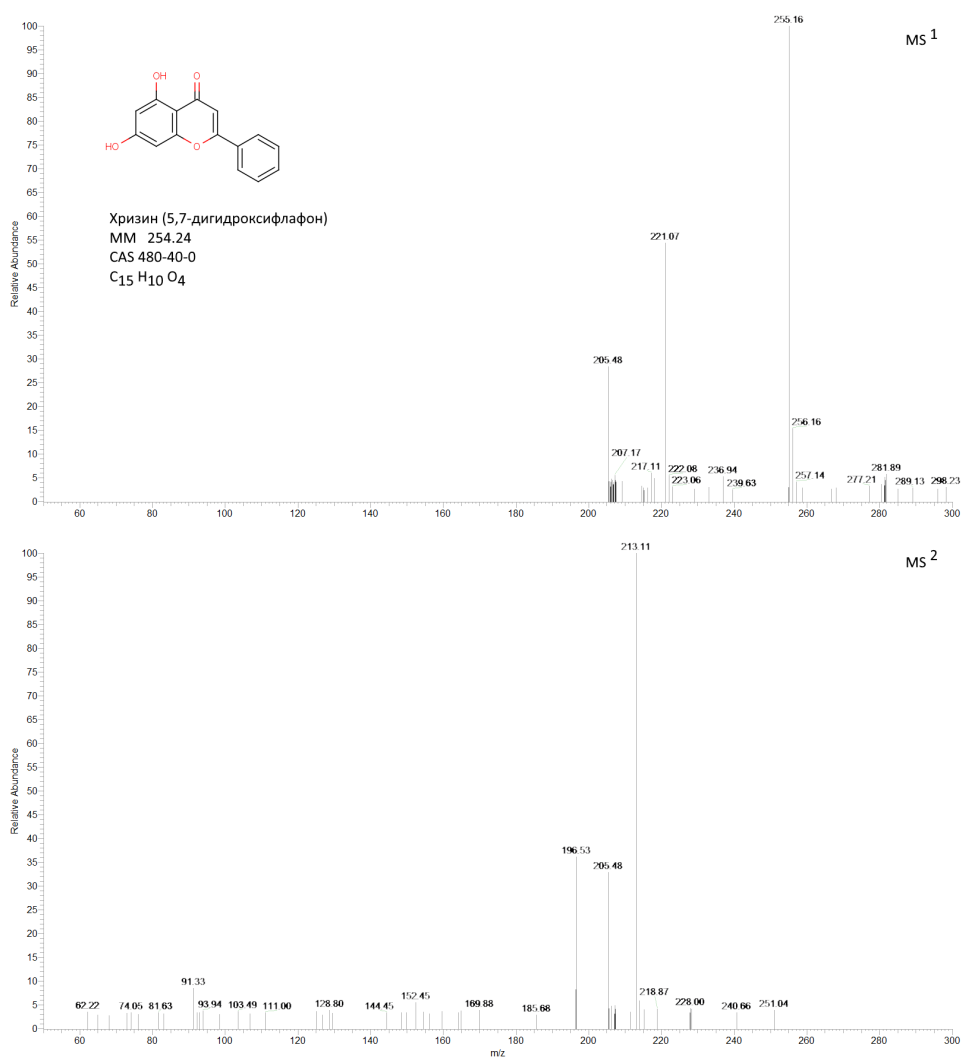
Figure 1. Хроматограмма масс соединений, обнаруженных в гемолимфе амфипод вида *E. verrucosus*.

Table 1. Массы природных соединений и их аддукты, обнаруженные в экстракте гемолимфы вида *E. verrucosus*.

N	Время удержания, мин.	Масса, Да	Обнаруженные аддукты
1	6.82	254.14859	[M+NH ₄]
2	8.87	482.34409	[M+Na], [M+NH ₄]
3	9.79	540.38614	[M+Na], [M+NH ₄]
4	10.55	598.4278	[M+Na], [M+NH ₄]
5	10.84	414.20301	[M+Na], [M+NH ₄]
6	11.32	656.47037	[M+Na], [M+NH ₄]
7	12.79	334.2711	[M+Na]
8	13.77	504.32578	[M+NH ₄]
9	15.06	399.37009	[M+NH ₄]
10	16.3	330.27613	[M+Na], [M+NH ₄]
11	16.79	493.80277	[M+NH ₄]
12	17.84	358.30707	[M+Na], [M+NH ₄]
13	18.09	662.4455	[M+Na]
14	18.77	320.30698	[M+NH ₄]

Table 2. Число возможных природных соединений, обнаруженных в экстракте гемолимфы вида *E. verrucosus*.

N	Масса, Да	Число возможных соединений, выделенных из растений, бактерий и / или грибов	Число возможных соединений, выделенных из ракообразных
1	254.14859 ± 10ppm	110	0
2	482.34409 ± 10ppm	100	0
3	540.38614 ± 10ppm	11	0
4	598.4278 ± 10ppm	17	0
5	414.20301 ± 10ppm	145	0
6	656.47037 ± 10ppm	2	0
7	334.2711 ± 10ppm	27	0
8	504.32578 ± 10ppm	420	0
9	399.37009 ± 10ppm	18	0
10	330.27613 ± 10ppm	34	0
11	493.80277 ± 10ppm	0	0
12	358.30707 ± 10ppm	59	0
13	662.4455 ± 10ppm	17	0
14	320.30698 ± 10ppm	2	0

**Figure 2.** Структурная формула, MS¹ и MS² профили соединения хризин.

Таким образом, в ходе проведённых работ мы показали, что фауна ракообразных озера Байкал является уникальной и неисследованной с точки зрения альтернативных источников поиска новых природных соединений.

ACKNOWLEDGEMENT

Работа выполнена в рамках Госзадания № 6.9654.2017/8.9, а также при частичной финансовой поддержке проектов РФФИ № 16-34-00686, 16-34-00687, 16-34-60060, РНФ № 17-14-01063 и ФГБОУ ВО «ИГУ».

REFERENCES

- Axenov-Gribanov D., Bedulina D., Shatilina Z., Jakob L., Vereshchagina K., Lubyaga Y., Gurkov A., Shchapova E., Luckenbach T., Lucassen M., Sartoris F. J., Pörtner H.-O., Timofeyev M. (2016) Thermal preference ranges correlate with stable signals of universal stress markers in Lake Baikal endemic and Holarctic amphipods. *PLoS one*, **11(10)**, e0164226.
- Bazikalova A.Y. (1945) The amphipods of Lake Baikal. *Proc Baikal Limnological Station* **11**:1–440. – (in Russian)
- Bedulina D., Meyer M. F., Gurkov A., Kondratjeva E., Baduev B., Gusdorf R., Timofeyev M. A. (2017) Intersexual differences of heat shock response between two amphipods (*Eulimnogammarus verrucosus* and *Eulimnogammarus cyaneus*) in Lake Baikal. *PeerJ*, **5**, e2864.
- Berkin N.S., Makarov A.A., and Rusinek O.T. (2009) Bajkalovedenie. – (in Russian)
- Blair J. M., Webber M. A., Baylay A. J., Ogbolu D. O., Piddock L. J. (2015) Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews. Microbiol*, **13(1)**, 42.
- Christie A.E., Stemmler E.A., Peguero B., Messinger D.I., Provencher H. L., Scheerlinck P., Hsu Y.-W.A., Guiney M.E., de la Iglesia H.O., Dickinson P. S. (2006) Identification, physiological actions, and distribution of VYRKPPFNGSIFamide (Val1-SIFamide) in the stomatogastric nervous system of the American lobster *Homarus americanus*. *J Comp Neurol*, **496(3)**, 406-421.
- Czczuga B. (1980) Changes occurring during the annual cycle in the carotenoid content of *Gammarus lacustris* G.O. Sars (Crustacea: Amphipoda) specimens from the river Narew. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **66(4)**, 569-572.
- Destoumieux D., Bulet P., Loew D., Van Dorsselaer A., Rodriguez J., Bachère E. (1997) Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J Biol Chem*, **272(45)**, 28398-28406.
- Destoumieux D., Munoz M., Bulet P., Bachere E. (2000) Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). *Cell mol life sci*, **57(8-9)**, 1260-1271.
- Duarte J., Jiménez R., Villar I. C., Pérez-Vizcaino F., Jiménez J., Tamargo J. (2001) Vasorelaxant effects of the bioflavonoid chrysin in isolated rat aorta. *Planta med*, **67(06)**, 567-569.
- Gerstfeldt G. (1858) Über einige zum Theil neue Arten Platoden, Anneliden, Myriapoden und Crustaceen Sibiriens, namentlich seines östlichen Theiles und des Amur-Gebietes. Buchdruckerei der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften.
- Jakob L., Axenov-Gribanov D.V., Gurkov A. N., Ginzburg M., Bedulina D.S., Timofeyev M.A., Luckenbach T., Lucassen M., Sartoris F.J., Pörtner H.O. (2016) Lake Baikal amphipods under climate change: thermal constraints and ecological consequences. *Ecosphere*, **7(3)**, e01308.
- Jeffery N.W., Yampolsky L., Gregory T.R. (2016) Nuclear DNA content correlates with depth, body size, and diversification rate in amphipod crustaceans from ancient Lake Baikal, Russia. *Genome*, **60(4)**, 303-309.
- Jenke-Kodama H., and Dittmann E. (2009) Bioinformatic perspectives on NRPS/PKS megasynthases: advances and challenges. *Nat prod rep*, **26(7)**, 874-883.
- Kozhova O.M, and Izmet'seva L.R. (1998) Lake Baikal — evolution and biodiversity. Leiden: Backhuys.
- Kwok R., Chan S.M., Tobe S. S. (2006) Crustacean

- bioactive peptides. Handbook of Biologically Active Peptides, 221-228.
- Laxminarayan R., Duse A., Wattal C., Zaidi A. K., Wertheim H.F., Sumpradit N., Greko C. (2013) Antibiotic resistance — the need for global solutions. *Lancet infect dis*, **13(12)**, 1057-1098.
- Rusinek O.T., Takhteev V.V., Gladkochub D.P., Khodzher T.V., Budnev N.M., editors. (2012) Baicalogy. Novosibirsk: Nauka. – (*in Russian*)
- Stadler M., and Dersch P. (2017) How to overcome the antibiotic crisis. Springer international.
- Stensvåg K., Haug T., Sperstad S. V., Rekdal Ø., Indrevoll B., Styrvoid O. B. (2008) Arasin 1, a proline–arginine-rich antimicrobial peptide isolated from the spider crab, *Hyas araneus*. *Dev Com Immunol*, **32(3)**, 275-285.
- Timofeyev M.A. (2016) Monitoring: safeguarding the world's largest lake. *Nature*, **538(7623)**, 41.
- Timoshkin O.A. (2001) Lake Baikal: fauna diversity, problems of its “immiscibility” and origin, ecology and “exotic” communities. In: Timoshkin O.A., editor. Index of animal species inhabiting Lake Baikal and its catchment area. Novosibirsk: Nauka Publishers.
- Weimann J.M., Marder E., Evans B.R.U.C.E., Calabrese R. L. (1993) The effects of SDRNFLRFamide and TNRNFLRFamide on the motor patterns of the stomatogastric ganglion of the crab *Cancer borealis*. *J Exp Biol*, **181(1)**, 1-26.