

СОДЕРЖАНИЕ

Том 47, номер 6, 2021

Статьи журнала по соглашению авторов с компанией Pleiades Publishing, Ltd. публикуются на английском языке в журнале “Russian Journal of Bioorganic Chemistry” ISSN 1068-1620, ©Pleiades Publishing, Ltd.

Азаадамантаны – новый перспективный каркасный блок для медицинской химии и фармакологии (обзорная статья)

Е. В. Суслов, К. Ю. Пономарев, К. П. Волчо, Н. Ф. Салахутдинов 659

Роль окислительного стресса в этиологии болезни Паркинсона. Перспективные терапевтические средства (обзорная статья)

А. В. Лаврова, Н. М. Грецкая, В. В. Безуглов 683

Роль сфингозин-1-фосфата в нейродегенеративных заболеваниях (обзорная статья)

У. А. Гутнер, М. А. Шупик 702

Аmplификация нуклеиновых кислот “катящимся кольцом” – универсальный метод анализа широкого круга биологических мишеней (обзорная статья)

Р. Р. Гарафутдинов, А. Р. Сахабутдинова, А. Р. Гильванов, А. В. Чемерис 721

О происхождении генетически кодируемого синтеза белков (обзорная статья)

С. П. Коваленко 741

Поиск пептидов, специфически связывающихся с корегуляторной мишенью V7-2

Е. А. Колосова, О. Е. Викторина, А. И. Шаповал, Д. Н. Шербаков 762

Использование патентной классификации для поиска биомедицинской информации (дискуссия)

Ю. В. Блохина, А. С. Ильин 768

Детекция белка PRAME на поверхности клеток меланомы с помощью флуоресцентно меченого моноклонального антитела

К. А. Сапожникова, А. В. Мисюрин, Н. Б. Пестов, Е. Г. Мелешкина, С. Д. Орешков, Е. П. Ганжула, А. С. Михайлова, В. А. Коршун, В. А. Мисюрин, В. А. Брылёв 775

Влияние кортизола и тетрагидрокортизола на вторичную структуру аполипопротеина А-I по данным инфракрасной Фурье-спектроскопии

А. Н. Дударев, А. Ю. Городецкая, Т. А. Ткаченко, И. Ф. Усынин 785

Исследование методом молекулярной динамики тимидинфосфорилазы *Escherichia coli* в комплексе с ингибитором 3'-азидотимидином и фосфатом

В. И. Тимофеев, Н. Е. Жухлистова, И. П. Куранова 795

Разработка оптимальной методики замыкания дисульфидной связи в синтезе атозибана – антагониста окситоциновых рецепторов

Д. В. Авдеев, М. В. Овчинников, У. С. Дудкина, А. С. Молокоедов, А. А. Азьмуко, М. Е. Палькеева, М. В. Сидорова 806

Миметики последовательности Arg-Gly-Asp: синтез и исследование антиагрегационных свойств

О. В. Грибовская, В. П. Мартинович, Е. В. Родько, Е. Д. Расюк, Т. В. Рябцева, В. П. Голубович 815

Синтез и оценка психотропной активности каркасных производных альфа-пирролидона

*Ю. Н. Климочкин, И. М. Ткаченко, А. Н. Резников, В. А. Ширяев, М. С. Казачкова,
Н. С. Ковалев, Д. А. Бакулин, Е. Е. Абросимова, Д. В. Куркин, И. Н. Тюренков*

823

ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

Интеркалированные мотивы ДНК с нуклеозидными вставками

*Н. А. Петрунина, В. В. Лебедев, Ю. Г. Кириллова, А. В. Аралов,
А. М. Варижук, М. В. Сардушкин*

837

Влияние длины спейсеров на свойства ДНК-зондов в гибридизационном анализе

*Р. А. Мифтахов, С. А. Лапа, В. Е. Кузнецова, А. М. Золотов, В. А. Василисков,
В. Е. Шершов, С. А. Суржиков, А. С. Заседателев, А. В. Чудинов*

841

Определение химерного транскрипта *NUP98-NSD1* при остром миелоидном лейкозе у детей

А. А. Бессонова, Л. Г. Гукасян, Л. В. Байдун, А. В. Чудинов, Т. В. Наседкина

845

Конформационно-фиксированный 5-бензилиден-4*H*-имидазолтион
как флуорогенный краситель

И. Н. Мяснянко, М. А. Сычева, А. С. Гавриков, Н. С. Балеева, М. С. Баранов

849



УДК 547.897.1/.8

АЗАДАМАНТАНЫ – НОВЫЙ ПЕРСПЕКТИВНЫЙ КАРКАСНЫЙ БЛОК ДЛЯ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ И ФАРМАКОЛОГИИ¹

© 2021 г. Е. В. Суслов*, К. Ю. Пономарев*, К. П. Волчо*., Н. Ф. Салахутдинов*

*ФГБУН Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН,
Россия, 630090 Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 9

Поступила в редакцию 25.02.2021 г.

После доработки 10.03.2021 г.

Принята к публикации 14.03.2021 г.

Азаадамантаны – азотистые аналоги адамантана, у которых один или несколько атомов углерода замещены на азот. Подобное строение приводит к появлению ряда специфических свойств, как химических, так и физических, и обуславливает широкий спектр полезных качеств этих соединений. Производные азаадамантанов обладают меньшей липофильностью по сравнению с адамантановыми аналогами, что влияет, в частности, на их взаимодействие с биологическими мишенями и биодоступность. Значительный рост числа публикаций, посвященных изучению реакционной способности и биологической активности азаадамантанов и их производных, произошедший за последнее десятилетие (2009–2020 гг.), говорит о большом теоретическом и практическом интересе к ним. Среди производных азаадамантанов уже обнаружены соединения, обладающие выраженной биологической активностью, включая противовирусную, антибактериальную, фунгицидную, противоопухолевую, анальгетическую, ингибиторную (в отношении разных ферментов) и др. В настоящем обзоре представлены основные методы синтеза ди- и триазаадамантанов с узловым расположением атомов азота; систематизированы и обсуждены накопленные в мировой литературе данные по результатам исследований биологической активности азаадамантанов и их производных. Обсуждены перспективы использования азаадамантанов в области медицинской химии и фармакологии.

Ключевые слова: диазаадамантаны, триазаадамантаны, каркасные соединения, медицинская химия, фармакология, биологическая активность, противовирусная активность, антимикробная активность, противоопухолевая активность

DOI: 10.31857/S0132342321060233

ВВЕДЕНИЕ

Азаадамантанами называют азотистые аналоги адамантана, у которых один или несколько атомов углерода замещены на азот (рис. 1). Эти соединения известны еще с 50-х гг. прошлого столетия [1, 2], однако систематическое исследование биологической активности азаадамантанов и их производных началось относительно недавно, и основные успехи были достигнуты в последние 20 лет. Частичное замещение атомов углерода на азот заметно изменяет и химические, и физические

свойства, приводя, например, к более высокой растворимости в воде азаадамантанов по сравнению с адамантанами. Наличие у азаадамантанов разнообразной биологической активности [3–10] в сочетании с умеренной токсичностью и возможность синтеза различными путями из доступных реагентов делает их привлекательными для использования в качестве базового блока в дизайне новых биологически активных соединений.

Некоторые производные диазаадамантана были обнаружены в природе, например, алкалоиды акосмин (acosmine) и его ацетат, панакосмин (panacosmine), которые были выделены из экстракта семян *Acosmium panamense*, дасикарпумин (dasycarpumine), выделенный из экстракта *Acosmium dasycarpum* [9]. Акосмин, как и его производное бовдихин (bowdichine), являющийся сложным эфиром 3,4,5-триметоксибензойной кислоты, были получены из коры стебля *Bowdichia virgilioides* [9]. Отметим, что в настоящее время биологическая роль этих соединений не ясна, и их биологическая активность не изучалась.

¹ Статья победителей конкурса РФФИ “Экспансия”, 2020 г. (грант № 20-13-50251).

Сокращения: МПД – максимально переносимая доза; МПК – минимальная подавляющая концентрация; ТРО – торможение роста опухоли; CC_{50} – концентрация, вызывающая гибель 50% клеток; ED_{50} – средняя доза вещества, которая обеспечивает требуемый результат у половины единиц экспериментальной системы; IC_{50} – концентрация полумаксимального ингибирования; LD_{50} – средняя доза вещества, вызывающая гибель половины членов испытываемой группы; LD_{100} – средняя доза вещества, вызывающая гибель всех членов испытываемой группы; SI – индекс селективности.

Автор для связи: (тел: +7 (383) 330-88-70; эл. почта: volcho@nioch.nsc.ru).

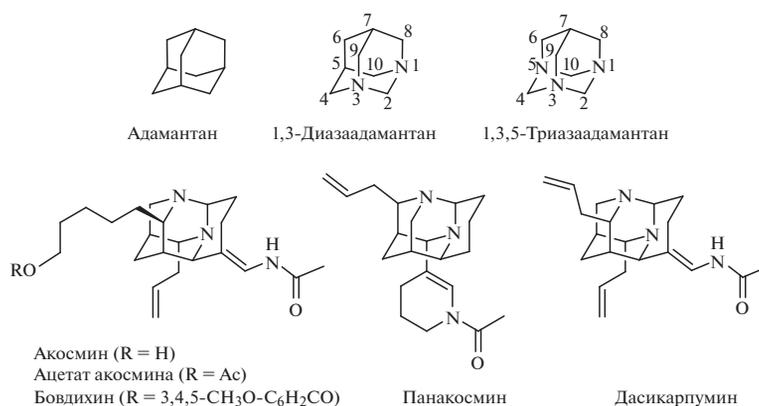


Рис. 1. Примеры структур азаадамантанов. Некоторые природные производные диазаадамантанов [9].

В первом разделе настоящего обзора приведена краткая информация по основным методам синтеза ди- и триазаадамантанов с узловым расположением атомов азота. Далее впервые систематизированы накопленные в мировой литературе данные по результатам исследований биологической активности указанных типов азаадамантанов. Обзор структурирован в соответствии с типом проявляемой азаадамантанами биологической активности.

МЕТОДЫ СИНТЕЗА АЗААДАМАНТАНОВ

Методы синтеза азаадамантанов достаточно подробно рассмотрены в работах [3, 4, 11, 12]. В данном обзоре, для удобства читателей, мы приводим наиболее широко применяющиеся подходы к синтезу 1,3-диазаадамантанов и 1,3,5-триазаадамантанов, остовы которых наиболее часто встречаются в биологически активных производных азаадамантанов. Обычно для синтеза азаадамантанов используют методы, основанные на конденсации ациклических или моноциклических соединений с последующим замыканием трех циклов гетероадамантановой структуры в одну стадию.

Получение 1,3-диазаадамантана и его производных. Часто применяемый метод, позволяющий получать с хорошими выходами азаадамантаны,

содержащие два атома азота в узловых положениях, — конденсация различных кетонов с уротропином (гексаметилентетрамином), включающая несколько последовательных реакций Манниха (схема 1) [11]. В качестве карбонильной компоненты могут использоваться и ароматические, и алифатические кетоны. С применением этого подхода могут быть синтезированы диазаадамантаны, содержащие как симметричные, так и несимметричные заместители в 5-м и 7-м положениях гетероадамантановой структуры. Кетогруппа в 6-м положении диазаадамантанового остова может быть восстановлена до гидроксильной [13] или метиленовой группы [14] или превращена в другую функциональную группу [15] классическими методами органического синтеза, используемыми для модификации кетонов. Аминая метиленовая группа во 2-м положении диазаадамантана может быть относительно легко замещена на другой фрагмент раскрытием диазаадамантанового цикла под действием различных реагентов [16, 17], обычно уксусного ангидрида, с образованием соответствующего биспидина, который затем может быть превращен обратно в диазаадамантан под действием различных конденсирующих агентов, таких как кетоны, альдегиды, диалогениды и т.п.

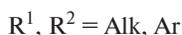
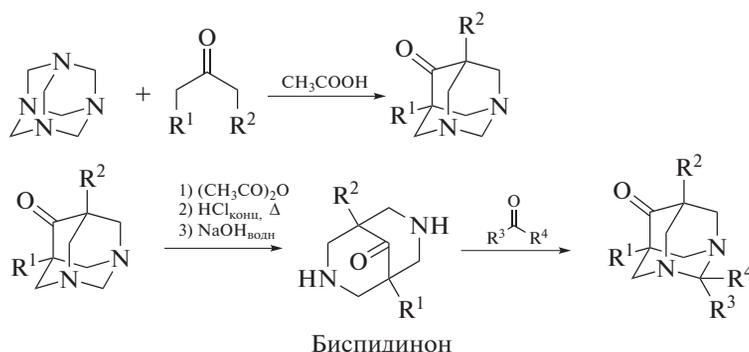
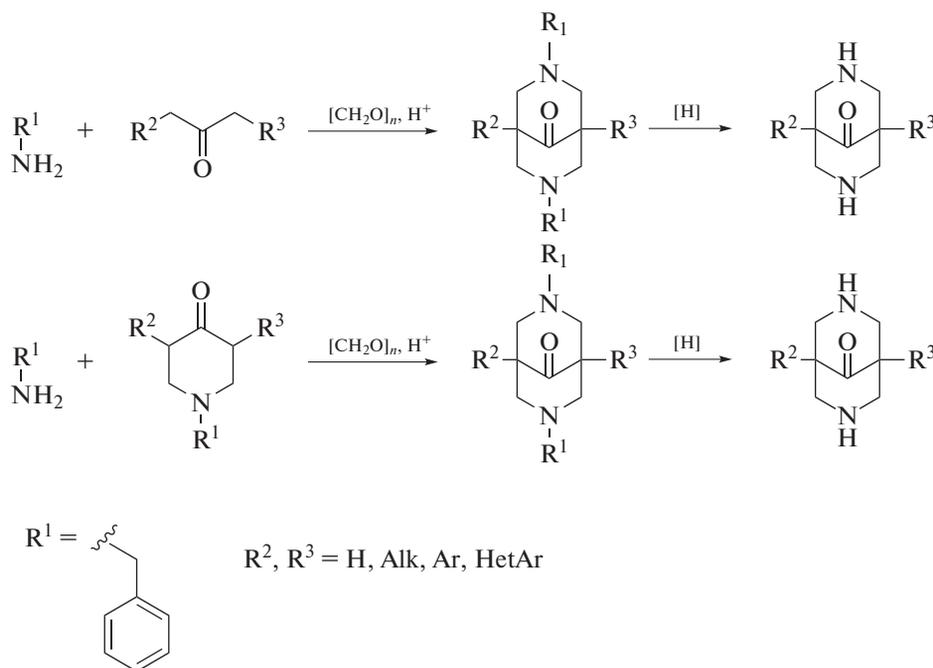


Схема 1. Синтез 1,3-диазаадамантанов конденсацией кетонов с уротропином и получение их 2-замещенных производных [11].

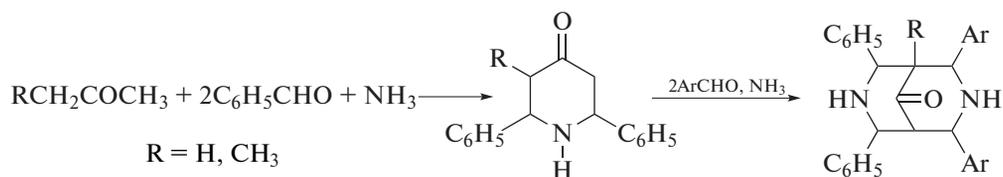
Одним из распространенных методов синтеза биспидинов, помимо раскрытия диазаадамантанового остова (схема 1), является взаимодействие аминов и кетонов с формальдегидом в кислых условиях по реакции Манниха (схема 2) [18, 19].

Однако при этом стоит учесть, что азотсодержащая компонента должна включать хорошо уходящую защитную группу, например, бензильную, для получения в последующем *N,N*-незамещенного биспидина.

**Схема 2.** Синтез биспидинов взаимодействием аминов и кетонов с формальдегидом [18, 19].

Еще одна модификация реакции Манниха для синтеза биспидинов – использование в качестве азотсодержащей компоненты аммиака или ацетата аммония, а вместо формальдегида – ароматических альдегидов (схема 3) [20–25]. При этом

происходит образование в качестве промежуточных продуктов различных замещенных пиперидонов. Полученные таким образом биспидиноны могут быть превращены в соответствующие диазаадамантаны, как показано на схеме 1.

**Схема 3.** Синтез биспидинов взаимодействием аммиака с кетонами и ароматическими альдегидами [20–25].

Получение 1,3,5-триазаадамантана и его производных. Наиболее часто для синтеза производных 1,3,5-триазаадамантанов (1) применя-

ется методика, основанная на получении триаминов (2) из *трис*(оксиметил)метана и его гомологов через синтез и восстановление соот-

ветствующих триазидов с последующим взаимодействием полученного триамина с различ-

ными соединениями, содержащими карбонильную группу (схема 4) [26].

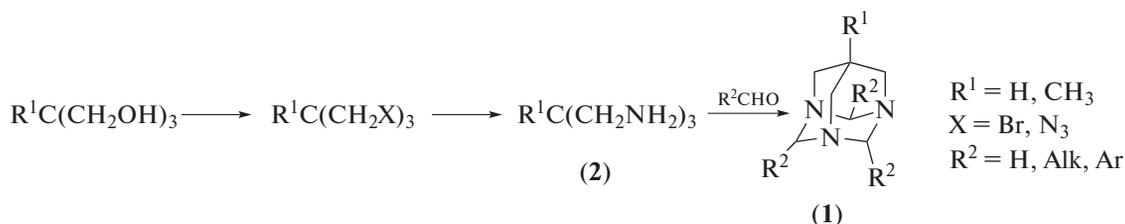


Схема 4. Синтез 1,3,5-триазаадамантанов из *трис*(оксиметил)метана и его гомологов [26].

Производные 1,3,5-триазаадамантана с различными функциональными группами в 7-м положении гетероадамантановой структуры могут быть получены на основе 7-нитро-1,3,5-триазаадамантана (3), который, в свою очередь, синтезируют конденсацией нитрометана с гексаметилентетрамином в присутствии уксусной кислоты [27] (схема 5). Для последующей модификации нитрогруппы применяют классические методы органической химии.

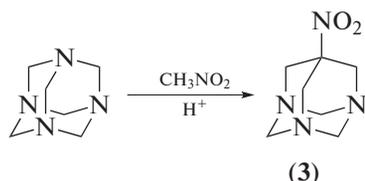


Схема 5. Синтез 7-нитро-1,3,5-триазаадамантана [27].

Имеющиеся методы синтеза производных ди- и триазаадамантанов, в особенности основанные на конденсации гексаметилентетрамина с карбонильными и нитросоединениями, делают эти азаадамантаны доступными для изучения и использования в синтезе других производных азаадамантанов.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АЗААДАМАНТАНОВ

Противовирусная активность. Одними из первых противовирусных лекарств против вируса гриппа были амантадин и римантадин (рис. 2). Их противовирусный эффект связан с блокированием ионных M2-каналов вируса, предотвращаю-

щим его проникновение в клетку [28]. Однако в настоящее время практически все эпидемически важные штаммы вируса гриппа выработали резистентность к этим лекарствам [29]. Введение двух атомов азота и двух метильных групп при переходе к соединению (4) (рис. 2) позволило частично преодолеть устойчивость к римантадину штамма вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09, повысив индекс селективности SI (отношение концентрации, вызывающей гибель 50% клеток (CC_{50}), к концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}), $SI = CC_{50}/IC_{50}$) до 13, в сравнении с $SI = 5$ для римантадина [30]. Присоединение к аминодиазаадамантану (4) фрагмента монотерпеноида цитронеллала с последующим восстановлением привело к образованию амина (5), продемонстрировавшего высокий $SI = 30$ и $IC_{50} = 8$ мкМ [31]. Введение остатка цитронеллала в 1- или 2-аминоадамантаны, не содержащие узловых атомов азота (соединения (6) и (7)), также увеличивало активность в отношении вируса гриппа, но менее существенно (SI увеличился до 22) [32]. На основании результатов компьютерного моделирования было сделано предположение [30], что диазаадамантан (5) может связываться с белковым каналом M2, хотя нельзя исключить его воздействие и на другие молекулярные мишени.

Среди производных триазаадамантана наличие выраженной противовирусной активности было показано для 7-нитро-1,3,5-триазаадамантана (3) (схема 5) в отношении вируса гриппа А штамма Фрунзе в концентрации 1 мкМ, его солянокислой соли в отношении вирусов герпеса 1С и 9С в концентрации 100 мкМ, а также для 7-бром-

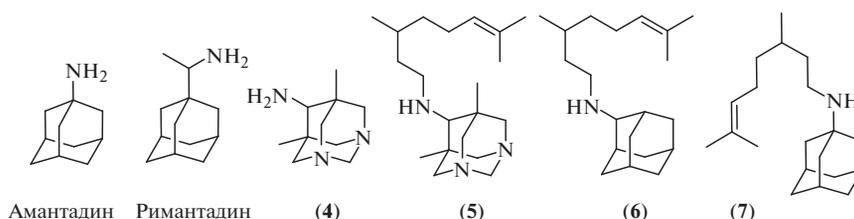


Рис. 2. Аминоадамантаны и аминодиазаадамантаны, обладающие противовирусной активностью [30–32].

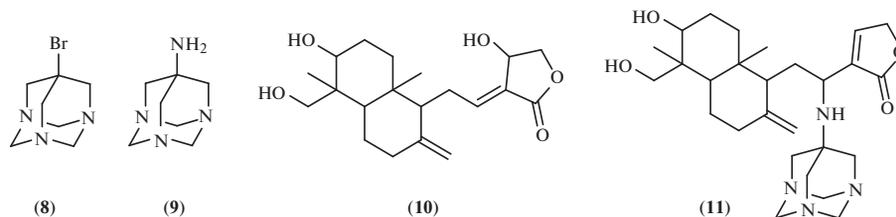


Рис. 3. 7-Замещенные-1,3,5-триазаадамантаны, обладающие противовирусной активностью.

и 7-амино-1,3,5-триазаадамантанов (8) и (9) (рис. 3) в отношении вируса болезни Ньюкасла в концентрации 0.125 мкМ [16].

В рамках работы, направленной на синтез и исследование биологической активности новых производных природного дитерпеноида андрографолида (10) (рис. 3), обладающего широким спектром биологической активности [33, 34], было обнаружено, что соединение (11), сочетающее фрагменты 7-амино-1,3,5-триазаадамантана и андрографолида, в концентрации 1 мкг/мл ингибирует репликацию различных вирусов, включая коронавирус SARS (штамм Urbani), энтеровирус-71 (штамм Tainan/4643/98) и вирус лихорадки Рифт-Валли (штамм MP-12) [35]. В более высокой концентрации (50 мкг/мл) соединение (11) было эффективно в отношении вирусов гриппа А (H1N1/09), гепатита А (pHM175), гепатита В (02094), гепатита С (CON1), простого герпеса (тип 2), папилломы человека (тип 8), ВИЧ-1 (группа М), лихорадки Денге (тип 2, Новая Гвинея С), японского энцефалита (SA14/V1) и конского энцефалита венесуэльского происхождения (ТС-83).

Таким образом, можно заключить, что хотя сами ди- и триазаадамантаны проявляют лишь умеренную ингибирующую активность в отношении ряда вирусов, их присоединение к другим биологически активным соединениям может значительно усилить потенциал последних.

Антимикробная активность. Большое внимание было уделено изучению антимикробной активности производных азаадамантанов, наиболее значительный вклад был внесен исследователями из Армении. В 1986 г. ими была опубликована работа, включающая данные по синтезу 2-замещенных 5,7-диметил-1,3-диазаадамантанов, содержащих алифатические, ароматические, гетероароматические, гетероциклические, спироциклические заместители, а также моносахариды, исходя из 1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-она (12) и разнообразных альдегидов и кетонов [36]. На модели генерализованной стафилококковой инфекции белых мышей, вызванной *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* штамм 4-О), была исследована антибактериальная активность соединений (13–19) (рис. 4).

Наибольшую активность проявили соединения, содержащие фрагменты пиридина (15) и 2,2-диметилтетрагидропирана (16), которые продлевали жизнь зараженных животных на 20–30% при однократном введении в дозах 800 и 1500 мг/кг соответственно. Остальные изученные производные диазаадамантана не увеличивали продолжительность жизни зараженных животных по сравнению с контролем. Показано, что эти производные диазаадамантанов малотоксичны и хорошо переносятся животными при однократном введении в дозах 1500–2000 мг/кг.

В 2008 г. были представлены результаты изучения антибактериальной активности большого набора 2-замещенных диазаадамантанов, включающего различные производные, содержащие метильные, этильные, изопропильные заместители в положениях 5 и 7 молекулы диазаадамантана, а также метиленовую, карбонильную и спиртовую группу в 6-м положении каркаса. В качестве заместителей по 2-му положению использовали разнообразные ароматические и ге-

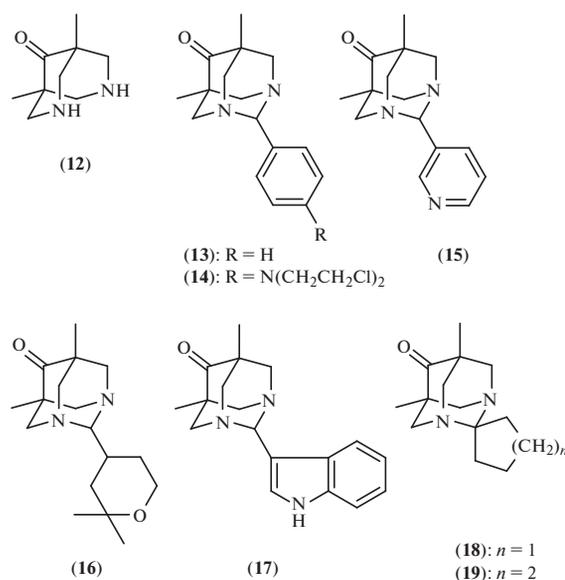


Рис. 4. 1,5-Диметилбиспидин-9-он и полученные из него 2-замещенные 5,7-диметил-1,3-диазаадамантан-6-оны, изученные на наличие антибактериальной активности [36].

тероароматические фрагменты (схема 6) [37]. Кроме того, исследовали активность и ранее

описанного 6-амино-5,7-диметил-1,3-дизаадамантана (4).

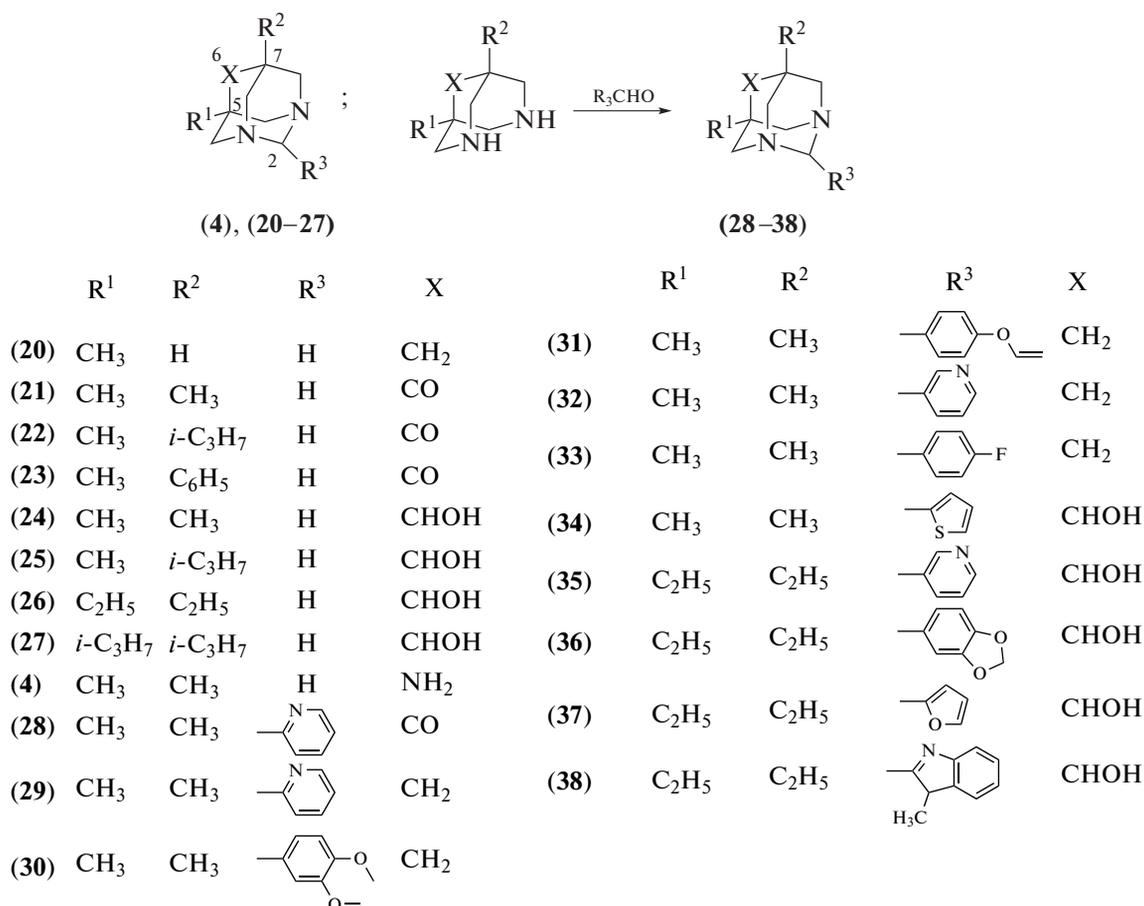


Схема 6. 5,7-Диалкилдизаадамантаны и синтез их 2-арилзамещенных производных [37].

Антибактериальная активность соединений была изучена агар-диффузионным методом в отношении грамположительных стафилококков (*S. aureus* 209p, *S. aureus* 1, *S. aureus* Makarov, *S. aureus* 34, *S. aureus* 118) и грамотрицательных бактерий (*Shigella dysenteriae* Flexneri (*Sh. dysent. Flexneri*), *Salmonella enterica* серовар *Typhimurium* (*E. typhi*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Proteus* (*Prot.*). Испытуемые соединения наносили в дозе 4 мг, определяя диаметр зон отсутствия роста микроорганизмов в месте нанесения соединений (в мм) после суточного выращивания микроорганизмов. Активность считали высокой, если зона подавления роста была >20 мм, промежуточной – при зоне 15–20 мм (табл. 1).

Наиболее эффективными соединениями против грамположительных, и грамотрицательных микроорганизмов оказались 5,7-диметил-1,3-дизаадамантан (20) и его 2-пиридилзамещенный аналог (29). Эти соединения оказались более эффективными, чем сульфадимезин, но менее эффективными, чем норсульфазол, использованные в качестве препаратов сравнения. Введение в

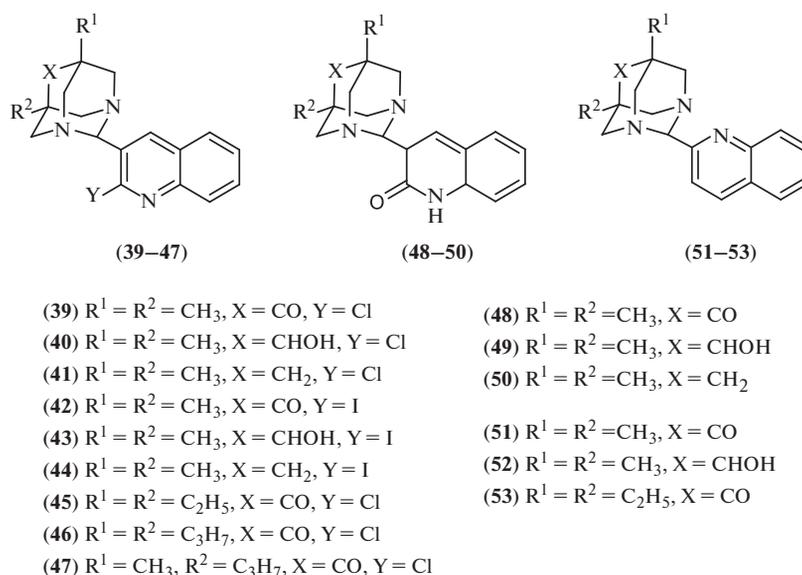
6-е положение карбонильной, гидроксильной или аминной групп (соединения (4), (20–27)), а также пиридил-3- (32), (35) или фурильной групп (37) в положение 2 приводило к снижению антибактериальной активности соединений. При введении во 2-е положение ароматических (соединения (30), (31), (33), (36)), тиенильной (34) или индольной (38) групп наблюдалось исчезновение антибактериальных свойств.

Позже были представлены результаты исследования активности различных хинолинов (39–53) (рис. 5), содержащих дизаадамантановый фрагмент с метильными, этильными и пропиловыми заместителями в 5-м и 7-м положениях, а также карбонильную, спиртовую или метиленовую группу в 6-м положении каркасной структуры, в отношении грамположительных (*S. aureus* 209p) и грамотрицательных (*Sh. dysent. Flexneri* 6858, *E. coli* 0-55) бактерий [38]. Антибактериальная активность определяли так же, как и в работе Arutyunyan et al. [37], в качестве положительного контроля использовали 5-нитро-8-гидроксихинолин. Слабую антибактериальную активность (d = 10–13 мм) в от-

Таблица 1. Антибактериальная активность соединений (4), (20–27), (29), (32), (35) и (37) [37]

Соединение	Диаметр зоны отсутствия роста, мм					
	грамположительные бактерии		грамотрицательные бактерии			
	<i>S. aureus</i> 209p	<i>S. aureus</i> 1	<i>Sh. dysent.</i> <i>Flexneri</i> 6858	<i>E. typhi</i> 79	<i>E. coli</i> 0-55	<i>Prot.</i>
(4)	9	7	7	7	–	–
(20)	22	13	13	15	18	14
(21)	5	5	5	6	–	–
(22)	5	5	13	15	7	10
(23)	0	0	7	7	–	–
(24)	5	6	5	6	–	–
(25)	6	0	0	6	–	–
(26)	10	10	10	15	15	11
(27)	7	7	7	10	–	–
(29)	22	20	18	22	15	13
(32)	10	10	13	14	10	5
(35)	9	13	6	8	–	–
(37)	9	7	9	10	–	–
Норсульфазол	30	30	20	30	–	–
Сульфадимезин	14	14	0	0	–	–

Примечание: прочерк означает отсутствие активности. Соединения (28), (30), (31), (33), (34), (36) и (38) не проявили активности в отношении изучаемых бактерий.

**Рис. 5.** 2-Хинолинзамещенные 1,3-дизаадамантаны, изученные на наличие антибактериальной активности [37].

ношении всех исследуемых видов бактерий проявили соединения (40, 41, 43, 44, 49–53), которые были значительно менее активными, чем нитрохинолин ($d = 20–28$ мм). Остальные соединения не продемонстрировали антибактериальных свойств.

Была изучена антибактериальная активность азометинов (54–66) (схема 7), взятых в виде дигидрохлоридов [39]. Антибактериальные свойства исследовали с использованием диффузии в агаре и методом серийных разведений в отношении грамположительных (*S. aureus* 209p, *S. aureus* 1) и грамотрицательных (*Sh. dysent.*

Flexneri 6858, *E. coli* 0-55) бактерий. Испытуемые соединения использовали в дозе 5 мг, помещали на чашки Петри, измеряли диаметр зон отсутствия роста микроорганизмов после инкубации в течение 20–24 ч, как и в работах [37, 38]. Для наиболее активных соединений в тестах с серийными разведениями определяли минимальную подавляющую концентрацию (МПК) для *S. aureus* 209p и *Sh. dysent. Flexneri* 6858. В качестве положительного контроля использовали фуразолидон.

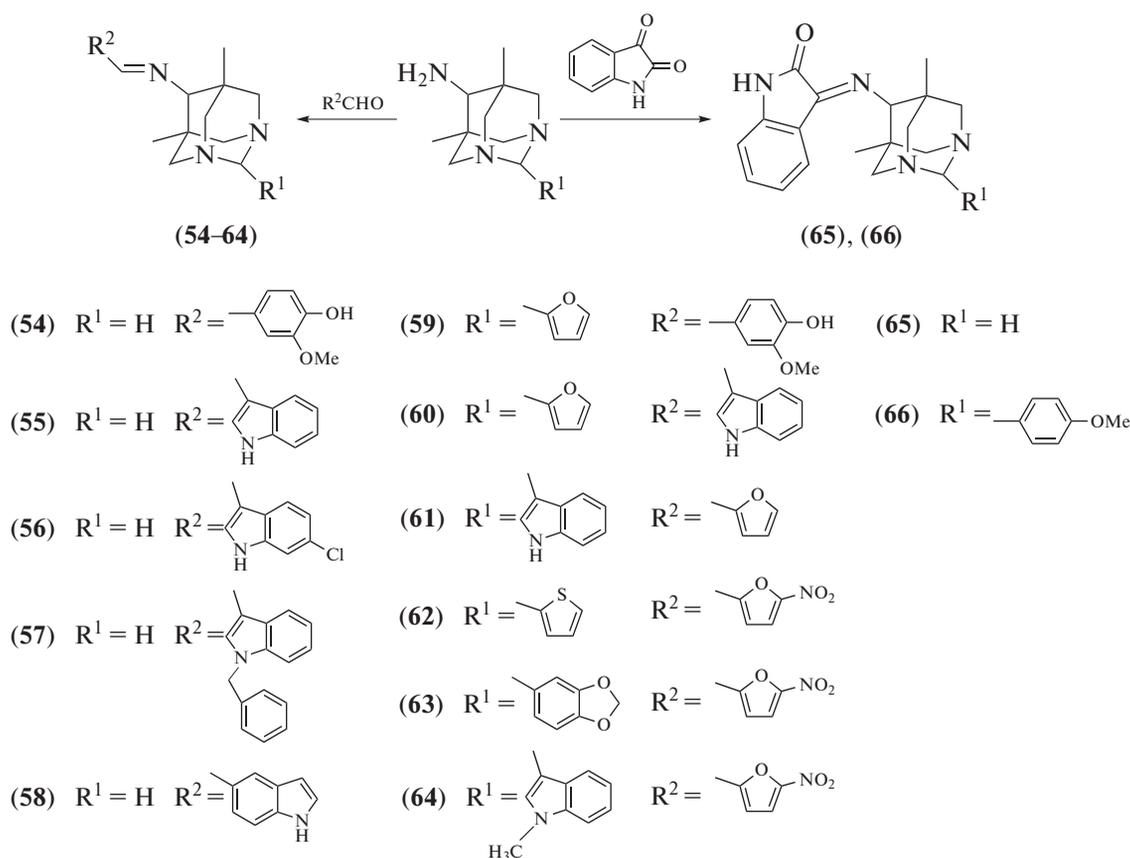


Схема 7. 6-Аминодиазаадамантаны и синтез их азометиновых производных [39].

Все изученные солянокислые азометины, за исключением соединений (55) и (61), обладали антибактериальной активностью (табл. 2). Дигидрохлориды (62–64), содержащие нитрофурильные группы, проявили наибольшую бактериостатическую активность. Они оказывали сопоставимое воздействие на грамположительные и грамотрицательные бактерии и были, как правило, более активными, чем фуразолидон. Дигидрохлориды (57) и (60) с индольными группами были эффективны в отношении грамотрицательных бактерий. МПК для гидрохлоридов (57), (60), (62–64) составила 125–250 мкг/мл, что значи-

тельно выше, чем у препарата сравнения фуразолидона (МПК = 31 мкг/мл).

Антимикробная активность ряда 4,8,9,10-тетрафенил-1,3-диазаадамантанов (67–72) (рис. 6) в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, спорообразующих бактерий, дрожжеподобных грибов и грибов дерматофитов (*Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *Bacillus anthracis*, *S. aureus*, *Bacteria carativorum*, *Corynebacterium*, *E. coli*; *Saccharomyces cerevisiae*, *Sarcina lutea*, *Epidermophyton rubrum*, *Trichophyton gypseum*, *Fusarium aolani* и *Candida albicans*) была изучена Байсалбаевой с соавт. методом серийных разведе-

Таблица 2. Антибактериальная активность соединений (54), (56–60) и (62–66) [39]

Соединение	Диаметр зоны отсутствия роста, мм (МПК, мг/мл)			
	грамположительные бактерии		грамотрицательные бактерии	
	<i>S. aureus</i> 209p	<i>S. aureus</i> 1	<i>Sh. dysent.</i> <i>Flexneri</i> 6858	<i>E. coli</i> 0-55
(54)	14	14	15	13
(56)	13	13	15	13
(57)	18	19	30 (125)	28
(58)	14	14	15	15
(59)	0	0	15	15
(60)	18	18	32 (125)	28
(62)	30 (125)	27	25 (250)	23
(63)	32 (125)	28	27 (250)	24
(64)	29 (125)	25	23 (250)	23
(65)	14	14	14	12
(66)	15	14	15	15
Фуразолидон	25 (31)	24	24 (31)	23

Примечание: соединения (55) и (61) не проявили активности в отношении изучаемых бактерий.

ний на питательной среде [40]. Активность соединений оценивали по минимальной бактериостатической или микостатической концентрации (мкг/мл).

Среди исследованных соединений значительную активность проявили диазаадамантаны (67) и (71) в отношении грамположительных бактерий *Corynebacterium* (МПК = 7.4 и 0.27 мкг/мл соответственно) и соединение (68) в отношении *Sarcina lutea* (МПК = 0.5 мкг/мл). Остальные соединения были менее активными (МПК = 14–67 мкг/мл). Данных об использовании препарата сравнения в статье не приводится.

Антибактериальная активность 4,8,9,10-тетраарил-1,3-диазаадамантанов (73–95), содержащих различные заместители в ароматическом кольце, а также ранее упомянутых соединений (67), (68) и (71), имеющих незамещенные фенильные фрагменты, в отношении бактерий *B. subtilis*, *S. aureus* и

E. coli была изучена Valaji et al. [41] (рис. 7, табл. 3). Исследование проводили методом диффузии в агаре с использованием микробного инокулянта, содержащего 10^6 кл./мл. В качестве контроля был выбран стрептомицин. Авторы определили МПК (табл. 3).

Диазаадамантаны (80), (85), (87), (88) и (93) показали высокую активность против бактерий *B. subtilis* (МПК = 6.25–12.5 мкг/мл), соединения (68), (71), (81), (83), (85) и (88) были активны в отношении *S. aureus* (МПК = 6.25–12.5 мкг/мл), а соединения (82) и (95) – в отношении *E. coli* (МПК = 12.5 и 6.25 мкг/мл соответственно). В остальных случаях соединения подавляли рост бактерий в концентрации 25–100 мкг/мл или не подавляли вовсе. Препарат сравнения, стрептомицин, подавлял рост бактерий *B. subtilis* и *S. aureus* в концентрации 12.5 мкг/мл, а бактерий *E. coli* – 6.25 мкг/мл. В целом фтор-, хлор-, бром- или алкоксизамещенные арилдиазоадамантаны оказывали

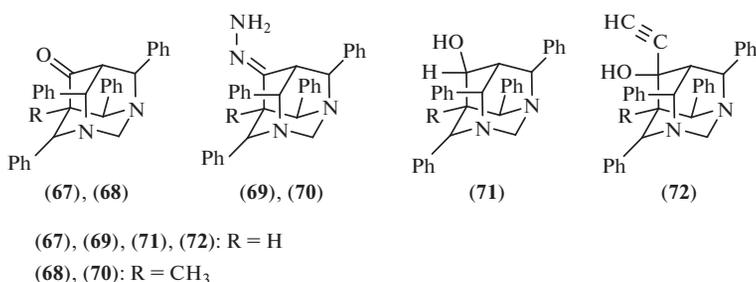


Рис. 6. 4,8,9,10-Тетрафенил-1,3-диазаадамантаны, изученные на наличие антимикробной активности [40].

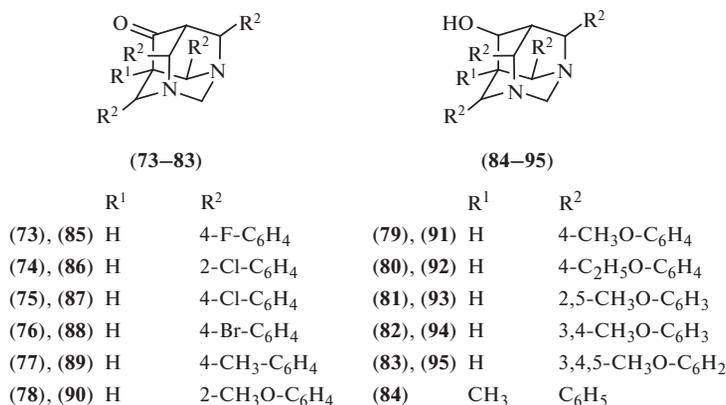


Рис. 7. 4,8,9,10-Тетраарил-1,3-дизаадамантаны, изученные на наличие антибактериальной активности [41].

лись более активными в сравнении с незамещенными по ароматическому фрагменту соединениями [41].

Изучению бактерио- и микостатического действия 7-замещенных 1,3,5-триазаадамантанов было уделено значительно меньше внимания. Первые данные были получены в 70-х гг. прошлого столетия Hodge et al. [42] для 7-нитро- (3), 7-амино- (9) и 7-гидроксиламино- (96) 1,3,5-триазаадамантанов (рис. 8). Соединения (3) и (9) при использовании метода штрихов проявили фунгистатирующее действие в отношении грибов вида

Fusarium oxysporum только в высокой концентрации (500–1000 мкг/мл). Триазаадамантанамин (9) в тех же концентрациях был активен и в отношении *Aspergillus fumigatus*. Соединение (96) оказалось активным в отношении *S. aureus* и *Pasteurella pseudotuberculosis* (МПК = 250–500 мкг/мл), *Streptococcus fecalis* (МПК = 500–750 мкг/мл), а также *Streptococcus hemolyticus* и *Sh. dysent* (МПК = 500–1000 мкг/мл). Данных об использовании препарата сравнения в работе не приводится.

Антибактериальная активность производных 7-амино-триазаадамантана, содержащих наф-

Таблица 3. Антибактериальная активность соединений (67), (68), (71), (80–83), (85), (87), (88), (93) и (95) [41]

Соединение	МПК, мкг/мл		
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
(67)	50	–	25
(68)	–	12.5	–
(71)	12.5	12.5	100
(80)	12.5	–	100
(81)	50	12.5	50
(82)	50	50	12.5
(83)	50	12.5	50
(85)	6.25	6.25	100
(87)	6.25	50	50
(88)	6.25	6.25	–
(93)	6.25	–	50
(95)	50	–	6.25
Стрептомицин	12.5	12.5	6.25

Примечание: прочерк означает отсутствие активности. Соединения (72–79), (84), (86), (89–92) и (94) проявили низкую (МПК > 50 мкг/мл) антибактериальную активность в отношении всех трех видов бактерий или не проявили активности в отношении изучаемых бактерий.

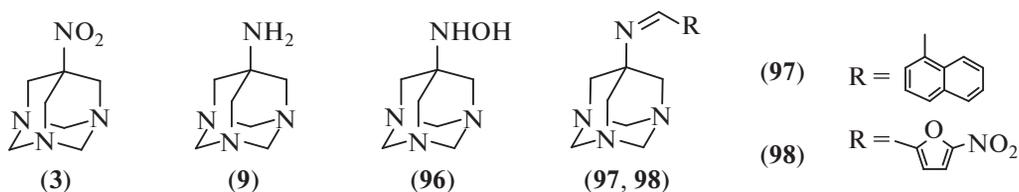


Рис. 8. 7-Замещенные 1,3,5-триазаадамантаны и некоторые их производные, изученные на наличие антимикробной активности [42].

тильный (97) и 5-нитрофурильный (98) заместители, взятых в виде солянокислых солей, была изучена Арутюняном с соавт. (табл. 4) [39]. Умеренную бактериостатическую активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий проявило соединение (98), содержащее нитрофурильную группу. Метод серийных разведений показал, что МПК для соединения (98) составляет 125 мкг/мл, что значительно выше, чем у препарата сравнения фуразолидона.

Наличие антипротозойной активности у четвертичных солей 5,7-диметил-1,3-диазаадамантана было предположено в результате виртуального скрининга на модели фермента трипансионредуктазы (TryR) и изучено Perez-Pineiro et al. [43]. Ингибирование этого фермента приводит к накоплению в трипаносомах токсических кислородных продуктов, вызывающих окисление тиолов клеточных мембран и гибель паразитов. Для ряда диазаадамантанов, содержащих бромбензильную группу (рис. 9), было показано, что они способны связываться с трипансионредуктазой, однако даже для наиболее активного *N*-(3-бромбензил)-производного диазаадамантана (99) IC_{50} была более 100 мкМ, что значительно превышает действующую концентрацию известных препаратов, например, нифуртимоксома [44].

Суммируя литературные данные, можно отметить, что наибольшей антибактериальной активностью обладают производные диазаадаманта-

нов, содержащие метильные заместители в 5-м и 7-м положениях каркаса, гетероароматический заместитель во 2-м положении и спиртовую или нитрофурановую группу, присоединенную через азометиновый фрагмент в 6-м положении молекулы. Кроме того, антибактериальные свойства были обнаружены у 4,8,9,10-тетраарил-1,3-диазаадамантанов с различными заместителями в ароматическом кольце. Несмотря на небольшое количество данных по активности производных триазаадамантанов, можно отметить, что они оказывают меньшее ингибирующее действие на микроорганизмы по сравнению с диазаадамантами.

Противоопухолевая активность. Изучение противоопухолевой активности азаадамантанов было начато Чачояном с соавт. в 1991 г. [45]. Ими были получены и исследованы диазаадамантаны (17), (100–110) (рис. 10), содержащие фрагменты замещенных индолов с высокой противоопухолевой активностью [46].

Противоопухолевую активность соединений изучали на крысах с перевиваемыми опухолями: саркомой 45, лимфосаркомой Плисса и лейкозом Швеца. Наиболее активные соединения изучали и на мышцах с саркомами 180 и 37. Терапевтический эффект соединений оценивали по проценту торможения роста опухолей (ТРО, %), сравнивая с эффективностью ранее изученной 5-(диметиламиносульфонил)-индол-3-карбоновой кислоты

Таблица 4. Антибактериальная активность соединений (97) и (98) [39]

Соединение	Диаметр зоны отсутствия роста, мм (МПК, мкг/мл)			
	грамположительные бактерии		граммотрицательные бактерии	
	<i>S. aureus</i> 209p	<i>S. aureus</i> 1	<i>Sh. dysent. Flexneri</i> 6858	<i>E. coli</i> 0-55
(97)	16	14	17	15
(98)	28 (125)	26	30 (125)	28
Фуразолидон	25 (31)	24	24 (31)	23

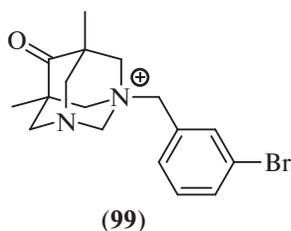


Рис. 9. Четвертичное аммониевое производное 5,7-диметил-1,3-диазаадамantan-6-она, обладающее антипротозойной активностью [43].

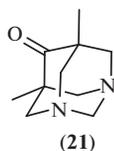
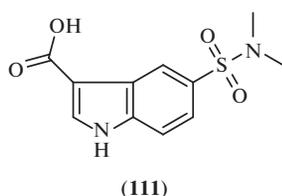
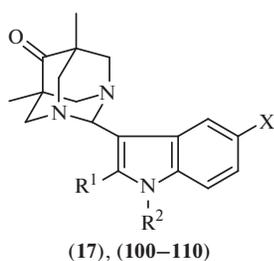
(111) [46] и солянокислого 5,7-диметил-6-оксо-1,3-диазаадамantan (21). Разовую терапевтическую дозу для каждого вещества рассчитывали как $\sim 1/20$ от LD_{100} .

Обнаружено, что производные индолил-1,3-диазаадамantan, независимо от места и характера заместителей в индольном кольце, как и соединение (111), как правило, являются нетоксичными веществами ($LD_{100} \geq 5000$ мг/кг) (табл. 5). Несколько большей токсичностью обладают соединения (100), (101) и (105) ($LD_{100} = 3500$ – 4000 мг/кг), при этом сам диазаадамantan (21) существенно более токсичен ($LD_{100} = 1100$ мг/кг). Введение индольных фрагментов в структуру диазаадамantan снижает его токсичность.

Незамещенный индолил-1,3-диазаадамantan (17), как и соединение (111), проявляет противоопухолевую активность против саркомы 45 (ТРО = 71%), превосходя по активности на этой линии клеток соединение (21) [45]. На моделях саркомы 180 и асцитной карциномы Эрлиха соединения (21), (102) и (112) не оказывали достоверного противоопухолевого эффекта. Замеще-

ние в положении 5 индольного кольца в индолил-1,3-диазаадамтане алкиламиносульфонильной группой (соединения (105–109) приводит к снижению (ТРО = 29.0–62.0%; для соединений (107) и (108) – недостоверно ($p > 0.05$)), а в случае диметилсульфонильной группы (соединение (105)) – к полной потере противоопухолевой активности в отношении саркомы 45, при сохранении терапевтической эффективности против лейкоза Швеца (ТРО = 21.7–42.0%) и саркомы 180 (ТРО = 45.8–54.0%). В отличие от веществ (103) и (105), соединения (104) и (106), имеющие метильные группы в 1-м положении или положениях 1 и 2 индольного кольца, проявили заметную противоопухолевую активность в отношении саркомы 37 (ТРО = 65.7 и 58.0% соответственно). В то же время аналогичное изменение структуры соединения (107) при переходе к соединению (108) не оказало существенного влияния на его противоопухолевый эффект. Исходная 5-(диметиламиносульфонил)-индол-3-карбоновая кислота (111) показала умеренную активность в отношении лимфосаркомы Плисса (ТРО = 45.0%). Менее выраженный антипролиферативный эффект (ТРО = 27.5–44.0%) проявили соединения (105–110). Соединения (17), (103) и (104) оказывали стимулирующее воздействие на рост саркомы 180, лейкоза Швеца и лимфосаркомы Плисса соответственно.

Были изучены физико-химические свойства, мембранотропная и антиоксидантная активность наиболее активных соединений (104) и (106) [45]. Установлено, что в исследуемых концентрациях (0.01, 0.1, 1 и 10 мг/мл) они не влияют на резистентность мембран эритроцитов к действию 0.1 н. HCl и смеси растительных сапонинов [45]. Однако, ввиду их высокого сродства к биологическим мембранам, соединения (104) и (106) сни-



- | | | | |
|-------|--------------|--------------|---------------------------|
| (17) | $R^1 = H$ | $R^2 = H$ | $X = H$ |
| (100) | $R^1 = H$ | $R^2 = CH_3$ | $X = H$ |
| (101) | $R^1 = CH_3$ | $R^2 = H$ | $X = H$ |
| (102) | $R^1 = CH_3$ | $R^2 = CH_3$ | $X = H$ |
| (103) | $R^1 = H$ | $R^2 = H$ | $X = OCH_3$ |
| (104) | $R^1 = CH_3$ | $R^2 = CH_3$ | $X = OCH_3$ |
| (105) | $R^1 = H$ | $R^2 = H$ | $X = SO_2N(CH_3)$ |
| (106) | $R^1 = H$ | $R^2 = CH_3$ | $X = SO_2N(CH_3)_2$ |
| (107) | $R^1 = H$ | $R^2 = H$ | $X = SO_2N(C_2H_5)_2$ |
| (108) | $R^1 = H$ | $R^2 = CH_3$ | $X = SO_2N(C_2H_5)_2$ |
| (109) | $R^1 = H$ | $R^2 = H$ | $X = SO_2$ -морфолино |
| (110) | $R^1 = H$ | $R^2 = H$ | $X = SO_2N(CH_2CH_2Cl)_2$ |

Рис. 10. 5-(Диметиламиносульфонил)-индол-3-карбоновая кислота, 5,7-диметил-1,3-диазаадамantan-6-он и полученные из него 2-индолзамещенные производные, изученные на наличие противоопухолевой активности [45].

Таблица 5. Токсичность и противоопухолевая активность соединений (17), (21) и (100–111) [45], [46]

Соединение	LD ₁₀₀ , мг/кг (мыши)	ТРО, %				ТРО, %		
		доза, мг/кг	саркома 45	лимфосаркома Плисса	лейкоз Швеца	доза, мг/кг	саркома 180	саркома 37
(17)	>5000	250	71.0	–	0	500	Стим.	–
(100)	4000	200	36.0	–	43.0	–	–	–
(101)	4000	200	47.0	0	0	500	–	–
(102)	>5000	250	19.0	0	0	500	–	55.5
(103)	>5000	250	37.0	0	Стим.	–	–	–
(104)	5000	250	45.0	Стим.	45.5	500	55.0	65.7
(105)	3500	160	0	29.0	21.7	350	45.8	–
(106)	5000	250	62.0	27.5	42.0	500	54.0	58
(107)	5000	250	34.0	28.0	34.8	–	–	–
(108)	5000	250	29.0	32.0	0	500	–	–
(109)	5000	250	56.5	36.0	39.0	–	–	–
(110)	5000	250	0	44.0	24.0	500	41.6	–
(111)	5000	250	65.0	45.0	–	–	–	–
(21)	1100	50	52.0	0	0	–	–	–

Примечание: прочерк означает отсутствие активности. Соединение (21) исследовалось в виде солянокислой соли. Стим. – соединение оказывает стимулирующее воздействие на рост опухоли.

жают резистентность мембран эритроцитов, сенсibiliзируя эти мембраны, и в концентрации до 10 мг/мл оказывают гемолизирующее действие. Наибольшее гемолитическое действие проявляет соединение (104). Кроме того, установлено, что соединения (104) и (106) обладают существенной антиоксидантной активностью, ингибируя процессы Fe-индуцированного перекисного окисления липосом. Антиоксидантная активность этих соединений сопоставима с таковой для известного антиоксиданта ионола (2,6-дитретбутил-4-метилфенола) в концентрации 0.1 мг/мл.

Несколькими годами позже этим же коллективом авторов были представлены результаты изучения биологической активности нескольких серий гетероциклических и спироциклических диазаадамантанов (рис. 11, 12) [7, 47, 48]. Противоопухолевую активность соединений изучали на перевиваемых клеточных линиях опухолей: сарком 180, 37 и 45, лейкоза Швеца, карциносаркомы Уокера, асцитной и солидной форм карциномы Эрлиха. Терапевтический эффект соединений оценивали по величине ТРО (%) и увеличению продолжительности жизни подопытных мышей с асцитом по сравнению с контролем. Изучаемая доза для каждого вещества была установлена как 1/20 LD₁₀₀ для крыс и 1/10 LD₁₀₀ для мышей.

Диазаадамантан (112) и синтезированный из него пиридазинон (113) (рис. 11) оказались малотоксичными веществами (LD₁₀₀ = 2500 и >5000 мг/кг соответственно). Показано, что диазаадамантан (112) проявляет умеренную активность в отношении саркомы 45 (ТРО = 50%) в дозе 120 мг/кг, не оказывает достоверного противоопухолевого действия на лейкоз Швеца и стимулирует рост саркомы 180 в дозе 250 мг/кг. Введение соединения (112) не оказывало терапевтического воздействия на мышью с саркомой 37, карциносаркомой Уокера, асцитной и солидной карциномой Эрлиха. Пиридазинон (113) в дозе 500 мг/кг был эффективен в отношении саркомы 37 (ТРО = 62%) и 180 (ТРО = 46%) и на 28% продлевал жизнь подопытных мышей с асцитной карциномой Эрлиха, не вызывая видимого токсического воздействия на организм подопытных

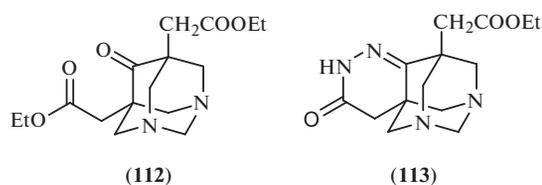


Рис. 11. 5,7-Ди(этоксикарбонилметил)-1,3-диазаадамантан-6-он и полученный из него пиридазинон, изученные на наличие противоопухолевой активности [47].

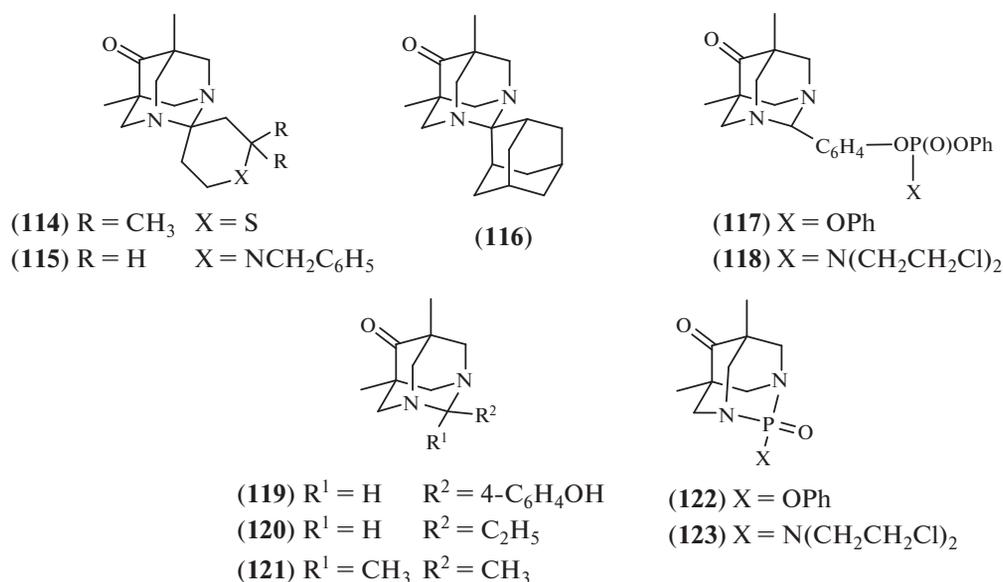


Рис. 12. 2-Спиро-, 2-фосфоарил-, 2-алкил-, 2-фосфо-5,7-диметил-1,3-диазаадамтан-6-оны, изученные на наличие противоопухолевой активности [7, 48].

животных. В то же время соединение (113) не воздействовало на карциносаркому Уокера, саркому 45, лейкоз Швеца и солидную форму карциномы Эрлиха [47]. Данных об использовании препарата сравнения в статье не приводится.

Результаты исследования спироциклических (16), (18), (19) (рис. 4), (114–116), 2-фосфоарил- (117), (118), 2-алкил- (119–121), 2-фосфо- (122), (123) производных и незамещенного 5,7-диметил-1,3-диазаадамтан-6-она (21) (рис. 12) представлены в табл. 6 [7, 48].

Токсичность и противоопухолевая активность соединений (16), (18), (19), (114–123) сравнивалась с таковой у незамещенного 5,7-диметил-6-оксо-1,3-диазаадамтана (21), взятого в виде солянокислой соли. В целом спироциклические соединения оказались умеренно токсичными (LD₁₀₀ = 300–800 мг/кг для соединений (16), (19), (115) и (116)) или малотоксичными (LD₁₀₀ = 1400 и >2500 мг/кг для соединений (18) и (114)) [7]. Сопоставимо низкую токсичность (LD₁₀₀ = 1000–2500 мг/кг) проявили соединения (120), (122) и (123). Диазаадамтан-6-оны (117) и (118), полученные введением замещенной фосфорильной группы в соединение (21), а также 2-(4'-гидроксибензил)диазаадамтан (119) оказались нетоксичными (LD₁₀₀ = 4000–5000 мг/кг) [48].

Среди исследованных соединений умеренную терапевтическую активность в отношении саркомы 45 и 180 проявили диазаадамтан-6-оны с фрагментами циклопентана (18) и циклогексана (19) (ТРО = 50 и 40% соответственно) [7]. Сопоставимой активностью обладают фосфорсодержащие

диазаадамтан-6-оны (122) и (123), оказавшие воздействие на оба вида опухолей. Так, соединение (122), содержащее фенокси-группу, достоверно подавляло рост саркомы 45 на 52.5%, а саркомы 180 – на 42.0%. Соединение (123) с бис(2-хлорэтил)аминой группой в тех же условиях угнетало рост саркомы 45 на 35.0%, а саркомы 180 – на 33.6%. Для незамещенного 1,3-диазаадамтана (21) ТРО составило 52.0 и 33.0% в отношении сарком 45 и 180 соответственно [48].

Значительная противоопухолевая активность обнаружена у соединения (115) с бензилпиперидиновым кольцом. Оно ингибирует рост саркомы 180 (ТРО = 76.0%) и лейкоза Швеца (ТРО = 69.0%), не оказывая токсического действия на подопытных животных. Среди изученных производных диазаадамтана только соединения (115) и (116) приводили к достоверному увеличению (на 26–39%) продолжительности жизни у мышей с асцитной карциномой Эрлиха [7]. Все остальные синтезированные соединения не проявили противоопухолевого действия в отношении карциносаркомы Уокера, лейкоза Швеца и асцитной карциномы Эрлиха.

Синтез и исследование противоопухолевой активности нескольких серий 2-тио- и 2-фосфо-замещенных-1,3-диазаадамтанов (рис. 13) в отношении клеток меланомы мышей В16-F10 были проведены Sharabi-Ronen et al. [49]. Как отмечают авторы статьи, 2-тиозамещенные 1,3-диазаадамтан-6-оны (124) и (125) проявляли низкую активность в отношении клеток опухоли (IC₅₀ > 200 мкМ). Более

Таблица 6. Противоопухолевая активность и острая токсичность 1,3-диазаадамантанов (16), (18), (19), (21) и (114–123) [7, 48]

Соединение	LD ₁₀₀ (мыши) мг/кг	МПД (мыши) мг/кг	Доза (мг/кг) × × количество введений	Саркома 45 (крысы)	Доза (мг/кг) × × количество введений	Саркома 180 (мыши)
				ТРО, %		ТРО, %
(16)	500	400	25 × 8	38.7	50 × 6	–
(18)	1400	1200	70 × 8	50.0	125 × 6	–
(19)	800	500	40 × 8	0	50 × 6	40.0
(114)	>2500	Н.д.	150 × 8	0	250 × 6	–
(115)	300	200	15 × 8	40.3	30 × 6	76.0
(116)	550	400	25 × 8	18.0	50 × 6	31.0
(117)	4000	3000	150	30.5	300 × 1	–
(118)	5000	Н.д.	250	–	500 × 1	–
(119)	5000	Н.д.	250	–	500 × 1	–
(120)	1250	1000	60	–	125 × 1	–
(121)	1100	900	50	–	100 × 1	–
(122)	2500	2000	120	52.5	250 × 1	42.0
(123)	1000	850	50	35.0	100 × 1	33.6
(21)	1100	800	50 × 8	52.0	100 × 6	33.0

Примечание: прочерк означает отсутствие активности. Соединение (21) исследовалось в виде солянокислой соли. Н.д. – для соединений (114), (118) и (119) МПД не установлена.

перспективные результаты были получены для фосфорсодержащих аналогов (126) и (127), показавших значительную противоопухолевую активность (IC₅₀ = 10–60 мкМ) [49]. Кроме исследования цитотоксичности полученных соединений, для наиболее активных 5,7-ди(4-(трифторметил)бензил)-1,3-диаза-2-фосфоадамантанов (126) и (127) было изучено влияние на клеточный цикл и механизм активации апоптоза. Посредством исследований изменения митохондриального мембранного потенциала, оцениваемого с помощью реагента JC-1, активации каспаз 3 и 7, окрашивания аннексином V-FITC/PI и выявления морфологических изменений было показано, что

данные соединения вызывали остановку клеточного цикла в фазе G2/M, что приводило к апоптозу клеток меланомы мышей B16-F10.

Менее изученной остается противоопухолевая активность триазаадамантанов. Среди производных 7-амино-1,3,5-триазаадамантана, включающих замещенные оксииндолин-, эпоксиизоиндол-, пирролидин-, ацетамид-, а также 6,6-дизамещенные триазаадамантаны, содержащие ароматические заместители, антипролиферативная активность была обнаружена у соединения (128) (рис. 14) в отношении линий клеток HT₂₉ (рак прямой кишки, IC₅₀ = 1 мкг/кг), MCF7 (рак молочной железы, IC₅₀ = 2.3 мкг/кг), Panc-1 (рак поджелудочной же-

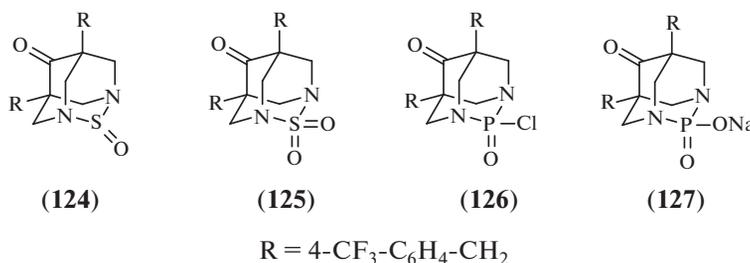


Рис. 13. 2-Тио- и 2-фосфо-5,7-дизамещенные-1,3-диазаадамантан-6-оны, изученные на наличие противоопухолевой активности [49].

лезы, $IC_{50} = 3.4$ мкг/кг) и NCI-H₄₆₀ (рак легких, $IC_{50} = 3.4$ мкг/кг) [35]. Кроме того, соединение (**128**) в дозе 70 мг/кг подавляло на 54% рост саркомы 180 у мышей [35].

В качестве потенциальных противоопухолевых агентов были предложены металл-органические комплексы триазаадамантана с координированными к ионам марганца молекулами CO [50]. Предполагается, что подобные соединения при введении в организм будут выделять при облучении CO. Известно, что в небольших концентрациях (<200 ppm) CO проявляет противовоспалительные и антиапоптотические свойства на здоровых клетках [51], при этом воздействие CO во время химиотерапии вызывает апоптоз клеток рака предстательной железы [52]. Наиболее перспективным авторы считают соединение (**129**) (рис. 14), которое имеет умеренную, зависящую от pH, растворимость в воде, что может обеспечить дополнительное преимущество в селективности действия. При физиологическом pH фрагмент триазаадамантана не несет заряда и может диффундировать через липидные мембраны. Однако в раковых клетках с относительно низким уровнем pH могут происходить протонирование и захват триазаадамантанового фрагмента. Протонированный фрагмент триазаадамантана также может приводить к повреждению ДНК. Кроме того, водные растворы комплекса (**129**) стабильны в темноте и нечувствительны к восстановителям, таким как дитионит натрия и глутатион, и быстро высвобождают три молекулы CO при воздействии видимого света низкой мощности. Исследования по доставке CO в раковые клетки с помощью соединения (**129**) были запланированы [50], но их результаты в настоящее время не опубликованы.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АЗААДАМАНТАНОВ С ДНК, А ТАКЖЕ С ФЕРМЕНТАМИ И РЕЦЕПТОРАМИ

Способность связываться с азотистыми основаниями молекулы ДНК, увеличивая скорость реакции обмена цепочек в коротких нуклеотидах, была обнаружена у 1'-бензил-5,7-диалкил-1,3-диазаспиро[адамантан-2,4'-пиперидин]-6-онов (**130**) и (**131**) (рис. 15) [53]. В экспериментах использовали ДНК тимуса теленка, олигонуклеотиды d(CAATCGGATCGAATTCCGATCCGATTG) (ds26), Cy3d(CAATCGGATCGAATTCCGATCCGATTG) (Cy3ds26) и Cy5d(CAATCGGATCGAATTCCGATCCGATTG) (Cy5ds26). Регистрацию взаимодействия 1,3-диазаадамантанов с ДНК осуществляли с помощью флуоресцентно-контролируемого вытеснения лигандами красителя тиазолового оранжевого (ТО) из его комплекса с ДНК. Для регистрации кривых вытеснения ТО добавляли к ДНК (0.25 мкМ) в такой концентрации ($C_{TO} = 1$ мкМ),

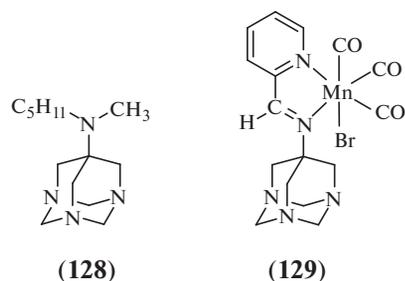


Рис. 14. Структуры *N,N*-диалкилзамещенного 1,3,5-триазаадамантана, обладающего антипролиферативной активностью, и металл-органического комплекса 1,3,5-триазаадамантана с предполагаемой противоопухолевой активностью [35, 50].

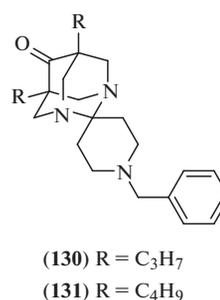


Рис. 15. 5,7-Диалкилзамещенные 1,3-диазаадамантаны, способные связываться с азотистыми основаниями молекулы ДНК [53].

чтобы все места связывания с ДНК были практически заполнены. При образовании комплекса ТО с ДНК значительно увеличивается флуоресценция красителя. Титрование 1,3-диазаадамантанами вызывало тушение флуоресценции, связанное с вытеснением ТО из комплекса с ДНК.

Оказалось, что при pH 7.8 диазаадамантан (**131**) с *n*-бутильными заместителями связывается с ДНК с $K_a = 180$ М⁻¹, а диазаадамантан (**130**) с пропиловыми заместителями – с $K_a = 15$ М⁻¹. При pH 6.5 сродство обоих 1,3-диазаадамантанов к ДНК увеличивается, константы ассоциации 5,7-диалкилзамещенных диазаадамантанов с ДНК становятся близкими и равными 1400 и 500 М⁻¹ соответственно. Таким образом, диазаадамантаны (**130**) и (**131**) продемонстрировали pH-зависимую аффинность к ДНК [54, 55].

О наличии ингибирующей активности в отношении некоторых ферментов у производных 5,7-диметил-1,3-диазаадамантана сообщается в работе Захаренко с соавт. [56].

У 1,3-диазаадамантанов (**132**) и (**133**) (рис. 16), содержащих фрагменты ациклических монотерпенов цитронеллала и цитраля соответственно, обнаружена ингибирующая активность в отношении фермента репарации ДНК Tdp1 (тирозил-

ДНК-фосфодиэстераза 1), который является перспективной мишенью для комплексной противоопухолевой терапии [57–59]. Действие некоторых противоопухолевых препаратов, например, камптотецина и его клинически важных производных топотекана и иринотекана [60], опосредовано ингибированием процесса отщепления топоизомеразы 1В (Top1) от 3'-конца ДНК [61, 62]. Tdp1 способна разрушать фосфодиэфирную связь между тирозином (Top1) и 3'-фосфатной группой ДНК в случаях, когда это не протекает по естественным причинам. Таким образом, соединения, способные ингибировать Tdp1, могут повышать терапевтическую эффективность ингибиторов Top1 [63–66].

Захаренко с соавт. [56] использовали опубликованный ими ранее [67] метод флуоресцентной детекции активности Tdp1, основанный на способности Tdp1 отщеплять объемные заместители с 3'-конца ДНК. К 16-звенному олигонуклеотиду с 5'-конца был присоединен донор флуоресценции 5(6)-карбоксифлуоресцеин (FAM), а к 3'-концу – гаситель флуоресценции BHQ1 (Black Hole Quencher-1). Флуоресценция флуорофора гасится, т.к. BHQ1 расположен в пределах ферстеровского радиуса. Инкубация олигонуклеотида-биосенсора с Tdp1 приводит к удалению BHQ1 с 3'-конца олигонуклеотида, что приводит к разгоранию флуоресценции. Величины IC_{50} для соединений (132) и (133) составили 14.8 и 16.7 мкМ, что в целом является умеренной активностью, т.к. в настоящее время известны соединения, ингибирующие Tdp1 в субмикромольном диапазоне [68–70].

Golubovskaya et al. [71] исследовали способность малых молекул, содержащих триазаадамантановый фрагмент, связываться с фокальной адгезивной киназой (ФАК, или протеинтирозинкиназа 2, РТК2), нарушая ее связывание с белком p53. ФАК (РТК2) – это нерцепторная тирозинкиназа, которая контролирует клеточные процессы, такие как пролиферация, адгезия, распространение, подвижность и выживаемость [72]. Белок p53 выполняет функцию супрессора образования злокачественных опухолей [73]. Активация p53 снижает жизнеспособность и клоногенность раковых клеток и ингибирует рост опухоли *in vivo*. Достоверное снижение жизнеспособности у клеток рака линии HCT116 p53 показали выbranные в результате молекулярного докинга *N*-алкил-*N*-метил-1,3,5-триазаадамантаны, содержащие бутильный (134) и гексильный (135) заместители (рис. 17), однако их аффинность к ФАК оказалась недостаточной, чтобы нарушить ее связывание с p53.

Eisenbarth et al. [74] изучили способность *N*-бутил-*N*-метилтриазаадамантана (134) (рис. 17) к подавлению аутоиммунного ответа, вызывающего диабет 1-го типа. Исследовался ответ клонированных Т-лимфоцитов, ограниченных DQ8, на

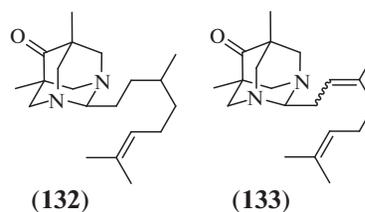


Рис. 16. Производные 5,7-диметил-1,3-дизаадамантана, проявляющие ингибирующую активность в отношении фермента Tdp1 [56].

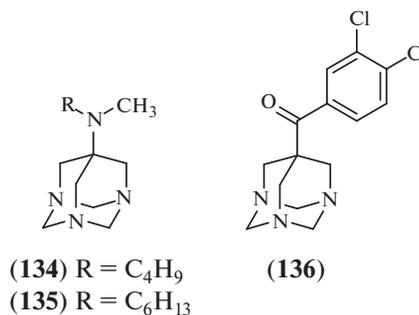


Рис. 17. Производные 1,3,5-триазаадамантана, способные связываться с различными белками: ФАК (134), (135) [71], HLA-DQ8 (134) [74] и CCR1 (136) [76].

аминокислоты В-цепи инсулина 9–23, а также на ингибирование взаимодействия этих белков с молекулами главного комплекса гистосовместимости II класса, кодируемых геном DQ8. Соединение (134) действовало в концентрациях <0.1 мкМ и >100 мкМ (IC_{50}) в первом и во втором случаях соответственно. Продемонстрированная активность недостаточно высока, чтобы рассматривать соединение (134) как средство профилактики и лечения диабета 1-го типа.

Известно, что связывание с рецептором CCR1 приводит к предотвращению его взаимодействия с хемокинами, которые вовлечены в развитие и поддержание многочисленных воспалительных и иммунологических состояний и других нарушений [75]. Аффинность к рецептору CCR1 (IC_{50} = 2 мкМ) была продемонстрирована для соединения (136) (рис. 17) [76]. Следует отметить, что подобную активность можно назвать умеренной, поскольку известны соединения, связывающиеся с рецептором CCR1 в субнаномольной концентрации [77].

ДЕЙСТВИЕ АЗААДАМАНТАНОВ НА НЕРВНУЮ СИСТЕМУ

У некоторых производных диазаадамантана была обнаружена существенная анальгетическая активность. Показано [78], что среди 8,9-замещенных диметил 5,7-карбоксил-1,3-дизаада-

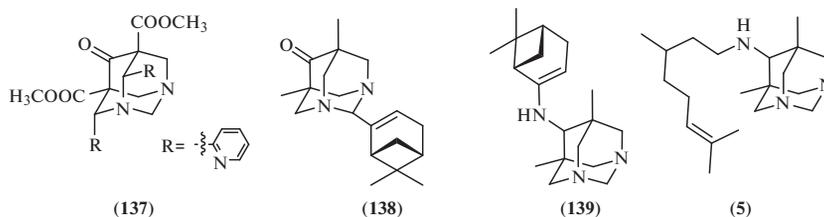


Рис. 18. Производные 1,3-диазаадамнтана, обладающие аналгетической (137–139) и гипералгезивной (5) активностью [78, 79].

мантанов, содержащих ароматические и гетероароматические заместители, соединение (137) (рис. 18), имеющее 2-пиридиновые заместители, на 80% снижает боль в тесте Рандалла–Селитто (сдавливание лапы) при введении перорально в дозе 1 мг/кг.

Наличие выраженной аналгетической активности было обнаружено у 2-замещенного 5,7-диметил-1,3-диазаадамнтан-6-она (138), содержащего фрагмент (–)-миртенала (рис. 18) [79]. Исследования, проводившиеся на мышах в тестах “уксусные корчи” и “горячая пластина”, показали, что при пероральном введении в дозе 20 мг/кг диазаадамнтан (138) достоверно снижал болевое проявление на 61 и 82% соответственно, не уступая по эффективности препарату сравнения диклофенаку натрия. Соединение (138) показало умеренную острую токсичность на мышах, его LD₅₀ превышала 1000 мг/кг, при этом LD₅₀ диклофенака натрия составляет 370 мг/кг [80].

Ульцерогенную активность (действие, выражающееся в образовании дефектов слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта) соединения (138) исследовали в сравнении с нестероидным противовоспалительным препаратом индометацином на крысах линии Wistar [81]. Во время эксперимента животным в течение трех дней вводили соединение (138) в дозе 30 мг/кг или индометацин в дозе 20 мг/кг. В группе животных, получавших соединение (138), все животные дожили до конца эксперимента, а язв не было обнаружено, тогда как среди животных, получавших индометацин, до окончания эксперимента погибла половина группы, а у остальных животных были обнаружены эрозии и язвы [79].

Важной проблемой, которая неизбежно возникает при обнаружении эффективного аналгетика, является изучение возможного механизма его действия. В отличие от (–)-миртенала, который имеет тот же монотерпеновый фрагмент, что и соединение (138), и обладает противовоспалительным действием [82], соединение (138) в дозе 60 мг/кг не проявило противовоспалительной активности на модели, основанной на введении 3%-ного формалина в качестве флоггена (от лат. *phlogosis* – воспаление; патогенный раздражи-

тель, который может вызвать воспалительную реакцию) [79].

Исследование влияния соединения (138) на поведение мышей в тесте “открытое поле” показало [79], что оно снижает скорость передвижения и, как следствие, дистанцию передвижения, но не оказывает существенного влияния на исследовательскую активность животных. Подобное ингибирующее влияние на двигательную активность животных характерно для опиоидных аналгетиков [83, 84], а также аналгетиков, влияющих на каннабиноидную систему, таких как Δ⁹-тетрагидроканнабинол [85]. Для выявления возможного механизма действия было изучено влияние неселективного антагониста опиоидных рецепторов налоксона [86] и селективного антагониста каннабиноидных рецепторов CB1 римонабанта [87] на аналгетическую активность соединения (138) в тесте “уксусные корчи”. Аналгетическая активность соединения (138) сохранялась на фоне введения налоксона, тогда как введение римонабанта приводило к нивелированию обезболивающего эффекта [79]. Полученные результаты позволяют предположить, что аналгетический эффект соединения (138), по крайней мере частично, опосредован каннабиноидной системой с вовлечением CB1-рецепторов.

Сопоставимая с диазаадамнтаном (138) аналгетическая активность была обнаружена и у вторичного амина (139), также содержащего фрагмент (–)-миртенала, но присоединенного к гетероадамнтановому остову через аминогруппу. Соединение (139), вводимое в дозе 20 мг/кг, снижало боль испытуемых животных в тестах “уксусные корчи” и “горячая пластина” на 46 и 89% соответственно [15].

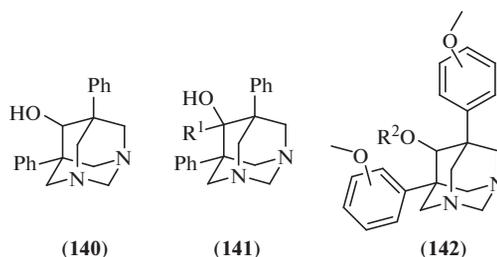
Высокая аналгетическая активность была обнаружена у ранее упомянутого диазаадамнтана (132) (рис. 16), содержащего фрагмент цитронеллала. В дозе 20 мг/кг он снижал боль в тестах “уксусные корчи” и “горячая пластина” на 32 и 94% соответственно [79]. Интересно, что в случае содержащего остаток цитронеллала соединения (5) наблюдалось исчезновение аналгетической активности в тесте “уксусные корчи”, а в тесте “горячая пластина” соединение (5) и вовсе проявляло

гипералгезивные свойства (повышало чувствительность организма к болевым раздражителям). Исходный диазаадамантанамин (**4**) не продемонстрировал какой-либо анальгетической активности [79].

Для большинства исследованных производных диазаадамантана было показано, что они обладают низкой острой токсичностью (сотни и тысячи мг/кг). Однако некоторые его производные, в частности 5,7-дифенил-замещенные диазаадамантанолы, проявляют токсичные свойства в дозах от 1 мг/кг. Так, стрихниноподобная активность (способность вызвать сильные болезненные тетанические судороги) была обнаружена Longo et al. [88] у вводимого внутривенно 5,7-дифенил-1,3-диазаадамантан-6-ола (**140**) (рис. 19) с $LD_{50} = 1.1$ и 2.0 мг/кг для мышей и крыс соответственно.

С целью изучения зависимости “структура–токсичность” различных 6-замещенных 5,7-дифенилдиазиадамантанов Chiavarelli et al. получили ряд 6-алкил- и 6-арил-6-гидроксипроизводных 5,7-дифенилдиазиадамантана (**141**) [89], а также синтезировали 6-алкил-6-гидроксиадамантанолы, содержащие в 5-м и 7-м положениях фенильные группы с различными заместителями, и исследовали их стрихниноподобную активность [90]. Тесты, проведенные на мышах и крысах, показали, что введение в 5,7-дифенил-1,3-диазаадамантан-6-ол алкильного заместителя (метил-, этил-, пропил-, *n*-бутил-, изобутил-, *n*-додецил- и α -нафтил-) по 6-му положению приводило к снижению токсичности ($LD_{50} = 12.5–75.0$ мг/кг) с сохранением стрихниноподобного воздействия на организм подопытных животных (повышенная возбудимость с последующими тоническими и тонико-клоническими судорогами). Введение в 6-е положение фенильной группы также снижало токсичность соединения, при этом механизм возникновения судорог несколько отличался: сначала наблюдалась мелкая дрожь, а только затем – клонические судороги [89].

Среди 6-гидроксипроизводных, содержащих замещенные фенильные группы или 6-алкоксизамещенные группы, наибольшая токсичность и стрихниноподобное действие были отмечены у 2-метокси-, 3-метокси- и 4-метоксифенилдиазиадамантан-6-олов (**142**) ($LD_{50} = 1.5–20$ мг/кг) (рис. 19). 4-Метокси-замещенные 5,7-дифенилдиазиадамантанолы, содержащие 6-алкоксизамещенную группу (6-метокси- и 6-этоксидиазаадамантанолы), проявляли значительно меньшую токсичность ($LD_{50} = 100–150$ мг/кг) и оказывали только судорожное (стрихниноподобное) воздействие на подопытных животных. Увеличение количества метоксигрупп в фенильном кольце с сохранением незамещенной 6-гидроксигруппы приводило к резкому снижению ($LD_{50} = 300$ мг/кг



$R^1 = CH_3, C_2H_5, C_3H_7, n-C_4H_9, i-C_4H_9, n-C_{12}H_{25}, C_6H_5, \alpha$ -нафтил
 $R^2 = H, CH_3, C_2H_5$

Рис. 19. Структуры 5,7-диарилзамещенных 1,3-диазаадамантанов, обладающих высокой токсичностью и стрихниноподобной активностью [88].

для 2,3-диметоксипроизводного) или полному исчезновению (для 2,3,4-триметоксипроизводного) токсичности [90]. Таким образом, можно отметить ключевую роль наличия спиртовой группы в 6-м положении и фенильных заместителей в 5-м и 7-м положениях диазаадамантана для проявления ими стрихниноподобного действия.

Агаджанян с соавт. показали наличие α -адреноблокирующей активности у 5,7-диметилдиазиадамантана (**115**) (рис. 12), содержащего бензилпиперидиновый заместитель во втором положении молекулы [91]. Исследования проводили в опытах на изолированных семявыносящих протоках крыс, об эффекте судили по уменьшению сокращений, вызванных трансмуральным электрическим раздражением или норадреналином в концентрации 10 мкг/мл. В качестве препаратов сравнения использовали α -адреноблокаторы пипероксан, фентоламин и симпатолитик октадин, вводимые, как и исследуемый препарат, в концентрации 0.05 мкМ. Хотя в течение первых минут воздействия соединения (**115**) не оказывало существенного влияния на сокращение семявыносящего протока, вызванного норадреналином, его блокирующее действие развивалось постепенно, приводя к 50%-ному уменьшению реакции на 60-й минуте. Адреноблокирующее действие препаратов сравнения пипероксана и фентоламина проявлялось гораздо быстрее, приводя к уменьшению сокращений протока через 10 мин после введения препаратов на 30 и 55% соответственно. К 60-й минуте эффект пипероксана уменьшался наполовину, а фентоламина – держался на исходном уровне. Соединение (**115**) не влияло на сокращения протока, вызванные трансмуральным электрическим раздражением, не оказывая тормозящего эффекта при передаче нервного импульса и не обладая симпатолитической активностью.

Противосудорожные и психотропные свойства ряда 1,3-диазаадамантанов (**28**) (схема 6) и (**143–145**) (рис. 20) были исследованы Арутюня-

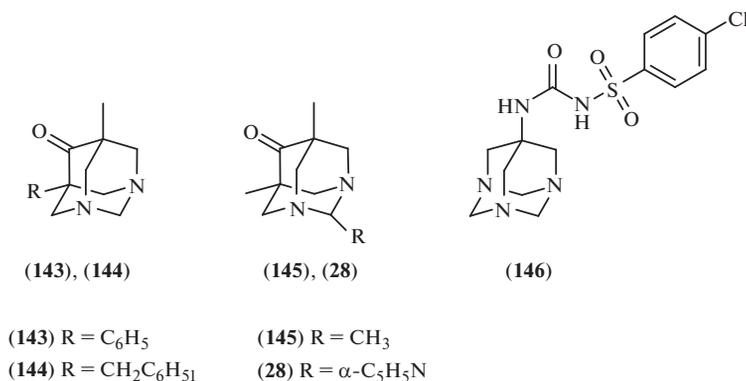


Рис. 20. Структуры 5,7-дизамещенных 1,3-дизаадамантанов, обладающих противосудорожным эффектом, и 1,3,5-триаадамантана, демонстрирующего гипогликемическую активность [92, 93].

ном с соавт. [92] в тесте конвульсий, индуцированных коразолом, и тесте “открытое поле”. Исследованные 5-метил-7-фенил-, 5-метил-7-бензилдизаадамантаноны (143), (144) и 2-метил-, 2-пиридил-5,7-диметилдизаадамантаноны (145), (28) проявили противосудорожное действие в дозах ED₅₀ = 30–35 мг/кг, в то время как для препарата сравнения, диазепама, ED₅₀ составила 0.5 мг/кг. Большинство веществ снижали двигательную и исследовательскую активность, что может быть связано с их седативными свойствами.

ДРУГИЕ ТИПЫ АКТИВНОСТЕЙ АЗААДАМАНТАНОВ

Некоторое улучшение гипогликемической активности (способности снижать уровень глюкозы в крови) антидиабетических средств в результате присоединения фрагмента азаадамантана к биологически активным соединениям было показано Агаджаняном с соавт. [93]. Путем замены алкильной группы в 4-хлоро-*N*-(пропилкарбомойл)бензенсульфонамиде (хлорпропамид; препарат, применяющийся при лечении сахарного диабета 2-го типа, диабетической микроангиопатии (начальные формы) и несахарного диабета) на 1,3,5-триаадамантан было получено соединение (146) (рис. 20). Соединение (146) в дозах 100 и 250 мг/кг снижало содержание глюкозы в крови

здоровых крыс на 13 и 18% соответственно, почти не отличаясь по активности и эффективности от хлорпропамида. В то же время у крыс с аллоксановым диабетом соединение (146) в дозе 250 мг/кг понижало содержание глюкозы на 31%, тогда как хлорпропамид – только на 23%.

Иммунодепрессивная активность 5-фенилдизаадамантанолов, содержащих различные заместители по 7-му положению гетероадамантанового остова (рис. 21), была изучена Якушевым с соавт. [94]. Соединения (147) и (149) проявили иммунодепрессивную активность в отношении антител с лизирующими и агглютинирующими свойствами в дозах 0.5 мг/кг, при увеличении дозы до 5 и 50 мг/кг активность пропадала. В то же время соединение (148) в дозе 5 мг/кг проявило иммунодепрессивную активность в отношении обоих исследуемых антител. В дозе 50 мг/кг соединение (148) оказалось активным в отношении антител с агглютинирующими свойствами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наибольшее число работ, направленных на изучение биологической активности диазаадамантанов, посвящено исследованию антимикробной и противоопухолевой активности. У тетрафенил-замещенных диазаадамантанов и производных, содержащих гетероциклические группировки по второму положению молекулы азаадамантана, были обнаружены выраженные антибактериальные свойства. Различные 2-функционализированные производные, а также спиро- и конденсированные производные, содержащие гетероатомы, продемонстрировали противоопухолевую активность, в основном в экспериментах *in vivo*. Среди производных диазаадамантана обнаружены соединения, обладающие выраженным противовирусным, психотропным, стрихниноподобным или анальгетическим действием. Большинство исследованных соединений показало умеренную или

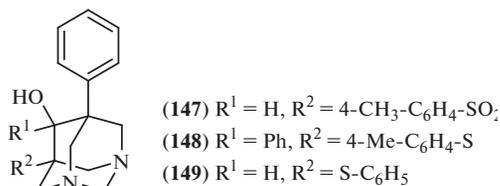


Рис. 21. Структуры 5,7-дизамещенных 1,3-дизаадамантанов, обладающих иммунодепрессивной активностью [94].

низкую острую токсичность *in vivo*, однако был выявлен ряд диазаадамантанов, обладающих крайне высокой токсичностью ($LD_{50} < 10$ мг/кг).

Производные триазаадамантанов, как и замещенные диазаадамантаны, проявляют антибактериальную и противоопухолевую активность, но, как правило, менее выраженную. Некоторые производные триазаадамантана обладают гипогликемическими свойствами. Наличие в адамантановом остове трех атомов азота приводит к увеличению растворимости в воде, что делает возможным использование триазаадамантанов в качестве фрагментов для модификации существующих, а также для дизайна новых лекарственных соединений.

Накопленный большой экспериментальный материал позволяет связать строение заместителей в азаадамантах с влиянием на противовирусную, антибактериальную и противоопухолевую активность. Благодаря возможности синтеза различными путями из доступных реагентов и наличию разнообразной биологической активности в сочетании с низкой токсичностью, ди- и триазаадамантаны – перспективные платформы для поиска фармакологически активных производных.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-13-50251).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Zefirov H.S., Rogozina S.V.* // Успехи химии. 1973. Т. 42. С. 4–23. [*Zefirov N.S., Rogozina S.V.* // Russ. Chem. Reviews. 1973. V. 42. P. 190–198.] <https://doi.org/10.1070/RC1973v042n03ABEH002574>
2. *Lukes R., Syhora K.* // Chem. Listy. 1952. V. 46. P. 731–734.
3. *Кузнецов А.И., Зефиоров Н.С.* // Успехи химии. 1989. Т. 58. С. 1815–1843. [*Kuznetsov A.I., Zefirov N.S.* // Russ. Chem. Rev. 1989. V. 58. P. 1033–1047.] <https://doi.org/10.1070/RC1989v058n11ABEH003495>
4. *Izumi H., Yamagami S., Futamura S.* // Curr. Med. Chem. – Cardiovasc. Hematol. Agents. 2003. V. 1. P. 99–111. <https://doi.org/10.2174/1568016033477478>
5. *Yamawaki I., Bukovac S.W., Sunami A.* // Chem. Pharm. Bull. 1994. V. 42. P. 2365–2369. <https://doi.org/10.1248/cpb.42.2365>
6. *Brandt W., Drosihn S., Haurand M., Holzgrabe U., Nachtsheim C.* // Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 1996. V. 329. P. 311–323. <https://doi.org/10.1002/ardp.19963290607>
7. *Arutyunyan G.L., Chachoyan A.A., Agadzhanian T.E., Garibdzhanian B.T.* // Pharm. Chem. J. 1996. V. 30. P. 739–741. <https://doi.org/10.1007/BF02218824>
8. *Becker D.P., Flynn D.L., Shone R.L., Gullikson G.* // Bioorg. & Med. Chemistry. 2004. V. 14. P. 5509–5512. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.09.005>
9. *Dembitsky V.M., Glorizova T.A., Poroikov V.V.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2020. V. 529. P. 1225–1241. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.06.123>
10. *Narayan S., Ramiseti S., Jaiswal A.S., Law B.K., Singh-Pillay A., Singh P., Amin S., Sharma A.K.* // Eur. J. Med. Chem. 2019. V. 161. P. 456–467. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.10.052>
11. *Кузнецов А.И.* // Успехи химии адамантана. Москва, 2007.
12. *Semakin A.N., Nelyubina Y.V., Ioffe S.L., Sukhorukov A.Yu.* // Eur. J. Org. Chem. 2020. V. 43. P. 6723–6735. <https://doi.org/10.1002/ejoc.202000832>
13. *Kuznetsov A.I., Basargin E.B., Ba M.K., Moskovkin A.S., Miroshnichenko I.V., Botnikov M.Y.* // Chem. Heterocycl. Compd. V. 25. P. 541–547. <https://doi.org/10.1007/bf00482502>
14. *Palyulin V.A., Emets S.V., Potekhin K.A., Lysov A.E., Chertkov V.A., Zefirov N.S.* // Dokl. Chem. 2000. V. 375. P. 289–292. <https://doi.org/10.1023/a:1026651502291>
15. *Ponomarev K., Morozova E., Pavlova A., Suslov E., Korchagina D., Nefedov A., Tolstikova T., Volcho K., Salakhutdinov N.* // Med. Chem. 2017. V. 13. P. 773–779. <https://doi.org/10.2174/1573406413666170525124316>
16. *Вичканова С.А., Горюнова Л.В., Шипулина Л.Д., Бадаев Ф.А., Кузнецов И.А., Толкачев О.Н., Унковский Б.В.* // Фармакология и токсикология. 1974. Т. 37. С. 76–79.
17. *Агаджанян Ц.Е., Арутюнян А.Д., Арутюнян Г.Л.* // ХГС. 1992. Т. 7. С. 929–932. <https://doi.org/10.1007/BF00474490>
18. *Tomassoli I., Gündisch D.* // Curr. Top. Med. Chem. 2016. V. 16. P. 1314–1342. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150915111434>
19. *Ruenitz P.C., Smisssman E.J.* // J. Heterocycl. Chem. 1976. V. 13. P. 1111–1113. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570130539>
20. *Chiavarelli S., Seilimj G., Rabagliati-Canessa F.M.* // Gazz. Chim. Ital. 1960. V. 90. P. 311.
21. *Kafka Z., Galík V., Šafář M.* // Collect. Czech. Chem. Commun. 1975. V. 40. P. 174–178. <https://doi.org/10.1135/cccc19750174>
22. *Baliah V., Usha R.* // Indian J. Chem. 1977. V. 158. P. 684–689.

23. Quast H., Muller B. // Chem. Ber. 1980. V. 113. P. 2959. <https://doi.org/10.1002/cber.19801130913>
24. Quast H., Muller B., Peters E.-M. // Chem. Ber. 1982. V. 115. P. 3631. <https://doi.org/10.1002/cber.19821151115>
25. Balaji G.L., Vijayakumar V., Rajesh K. // Arab. J. Chem. 2016. V. 9. Suppl. 2. P. 1101–1104. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.12.011>
26. Sletter H., Bochmann W. // Chem. Ber. 1951. V. 84. P. 834. <https://doi.org/10.1002/cber.19510840908>
27. Кузнецов А.И., Бурделев О.Т., Унковский Б.В. // Тр. Юбилейной конференции, посвященной 70-летию МИТХТ им. М. В. Ломоносова. Москва. 1970. С. 163.
28. Schnell J.R., Chou J.J. // Nature. 2008. V. 451. P. 591–595. <https://doi.org/10.1038/nature06531>
29. Fiore A.E., Fry A., Shay D., Gubareva L., Bresee J.S., Uyeki T.M. // MMWR Recomm. Rep. 2011. V. 60. P. 1–24.
30. Suslov E.V., Zarubaev V.V., Slita A.V., Ponomarev K.Y., Korchagina D.V., Ayine-Tora D.M., Reynisson J., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2017. V. 27. P. 4531–4535. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.08.062>
31. Narayan S., Ramiseti S., Jaiswal A.S., Law B.K., Singh-Pillay A., Singh P., Amin S., Sharma A.K. // Eur. J. Med. Chem. 2019. V. 161. P. 456–467. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.10.052>
32. Teplov G.V., Suslov E.V., Zarubaev V.V., Shtro A.A., Karpinskaya L.A., Rogachev A.D., Korchagina D.V., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F., Kiselev O.I. // Lett. Drug. Des. Discov. 2013. V. 10. P. 477–485. <https://doi.org/10.2174/1570180811310060002>
33. Chao W.W., Lin B.F. // Chin. Med. 2010. V. 5. P. 17. <https://doi.org/10.1186/1749-8546-5-17>
34. Wiart C., Kumar K., Yusof M.Y., Hamimah H., Fauzi Z.M., Sulaiman M. // Phytother. Res. 2005. V. 19. P. 1069–1070. <https://doi.org/10.1002/ptr.1765>
35. Lifeng Xu // U.S. Pat. Appl. Publ. 2014, US 20140045779 A1.
36. Саакян Г.С., Арутюнян Г.Л., Агаджанян Ц.Е., Пароникян Р.В. // Арм. хим. журнал. 1986. Т. 39. С. 242–246.
37. Arutyunyan G.L., Paronikyan R.V., Saakyan G.S., Arutyunyan A.D., Gevorkyan K.A. // Pharm. Chem. J. 2008. V. 42. P. 18–22. <https://doi.org/10.1007/s11094-008-0048-3>
38. Arutyunyan G.L., Gevorkyan K.A., Arutyunyan A.D., Paronikyan R.V., Stepanyan G.M., Panosyan G.A. // Russ. J. Org. Chem. 2014. V. 50. P. 1480–1484. <https://doi.org/10.1134/S1070428014100133>
39. Arutyunyan G.L., Arutyunyan A.D., Gevorkyan K.A., Gasparyan S.P., Paronikyan R.V., Stepanyan G.M., Minasyan N.S. // Pharm. Chem. J. 2018. V. 52. P. 419–423. <https://doi.org/10.1007/s11094-018-1834-1>
40. Байсалбаева С.А., Омаров Т.Т., Никитина Е.Т., Казакова Г.Г. // ХФЖ. 1987. Т. 21. С. 191–195. [Baisalbaeva S.A., Omarov T.T., Nikitina E.T., Kazakova G.G. // Pharm. Chem. J. 1987. V. 21. P. 120–123.] <https://doi.org/10.1007/BF00765110>
41. Balaji G.L., Sarveswari S., Vijayakumar V. // Res. Chem. Intermed. 2015. V. 41. P. 6765–6776. <https://doi.org/10.1007/s11164-014-1775-6>
42. Hodge E.B. // U.S. Pat. Appl. Publ. 1971, US 3575974 A.
43. Perez-Pineiro R., Burgos As., Deuan C. Jones, Andrew L.C., Rodriguez H., Suarez M., Fairlamb A.H., Wishart D.S. // J. Med. Chem. 2009. V. 52. P. 1670–1680. <https://doi.org/10.1021/jm801306g>
44. Wyllie S., Foth B.J., Kelner A., Sokolova A.Y., Berriman M., Fairlamb A.H. // J. Antimicrob. Chemother. 2015. V. 71. P. 625–634. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv376>
45. Чачоян А.А., Шкулев В.А., Писарский Ю.Б., Саакян Г.С., Агаджанян Ц.Е., Гарибджанян Б.Т. // ХФЖ. 1991. Т. 25. С. 45–48. [Chachoyan A.A., Shkulev V.A., Pissarskii Y.B., Saakyan G.S., Agadzhanyan T.E., Garibdzhanyan B.T. // Pharm. Chem. J. 1991. V. 25. P. 275–278.] <https://doi.org/10.1007/BF00772114>
46. Чачоян А.А., Шкулев В.А., Самвелян К.Г., Гарибджанян Б.Т., Папаян Г.Л. // ХФЖ. 1989. Т. 23. С. 166–169. [Chachoyan A.A., Shkulev V.A., Samvelyan K.G., Garibdzhanyan B.T., Papayan G.L. // Pharm. Chem. J. 1989. V. 23. P. 126–129.] <https://doi.org/10.1007/BF00764459>
47. Шкулев В.А., Адамян Г.Г., Агаджанян Ц.Е., Чачоян А.А., Гарибджанян Б.Г. // ХФЖ. 1995. Т. 29. С. 36–37. [Shkulev V.A., Adamyan G.G., Agadzhanyan T.E., Chachoyan A.A., Garibdzhanyan B.T. // Pharm. Chem. J. 1995. V. 29. P. 192–193.] <https://doi.org/10.1007/BF02219065>
48. Арутюнян Г.Л., Чачоян А.А., Шкулев В.А., Адамян Г.Г., Агаджанян Ц.Е., Гарибджанян Б.Г. // ХФЖ. 1995. Т. 29. С. 33–35. [Arutyunyan G.L., Chachoyan A.A., Shkulev V.A., Adamyan G.G., Agadzhanyan T.E., Garibdzhanyan B.T. // Pharm. Chem. J. 1995. V. 29. P. 188–191.] <https://doi.org/10.1007/BF02219064>
49. Sharabi-Ronen Y., Levinger S., Lellouche M.B., Albeck A. // Med. Chem. 2014. V. 10. P. 27–37. <https://doi.org/10.2174/15734064113099900002>
50. Jimenez J., Chakraborty I., Carrington S.J., Mascharak P.K. // ChemMedChem. 2014. V. 9. P. 1266–1274. <https://doi.org/10.1039/c6dt01358a>
51. Ryter S.W., Choi A.M.K. // Korean J. Intern. Med. 2013. V. 28. P. 123–140. <https://doi.org/10.3904/kjim.2013.28.2.123>
52. Wegiel B., Gallo D., Cszizmadia E., Harris C., Belcher J., Vercellotti G.M., Penacho N., Seth P., Sukhatme V., Ahmed A., Pandolfi P.P., Helczynski L., Bjartell A., Persson J.L., Otterbien L.E. // Cancer Res. 2013. V. 73. P. 7009–7021. <https://doi.org/10.1158/0008-5472>
53. Gabrielian A., Bocharova T.N., Smirnova E.A., Volodin A.A., Harutjunyan A., Harutjunyan G. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2011. V. 27. P. 1124–1125. <https://doi.org/10.1080/073911011010524986>
54. Gabrielian A., Bocharova T.N., Smirnova E.A., Volodin A.A., Harutjunyan A., Gevorkyan K., Harutjunyan G. // Biomol. Struct. Dyn. 2013. V. 31. P. 82–82. <https://doi.org/10.1080/07391102.2013.786370>
55. Мамаева О.К., Gabrielyan A.G., Arutyunyan G.L., Bocharov T.N., Smirnov E.A., Volodin A.A.,

- Shchyolkina A.K., Kaluzhnyaya D.N.* // Mol. Biol. 2014. V. 48. P. 741–748.
<https://doi.org/10.1134/S0026893314050100>
56. *Захаренко А.Л., Пономарев К.Ю., Суслов Е.В., Корчагина Д.В., Волчо К.П., Васильева И.А., Салахутдинов Н.Ф., Лаврик О.И.* // Биоорг. химия. 2015. Т. 41. С. 731–736. [*Zakharenko A.L., Ponomarev K.U., Suslov E.V., Korchagina D.V., Volcho K.P., Vasil'eva I.A., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2015. V. 41. P. 657–662.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162015060199>
57. *Cortes Ledesma F., El Khamisy S.F., Zuma M.C., Osborn K., Caldecott K.W.* // Nature. 2009. V. 461. P. 674–678.
<https://doi.org/10.1038/nature08444>
58. *Laev S.S., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I.* // Bioorg. Med. Chem. 2016. V. 24. P. 5017–5027.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.09.045>
59. *Wang W., Rodriguez-Silva, M., Acanda de la Rocha A.M., Wolf A.L., Lai Y., Liu, Y., Reinhold W.C., Pommier Y., Chambers J.W., Tse-Dinh Y.-C.* // Cancers. 2019. V. 11. P. 1416.
<https://doi.org/10.3390/cancers11101416>
60. *Beretta G., Cossa G., Gatti L., Zunino F., Perego P.* // Curr. Med. Chem. 2010. V. 17. P. 1500–1508.
<https://doi.org/10.2174/092986710790979971>
61. *Yang S.W., Burgin A.B., Huizenga B.N., Robertson C.A., Yao K.C. Nash H.A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. 1996. V. 93. P. 11534–11539.
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11534>
62. *Bailly C.* // Pharmacol. Res. 2019. 104398.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104398>
63. *Pommier Y., Leo E., Zhang H., Marchand C.* // Chem. Biol. 2010. V. 17. P. 421–433.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.04.012>
64. *Zakharenko A.L., Luzina O.A., Sokolov D.N., Kaledin V.I., Nikolin V.P., Popova N.A., Patel J., Zakharova O.D., Chepanova A.A., Zafar A., Reynisson J., Leung E., Leung I.K.-H., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I.* // Eur. J. Med. Chem. 2019. V. 161. P. 581–593.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.10.055>
65. *Chepanova A.A., Li-Zhulanov N.S., Sukhikh A.S., Zafar A., Reynissone J., Zakharenko A.L., Zakharova O.D., Korchagina D.V., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 647–655.
<https://doi.org/10.1134/s1068162019060104>
66. *Khomenko T.M., Zakharenko A.L., Chepanova A.A., Ilina E.S., Zakharova O.D., Kaledin V.I., Nikolin V.P., Popova N.A., Korchagina D.V., Reynisson J., Chand R., Ayine-Tora D.M., Patel J., Leung I.K.H., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 126.
<https://doi.org/10.3390/ijms21010126>
67. *Zakharenko A., Khomenko T., Zhukova S., Koval O., Zakharova O., Anarbaev R., Lebedeva N., Korchagina D., Komarova N., Vasil'ev V., Reynisson J., Volcho K., Salakhutdinov N., Lavrik O.* // Bioorg. Med. Chem. 2015. V. 23. P. 2044–2052.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.03.020>
68. *Ilina I.V., Dyrkheeva N.S., Zakharenko A.L., Sidorenko A.Yu., Li-Zhulanov N.S., Korchagina D.V., Chand R., Ayine-Tora D.M., Chepanova A.A., Zakharova O.D., Ilina E.S., Reynisson J., Malakhova A.A., Medvedev S.P., Zakian S.M., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I.* // Molecules. 2020. V. 25. P. 3496.
<https://doi.org/10.3390/molecules25153496>
69. *Gladkova E.D., Nechepurenko I.V., Bredikhin R.A., Chepanova A.A., Zakharenko A.L., Luzina O.A., Ilina E.S., Dyrkheeva N.S., Mamontova E.M., Anarbaev R.O., Reynisson J., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 7162.
<https://doi.org/10.3390/ijms21197162>
70. *Salomatina O.V., Popadyuk I.I., Zakharenko A.L., Zakharova O.D., Chepanova A.A., Dyrkheeva N.S., Komarova N.I., Reynisson J., Anarbaev R.O., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I., Volcho K.P.* // Steroids. 2021. V. 165. 108771.
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2020.108771>
71. *Golubovskaya V.M., Ho B., Zheng M., Magis A., Ostrov D., Morrison C., Cance W.G.* // BMC Cancer. 2013. V. 13. P. 342–348.
<https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-342>
72. *Martínez T.P., Navajas L.P., Lietha D.* // Biomolecules. 2020. V. 10. P. 179.
<https://doi.org/10.3390/biom10020179>
73. *Sabapathy K., Lane D.P.* // J. Mol. Cell. Biol. 2019. V. 11. P. 317–329.
<https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz010>
74. *Eisenbarth G., Michels A., Nakayama M., Ostrov D.* // U.S. Pat. Appl. Publ. 2012, US 9629848 B2.
75. *Kasama T., Strieter R.M., Lukacs N.W., Lincoln P.M., Burdick M.D., Kunkel, S.L.* // J. Clin. Invest. 1995. V. 95. P. 2868–2876.
<https://doi.org/10.1172/JCI117993>
76. *McMaster B.* // U.S. Pat. Appl. Publ. 2003, US 6727241 B2.
77. *Hossain N., Ivanova S., Bergare J., Eriksson T.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2013. V. 23. P. 1883–1886.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.12.095>
78. *Samhammer A., Holzgrabe U., Haller R.* // Arch. Pharm. (Weinheim). 1989. V. 322. P. 551–555.
<https://doi.org/10.1002/ardp.19893220908>
79. *Ponomarev K.Y., Pavlova A.V., Suslov E.V., Ardashov O.V., Korchagina D.V., Nefedov A.V., Tolstikova T.G., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F.* // Med. Chem. Res. 2015. V. 24. P. 4146–4156.
<https://doi.org/10.1007/s00044-015-1464-z>
80. *Syubaev R.D., Mashkovskii M.D., Shvarts G.Y., Pokryshkin V.I.* // Pharm. Chem. J. 1986. V. 20. P. 17–22.
<https://doi.org/10.1007/BF00766871>
81. *Scarpignato C., Hunt R.H.* // Gastroenterol. Clin. N. Am. 2010. V. 39. P. 433–464.
<https://doi.org/10.1016/j.gtc.2010.08.010>
82. *Silva R.O., Salvadori M.S., Sousa F.B.M., Santos M.S., Carvalho N.S., Sousa D.P., Gomes B.S., Oliveira F.A., Barbosa A.L.R., Freitas R.M., de Almeida R.N., Medeiros J.-V.R.* // Flavour. Fragr. J. 2014. V. 29. P. 184–192.
<https://doi.org/10.1002/ffj.319>
83. *Knynch H.K., Steffey E.P., Casbeer H.C., Mitchell M.M.* // Equine. Vet. J. 2014. V. 47. P. 592–598.
<https://doi.org/10.1111/evj.12318>
84. *Craft R.M., Clark J.L., Hart S.P., Pinckney M.K.* // Pharmacol. Biochem. Behav. 2006. V. 85. P. 850–858.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.11.022>
85. *Marshall R., Kearney-Ramos T., Brents L.K., Hyatt W.S., Tai S., Prather P.L., Fantegrossi W.E.* //

- Pharmacol. Biochem. Behav. 2014. V. 124. P. 40–47.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.05.010>
86. *Lewanowitsch T., Moller J.H., Irvine R.J.* // *Life Sci.* 2006. V. 78. P. 682–688.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.05.062>
87. *Booker L., Naidu P.S., Razdan R.K., Mahadevan A., Lichtman A.H.* // *Drug. Alcohol. Depend.* 2009. V. 105. P. 42–47.
<https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2009.06.009>
88. *Longo V.G., Silvestrini B., Bovet D.* // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1959. V. 126. P. 41–49.
89. *Chiavarelli S., Fennoy L.V.* // *J. Org. Chem.* 1961. V. 26. P. 4895–4898.
<https://doi.org/10.1021/jo01070a028>
90. *Chiavarelli S., Fennoy L.V., Settimij G., De Baran L.* // *J. Med. Pharm. Chem.* 1962. V. 5. P. 1293–1297.
<https://doi.org/10.1021/jm01241a020>
91. *Агаджанян Ц.Е., Арутюнян Г.Л., Авакян О.М., Калтрикян А.А., Вартамян С.А.* // Авторское свидетельство СССР № 1221878, 17.08.1984, SU 1221878 A1.
92. *Arutyunyan G.L., Dzhagatspanyan I.A., Nazaryan I.M., Akopyan A.G., Arutyunyan A.D.* // *Pharm. Chem. J.* 2007. V. 41. P. 591–593.
<https://doi.org/10.1007/s11094-008-0025-x>
93. *Agadzhanian Ts.E., Arutyunyan A.D., Stepanyan N.O., Bunatyan Zh.M.* // *Pharm. Chem. J.* 1997. V. 31. P. 15–16.
<https://doi.org/10.1007/BF02464677>
94. *Якушев П.Ф., Кузнецов А.И., Дуракова Л.И., Ковалев И.Е., Унковский Б.В.* // Авторское свидетельство СССР № 536673, 25.10.1977, SU 536673 A1.

Azaadamantanes – a New Perspective Scaffold for Medical Chemistry

E. V. Suslov*, K. Yu. Ponomarev*, K. P. Volcho*, #, and N. F. Salakhutdinov*

#Phone: +7 (383) 330-88-70; e-mail: volcho@nioch.nsc.ru

*Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS, prosp. Akad. Lavrentieva 9, Novosibirsk, 630090 Russia

Azaadamantanes are nitrogen containing analogs of adamantane, in which one or more carbon atoms are substituted for nitrogen. Such substitution leads to a number of specific properties, both chemical and physical. Azaadamantane derivatives have less lipophilicity compared to their adamantane analogues, which affects, in particular, both their interaction with biological targets and bioavailability. The significant increase in number of publications devoted to study of reactivity and biological activity of azaadamantanes and their derivatives during the last decade (2009–2020) indicates a great theoretical and practical interest in them. Compounds with pronounced biological activity have been already discovered among azaadamantane derivatives. The review is devoted to the biological activity of azaadamantanes and their derivatives. It presents the main methods for the synthesis of di- and triazaadamantanes as well as summarizes and discusses available data on the results of the studies of the biological activity of azaadamantanes. The prospects for the use of azaadamantanes in medical chemistry and pharmacology are discussed.

Keywords: diazaadamantanes, triazaadamantanes, framework compounds, medicinal chemistry, pharmacology, biological activity, antiviral activity, antimicrobial activity, antitumor activity



УДК 616.858:541.69

РОЛЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ЭТИОЛОГИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА. ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА¹

© 2021 г. А. В. Лаврова*, Н. М. Грецкая*, В. В. Безуглов*

**ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 02.03.2021 г.

После доработки 15.03.2021 г.

Принята к публикации 19.03.2021 г.

Этиология болезни Паркинсона окончательно не установлена. Однако известно, что ключевой фактор, инициирующий и ускоряющий нейродегенерацию, — окислительный стресс. Отсутствие четкого понимания этиологии заболевания и отложенная манифестация симптомов болезни осложняют проведение профилактики и разработку препаратов для этиотропной терапии болезни Паркинсона. Тем не менее современная медицина способна поддерживать уровень качества жизни пациента, осуществляя симптоматическое лечение препаратами, повышающими уровень дофамина и тем самым устраняющими моторные симптомы болезни. В данной статье рассматриваются механизмы окислительного стресса в дофаминергических нейронах, приводится обзор современных средств для терапии болезни Паркинсона, поддерживающих уровень дофамина в синапсах, а также предлагается перспективный подход, направленный на устранение окислительного стресса в клетках дофаминергической системы.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, дофаминергическая система, окислительный стресс, митохондриальная дисфункция, леводопа, дофаминовый транспортер, агонисты дофамина, ингибиторы обратного захвата дофамина

DOI: 10.31857/S0132342321050304

ВВЕДЕНИЕ

По разным оценкам, количество пациентов с болезнью Паркинсона в мире колеблется в диапазоне 5–35 новых случаев на 100 тыс. человек в год.

¹ Статья публикуется по материалам доклада, представленного на конференции “Липиды 2021” 11–13 октября 2021 г.).

Сокращения: БП — болезнь Паркинсона; ЭТЦ — электрон-транспортная цепь; ААДС — декарбоксилаза ароматических L-аминокислот; ARE — элемент антиоксидантного ответа; СА — катехоламины; СЛ — кардиолипин; СОМТ — катехол-О-метилтрансфераза; ДА — дофамин; ДАК — дофамин-хинон; ДАТ — транспортер дофамина; НМОХ-1 — гемоксигеназа-1; 4-ННЕ — 4-гидроксинонелаль; 5-НТ — 5-гидрокситриптамин (серотонин); НВА — гомованилиновая кислота; Keap1 — Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1; L-DOPA — 3,4-дигидроксифенилаланин (леводопа); MAO — моноаминоксидаза; МРТР — 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин; NADH — восстановленная форма никотинамидаденидинуклеотида; NE — норадреналин; NET — транспортер норадреналина; 6-OHDA — 6-гидроксидафамин; PGC-1 α — коактиватор-1 α гамма-рецептора, активируемого пролифератором пероксисом; PKC — протеинкиназа C; ROS — активные формы кислорода; SAR — взаимосвязь структура–активность; SERT — транспортер серотонина; SOD — супероксиддисмутаза; TH — тирозингидроксилаза; TLCL — тетралинолеилкардиолипин; VMAT2 — везикулярный транспортер моноаминов 2.

Автор для связи: (тел. +7 (495) 330-65-92; эл. почта: alinalavrova1@gmail.com).

Как правило, болезнь Паркинсона редко встречается у пациентов в возрасте до 50 лет [1], однако в группах 60–90 лет количество пациентов с диагнозом болезнь Паркинсона увеличивается в 5–10 раз [1–3]. Согласно прогнозам, число людей с болезнью Паркинсона удвоится к 2030 г. [4]. Предполагается, что число зарегистрированных случаев болезни Паркинсона увеличилось в связи с распространением и улучшением медицинского обслуживания и, как следствие, увеличением продолжительности жизни [5].

Этиология болезни Паркинсона остается неизвестной, хотя установлено, что ключевой фактор, инициирующий и ускоряющий нейродегенерацию, — окислительный стресс. Эпидемиологические исследования указывают на генетическую предрасположенность в сочетании с негативным действием окружающей среды как факторов риска возникновения спорадического типа болезни Паркинсона. Например, заболеваемость болезнью Паркинсона значительно выше у людей, подвергавшихся воздействию пестицидов или получивших черепно-мозговые травмы, и при этом ниже у потребителей кофеина и табака [6].

Особенность развития болезни Паркинсона состоит в том, что в течение длительного времени

у пациента не наблюдается никаких симптомов болезни, что связывают с компенсаторными механизмами мозга [7]. Течение болезни Паркинсона характеризуют два типа симптомов: моторные и немоторные. Именно появление первых моторных симптомов (тремора, гипокинезии, мышечной ригидности, поструральной неустойчивости) дает основания для постановки диагноза. К этому времени, по разным оценкам, гибнет 60–80% дофаминергических нейронов черной субстанции, что вызывает недостаток дофамина в синапсах [8].

Отсутствие четкого понимания этиологии заболевания и отсроченное проявление симптомов болезни не позволяют разработать профилактические меры и препараты для этиотропной терапии болезни Паркинсона. Тем не менее современная медицина способна поддерживать уровень качества жизни пациента, осуществляя симптоматическое лечение препаратами, повышающими уровень дофамина и тем самым устраняющими моторные симптомы болезни [8].

В данном обзоре рассматриваются механизмы окислительного стресса в дофаминергических нейронах, а также перспективные подходы к те-

рапии болезни Паркинсона, направленные на поддержание уровня дофамина и устранение окислительного стресса в клетках дофаминергической системы.

БИОСИНТЕЗ И ДЕГРАДАЦИЯ ДОФАМИНА

Классический путь биосинтеза дофамина (DA) был установлен в 1939 г. [9]. Двухэтапный биосинтез DA происходит в цитозоле катехоламинергических нейронов и начинается с гидроксирования L-тирозина по фенольному кольцу при участии тирозингидроксилазы (TH) с образованием L-DOPA. L-DOPA затем декарбоксилируется до DA с помощью декарбоксилазы ароматических аминокислот (AADC, также известной как L-DOPA-декарбоксилаза). Помимо этого классического пути биосинтеза было показано, что опосредованный цитохромом P450 путь существует у крыс *in vivo* (схема 1) [10, 11]. На этом пути декарбоксилирование предшествует гидроксированию, поэтому тирозин декарбоксилируется до тирамина, который затем может гидроксироваться белками CYP2D.

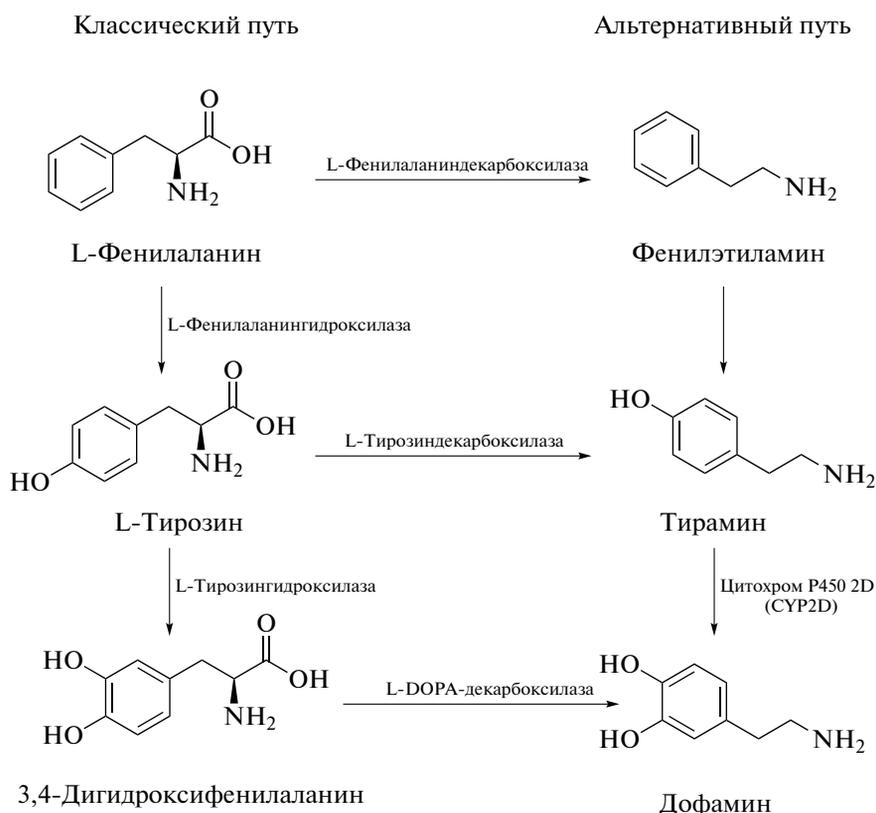


Схема 1. Классический и альтернативный пути биосинтеза дофамина в нейронах мозга [11].

Хотя вклад Cyp2D-опосредованного пути синтеза DA, по-видимому, невелик, он может стать важным в определенных условиях. Другой воз-

можный путь биосинтеза DA – катализируемое тирозингидроксилазой гидроксирование тирозина и последующее поглощение L-DOPA ка-

техоламинергическими нейронами. Тирозиназа обычно участвует в биосинтезе периферических эумеланинов и феомеланинов [12], а у ТН-отрицательных мышечных этот путь — основной источник катехоламинов (CA). Тем не менее у мышечных альбиносов, лишенных тирозиназы, все еще, по-видимому, есть некоторый источник CA [13]. Неясно, производится ли этот оставшийся DA по пути Суp2D или все же существуют другие механизмы.

В катехоламинергических нейронах DA депонируется в синаптических везикулах посредством вторичного активного транспорта через везикулярный транспортер моноаминов 2 (VMAT2) [14]. Внутри этих везикул DA, склонный к окислению, стабилизируется слабнокислым pH [15], что предотвращает окислительный стресс в цитозоле [16]. Окислительный стресс в дальнейшем сводится к минимуму благодаря ассоциации биосинтетических ферментов DA и AADC с VMAT2 [17].

Высвобождение DA в синаптическую щель происходит в результате экзоцитоза. DA попадает в синапс, связывается и активирует DA-рецепторы [18]. После того, как на постсинаптическом нейроне возникает потенциал действия, молекулы DA диссоциируют от своих рецепторов и поглощаются обратно в пресинаптическую клетку посредством обратного захвата, опосредованного

переносчиком дофамина (DAT) [19]. Вернувшись в цитозоль, дофамин может либо расщепляться моноаминоксидазой, либо повторно упаковываться в везикулы с помощью VMAT2, что делает его доступным для последующего высвобождения [20].

В деградации DA участвуют моноаминоксидазы типа А и В, альдегиддегидрогеназа и катехол-*O*-метилтрансфераза (схема 2). Моноаминоксидаза MAO-В катализирует дезаминирование дофамина и последующее окисление, что приводит к образованию 3,4-гидроксифенил-ацетальдегида (DOPAL). На втором этапе фермент альдегиддегидрогеназа (AD) катализирует образование 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (DOPAC), метилирование которой по 3-гидроксигруппе приводит к образованию гомованилиновой кислоты (HVA) [21]. Поскольку HVA — основной продукт метаболизма дофамина, а ее концентрация в физиологических жидкостях организма находится в прямой корреляции с уровнем дофамина, предлагается использовать измерение концентрации HVA в спинномозговой жидкости для определения стадии болезни Паркинсона и для мониторинга эффективности фармакологической терапии заболевания [22].



Схема 2. Деградация дофамина происходит при последовательном действии ферментов моноаминоксидазы (MAO), альдегиддегидрогеназы (AD) и катехол-*O*-метилтрансферазы (COMT). DOPAL — 3,4-гидроксифенил-ацетальдегид; DOPAC — 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота; HVA — гомованилиновая кислота [21].

БЕЛОК-ПЕРЕНОСЧИК ДОФАМИНА (DAT)

Структура и функция DAT. Белок плазматической мембраны DAT, ответственный за обратный захват DA из внеклеточного пространства, — ключевой регулятор дофаминергической нейротрансмиссии в ЦНС млекопитающих [19, 23]. Несмотря на то, что существуют ферменты, осуществляющие деградацию дофамина, DAT-опосредованный транспорт выступает основным механизмом выведения дофамина из внеклеточного пространства [24, 25]. Кроме того, именно транспорт через DAT формирует временную и пространственную динамику действия DA на постсинаптические рецепторы [26, 27].

DAT впервые секвенировали и клонировали в 1991 г. [28, 29]. DAT — высококонсервативный для млекопитающих белок семейства Na⁺, Cl⁻-зависимых транспортеров растворенных веществ (SLC6). Кристаллическая структура DAT человека до сих пор не получена, однако удалось закристаллизовать близкородственный бактериальный переносчик лейцина. Долгое время он был основ-

ным источником для структурно-функциональных моделей DAT, пока не получили структуру транспортера *Drosophila melanogaster* — dDAT. Эти исследования позволили выявить несколько сайтов связывания лекарств, среди которых — кокаин и антидепрессанты [30, 31].

Длина белка DAT человека составляет 620 а.о., которые упорядочены в 12 трансмембранных доменов. N- и C-концевые регуляторные домены расположены в цитоплазме клетки и служат первичными областями для посттрансляционных модификаций DAT и белковых взаимодействий в цитоплазматическом пространстве [32].

На структуре dDAT показано, что домены 1–5 и 6–10, так называемый LeuT-фолд, образуют две группы псевдосимметричных доменов, которые транспортируют DA через лиганд-связывающее ядро, образованное трансмембранными областями 1, 3, 6 и 8 [29, 33]. Эти домены связаны DA и его ионными носителями, Na⁺ и Cl⁻, для облегчения транспорта через мембрану [31]. Общепринятая модель функционирования DAT предполага-

ет, что DA переносится через плазматическую мембрану в результате перехода конформаций DAT от обращенной наружу к обращенной внутрь, что обусловлено симпортом Na^+ и Cl^- вдоль их градиентов концентрации [34]. Этот процесс инициируется одной молекулой DA, связывающейся в кармане, образованном трансмембранными доменами 1, 3, 6 и 8. Связывание двух ионов Na^+ и одного иона Cl^- с этим карманом вызывает конформационное изменение DAT от наружной стороны к внутренней, высвобождая DA, ионы Na^+ и Cl^- в цитоплазму.

Высвобождение субстрата возвращает конформацию DAT от обращенной внутрь к обращенной наружу. В этой модели DA стехиометрически переносится через мембрану, транспорт сильно зависит от концентрации внеклеточного Na^+ [35]. DAT создает сложный электрогенный ток, связанный с транспортом субстрата, когда Na^+ и Cl^- перемещаются в клетку вдоль градиентов их концентрации. В дополнение к стехиометрическому току, вызываемому транспортом субстрата, перенос субстрата также создает анионный ток, что приводит к более значительному, чем ожидалось, движению заряда [36]. В основе транспорта субстрата DAT имеет небольшой ток утечки, который неселективно транспортирует катионы и блокируется как субстратами, так и ингибиторами захвата (например, кокаином). Эти опосредованные и неопосредованные дофамином токи напрямую изменяют возбудимость мембраны и могут влиять на высвобождение DA [36, 37]. Предполагается, что данная особенность также играет роль в индуцированном стимулятором (например, амфетамином) оттоке DA через DAT [38]. Усиление или ухудшение свойств DAT как ионного канала может использоваться для разработки уникального способа управления дофаминергическим мембранным потенциалом, однако эти особенности регуляции и функционирования DAT еще недостаточно исследованы.

Регуляция миграции DAT. Локализованный в плазматической мембране DAT подвержен сложным механизмам регуляции. Белок постоянно перемещается из внутриклеточного пространства в мембрану клетки и обратно, и некоторые экзогенные и эндогенные агенты могут оказывать влияние на этот процесс. В частности, было показано, что амфетамины вызывают интернализацию транспортера, о чем свидетельствует снижение активности DAT [39–41]. Воздействие кокаина, напротив, усиливает поверхностную экспрессию DAT в культуре клеток НЕК [42], а также у хронических потребителей кокаина [43].

Также имеются данные, свидетельствующие о том, что активация рецепторов D2 и D3 связана с изменениями уровня мембранного DAT [44, 45], что дает основание предположить возможность

регулирования миграции DAT самим эндогенным агонистом, т.е. DA. Кроме того, киназы, осуществляющие фосфорилирование белковой молекулы, напрямую или косвенно регулируют миграцию DAT. Например, β -изоформа протеинкиназы C (PKC) опосредует некоторые механизмы эндоцитоза, индуцированные амфетаминами, D2-рецепторами и фторболовыми эфирами [45–47]. Следует отметить, что амфетамины индуцируют эндоцитоз DAT как через PKC-зависимые, так и PKC-независимые механизмы. Некоторые данные указывают на то, что вызванная PKC интернализация DAT опосредована внутриклеточным белком клатрином – компонентом оболочки окаймленных пузырьков, образующихся при эндоцитозе [48, 49]. PKC-зависимый эндоцитоз может инициироваться фосфорилированием или убиквитилированием по N-концевым остаткам, что способствует более высоким скоростям деградации [50–52].

Другие киназы, напрямую или опосредованно взаимодействующие с DAT, запускают митоген-активируемую протеинкиназу (MAPK), ингибирование которой приводит к снижению содержания DAT в клеточной мембране клеток НЕК, и фосфатидилинозитол-3-киназу (PI-3-K), ингибирование которой также приводит к интернализации DAT [53, 54]. Опосредованное D2-рецептором регулирование миграции DAT также чувствительно к ингибированию MAPK [55]. Хотя было показано, что богатые холестерином и липидами мембранные рафты регулируют перераспределение DAT на клеточной поверхности, роль мембранного белка флотиллина-1, участвующего в процессе эндоцитоза, в отношении регуляции миграции DAT выяснена не до конца [56–58]. Направленная миграция DAT примерно одинакова для липидных рафтов и нерафтовых доменов мембраны [56], а важность холестерина в кинетической регуляции DAT подразумевает, что могут существовать механизмы, которые направляют DAT в богатые холестерином мембранные домены или из них. Также важно, что мембранный потенциал может регулировать миграцию DAT [36, 59]. Таким образом, эти исследования показывают, что на уровень экспрессии DAT, а следовательно, и на дофаминергический тонус, влияют внеклеточная передача сигналов, метаболизм холестерина и мембранный потенциал.

Дофаминергическая система задействована в различных нейробиологических процессах, включая развитие лекарственной зависимости [60, 61], появление мотивации [62], эмоциональное возбуждение [63, 64] и развитие моторных дисфункций [64], поэтому знания об особенностях функционирования и регуляции DAT, который выступает ключевым игроком дофаминергической системы, чрезвычайно важны для создания новых терапевтически активных соединений, а для терапии болезни Паркинсона DAT – новая перспек-

тивная мишень. В настоящее время ведется активный поиск новых селективных ингибиторов обратного захвата DA для поддержания физиологического уровня дофамина в синапсах, а также рассматривается возможность создания нацеленных на DAT препаратов для замедления развития патологических процессов, протекающих в дофаминергических нейронах при болезни Паркинсона [65–68].

БОЛЕЗНЬ ПАРКИНСОНА

Патологические признаки болезни Паркинсона.

Характерные особенности болезни Паркинсона – дегенерация дофаминергических нейронов в области черной субстанции, а также накопление внутриклеточного белка (α -синуклеина).

На ранней стадии заболевания дегенерация дофаминергических нейронов ограничена вентролатеральной областью черной субстанции с относительным сохранением других дофаминергических нейронов [69, 70]. Однако на конечной стадии заболевания дегенерации подвергаются остальные нейроны среднего мозга. Кроме того, было показано, что при манифестации первых внешних симптомов заболевания потеря дофаминергических нейронов составляет 60–80%, что также свидетельствует о том, что дегенерация в этой области начинается задолго до появления двигательных симптомов [71, 72].

Другой патологический признак болезни Паркинсона – отложение белка α -синуклеина в цитоплазме определенных нейронов в различных областях мозга [72]. Тельца Леви, которые в основном состоят из агрегированного α -синуклеина, были описаны более века назад [73]. Патология Леви первоначально возникает в холинергических и моноаминергических нейронах ствола мозга и в нейронах обонятельной системы, но также обнаруживается в лимбических и неокортикальных областях мозга по мере прогрессирования заболевания.

Гипотеза о том, что первые патологические агрегаты α -синуклеина образуются в кишечнике или периферической нервной системе (ПНС) и проникают в ЦНС по блуждающему нерву, не нашла строгого подтверждения или, во всяком случае, – не единственно верная, т.к. у небольшой части пациентов не была обнаружена патология в дорсальном двигательном ядре блуждающего нерва [73]. В работах [74, 75] предполагается, что по этиологии болезнь Паркинсона может быть разделена на два подтипа: ПНС-опосредованная и ЦНС-опосредованная.

Хотя наследственные формы составляют только 5–10% от всех случаев БП, их исследование позволило получить важную информацию о механизмах, лежащих в основе нейропатологии бо-

лезни Паркинсона. Некоторые из белков, кодируемых генами, ассоциированными с болезнью Паркинсона, участвуют в ряде молекулярных путей, которые при нарушении могут вызывать нейропатологию, которая напоминает спорадический вид болезни Паркинсона или не отличается от него. Кроме того, крупные исследования в области генома (GWAS) позволили выявить ряд генов, ассоциированных с БП, и обнаружить поражение некоторых из этих генов при спорадической форме болезни Паркинсона [76]. Среди них гены, которые отвечают за протеостаз α -синуклеина, митохондриальную функцию, окислительный стресс, гомеостаз кальция, транспорт аксонов и нейровоспаление.

В данной работе особое внимание уделено митохондриальной дисфункции и окислительному стрессу как ключевым факторам дегенерации дофаминергических нейронов.

Митохондриальная дисфункция при болезни Паркинсона. Митохондрии – первичные внутриклеточные источники активных форм кислорода (ROS), уровень которых повышается в процессе старения [77]. Митохондриальная продукция АТФ усиливает нейрональную активность и поддерживает клеточный гомеостаз, который достигается за счет окислительного фосфорилирования в митохондриальной электрон-транспортной цепи (ЭТЦ).

Перенос электронов из комплексов I и III ЭТЦ к O_2 происходит естественным образом в неповрежденных митохондриях млекопитающих [78, 79] и генерирует супероксид-радикалы (O_2^-) в качестве физиологического побочного продукта получения энергии. Эти ROS могут инициировать образование гидроксильных радикалов ($\cdot OH$), которые, как считается, – посредники в первичном окислительном повреждении нейронов как внутри, так и снаружи митохондрий после их диффузии в цитозоль [80].

Для нейтрализации супероксид-радикалов O_2^- митохондрии эукариот содержат две супероксиддисмутазы (SOD1 и SOD2), которые детоксифицируют O_2^- в менее токсичную перекись водорода H_2O_2 [81]. Митохондриальная H_2O_2 , продуцируемая SOD1 и SOD2, разлагается до O_2 и H_2O при участии специфических митохондриальных глутатионпероксидаз (GPx1/4) [82] и пероксиредоксинов (PRx3/5) [83].

При этом более длительный период полураспада H_2O_2 и большая скорость ее диффузии из митохондрий в другие клеточные компартменты позволяют ей действовать как эффективной окислительно-восстановительной сигнальной молекуле [84, 85]. Так, перекись водорода осуществляет обратимую окислительную модификацию белков, особенно тиоловых групп остатков

цистеина, которые выполняют роль окислительно-восстановительного “переключателя”, изменяя физиологические функции белка, стимулируя альтернативные функции белка или облегчая вторичные взаимодействия [84–86]. Таким образом, эффективная регуляция митохондриального уровня H_2O_2 эндогенными антиоксидантными путями – важный механизм для поддержания физиологической окислительно-восстановительной сигнализации и гомеостаза.

Повышенная генерация ROS митохондриями в черной субстанции при болезни Паркинсона связана с серьезным нарушением в ЭТЦ и окислительными повреждениями, дополнительно вызванными токсинами и пестицидами из окружающей среды, а также генетическими мутациями [87]. Ряд токсинов, используемых в качестве инсектицидов и пестицидов, включая аналоги 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МРТР) и ротенон, свободно проникают через желудочно-кишечный тракт и органы дыхания в липидные мембраны и накапливаются в митохондриях [88–91]. Оказавшись внутри митохондрий, они значительно нарушают окислительно-восстановительную активность митохондриального комплекса I, блокируя поток электронов от NADH-дегидрогеназы к коферменту Q [92, 93], способствуя значительному образованию O_2^- и уменьшая синтез АТФ. Важно отметить, что введение МРТР приводит только к временному снижению уровня АТФ на 20% в полосатом и среднем мозге у мышей *in vivo*. Эти данные указывают на то, что измененная митохондриальная функция сама по себе не может быть автоматически приравнена к энергетической недостаточности: пониженная энергетическая функция ухудшает функционирование нейрона, но все же совместима с выживанием [94, 95].

В дополнение к химическим факторам окружающей среды, почти все известные генетические мутации, связанные с болезнью Паркинсона, приводят к ухудшению активности митохондриального комплекса I и связанной с этим продукции ROS, хотя и через разные молекулярные пути.

Активность митохондриального комплекса I, компонента ЭТЦ, снижается в некоторых тканях пациентов с болезнью Паркинсона [96, 97]. У пациентов с болезнью Паркинсона наблюдается низкий уровень экспрессии генов, контролирующей клеточную биоэнергетику и экспрессирующихся в ответ на действие коактиватора-1 α (PGC-1 α) γ -рецептора, активируемого пероксисомным пролифератором (PPAR γ) [98]. Предполагается, что в норме уровень α -синуклеина в митохондриях низкий, а его накопление внутри митохондрий приводит к дефициту митохондриального

комплекса I и окислительному стрессу [99]. Активация PGC-1 α способствует снижению олигомеризации α -синуклеина и токсичности *in vitro*, тогда как индуцированный методом нокдауна ген дефицит PGC-1 α повышает уязвимость к олигомерам α -синуклеина. При этом есть и обратная зависимость: олигомеризация α -синуклеина приводит к снижению уровня клеточного PGC-1 α [100].

В моделях на животных введение некоторых токсинов, которые нарушают функцию митохондрий, повторяет особенности невропатологии болезни Паркинсона [96, 97]. При избирательной деплеции митохондриального транскрипционного фактора A, необходимого для экспрессии митохондриальной ДНК, митохондрии в дофаминергических нейронах черной субстанции развивают дефектную цепь транспорта электронов, что приводит к дегенерации нейронов у взрослых мышей MitoPark [101].

Взрослые мыши, у которых отсутствует один аллель En1 (кодирует белок engrailed 1, стимулирующий ядерную трансляцию белков митохондриального комплекса NADH-убихинон-оксидоредуктазы), демонстрируют некоторые важные признаки невропатологии болезни Паркинсона, такие как нейровоспаление и прогрессирующая гибель дофаминергических нейронов после ретроградной дегенерации аксонов [102]. Важно отметить, что дегенерация аксонов, возможно, из-за дефицита энергии, может быть первичным и ранним нейродегенеративным явлением при болезни Паркинсона. Томографические исследования головного мозга человека показали изменения в полосатом теле у людей с болезнью Паркинсона уже за несколько лет до постановки диагноза [103, 104]. Кроме того, посмертные исследования больных БП показывают, что nigrostriальные терминальные аксоны стали дисфункциональными или дегенерировали за несколько лет до гибели тел нейрональных клеток черной субстанции [105]. Однако было высказано и альтернативное объяснение аксональной дегенерации, которое состоит в том, что агрегаты α -синуклеина становятся препятствием для нормального аксонального транспорта [72].

Исследования продуктов экспрессии генов, ассоциированных с болезнью Паркинсона, позволили подтвердить гипотезу о том, что развитие митохондриальной недостаточности – ключевое событие в процессе развития заболевания. Так, мутации гена *LRRK2* связаны не только с изменениями аутофагии, но также с дефектами митохондрий [97], а белки, кодируемые генами аутосомно-рецессивного заболевания Паркинсона *PARK2* и *PINK1*, участвуют в устранении повре-

жденных митохондрий посредством митофагии [106].

Связь окислительного стресса и митохондриальной дисфункции при болезни Паркинсона: роль антиоксидантной системы Nrf2/ARE. Фактор транскрипции NF-E2 (Nrf2) контролирует экспрессию более 250 генов, отмеченных сайтом связывания элемента антиоксидантного ответа (ARE) [107]. Его цитозольный репрессор, Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1 (Keap1), чувствителен к окислительному стрессу в клетке. Изменение конформации Keap1 под действием окислительного стресса приводит к диссоциации комплекса Nrf2–Keap1 и транспортировке фактора Nrf2 в ядро клетки. Попав в ядро, Nrf2 связывается с транскрипционным ARE в промоторах и образует гетеродимеры с белками семейства Maf для активации транскрипции генов, регулирующих последующие звенья сигнальных каскадов. Таким образом, белковый комплекс Nrf2–Keap1 действует как клеточный редокс-сенсор и поддерживает окислительно-восстановительный гомеостаз, регулируя транскрипцию антиоксидантных генов [108].

Функционирование системы Nrf2/ARE зависит от возраста и наличия нейродегенеративных заболеваний. Патологоанатомический анализ разных тканей при болезнях Паркинсона и Альцгеймера выявил 54 пораженных гена, из них 31 ген содержит ARE [109]. Важно отметить, что при этом одновременно наблюдается повышение экспрессии фактора Nrf2 и фактора Maf-F, с которым Nrf2 образует гетеродимер, а также подавление экспрессии целевых генов. Кроме того, было показано, что с возрастом снижается экспрессия некоторых важных цитопротекторных генов, чувствительных к действию фактора Nrf2: супероксиддисмутазы 2 (SOD2), глутатионпероксидазы (GPX), глутатион-S-трансферазы (GST), глутаматцистеинлигазы (GCL), гемоксигеназы HMOX-1 и NAD(P)-хинондегидрогеназы (NQO1) [110].

Как уже отмечалось выше, в случае окислительного повреждения митохондрии производят повышенное количество ROS. Затем ROS активируют Nrf2, связанный с Keap1 в цитоплазме, и он перемещается в ядро для активации транскрипции генов, несущих элемент ARE, что, в свою очередь, активирует систему антиоксидантной защиты и митохондриальный биогенез. В этом пути также участвуют гены, связанные с болезнью Паркинсона. Установлено, что *DJ-1* ингибирует окислительное повреждение митохондрий. Другой ген, связанный с болезнью Паркинсона, — *PINK*, предотвращающий нарушение мембранного потенциала митохондрий и апоптоз, противодействуя высвобождению цитохрома *c*. Кроме того, было обнаружено, что высвобождение цитохрома *c*, который приводит к акти-

вации каспаз и апоптозу нейронов, также ингибирует белок паркин. Убиквитин-связывающий белок p62 играет роль в активации Nrf2. Было показано, что p62 взаимодействует с Keap1 и транспортирует его для аутофагической деградации, тем самым обеспечивая непрямую активацию Nrf2. Интересно, что белок p62 также имеет ARE в области промотора, активируемый фактором Nrf2, что создает положительную петлю обратной связи между Nrf2 и p62 [111].

Существует множество экспериментальных данных, подтверждающих положительные эффекты активации Nrf2 для улучшения функционирования митохондрий при нейродегенеративных расстройствах. Например, антиоксидант MitoQ, нацеленный в митохондрии, способствует улучшению течения неврологического расстройства у мышей с черепно-мозговой травмой, предположительно активируя систему Nrf2/ARE [112]. В клетках Neuro2A (N2A) *трет*-бутилгидрохинон (TBHQ) активировал Nrf2 и тем самым способствовал ослаблению трансгена мутантного α -синуклеина (A53T), подавляющего митохондриальное дыхание [113]. Интересно, что даже вызванное физическими упражнениями увеличение биогенеза митохондрий и экспрессии антиоксидантных генов, таких как SOD1 и SOD2 в мышцах, опосредовано ROS- и RNS-индуцированной активацией Nrf2 [114]. Было показано, что уровни острой физической нагрузки, связанной с SOD2 и GSH, линейно коррелировали с активацией Nrf2 в скелетных мышцах экспериментальных животных [115].

Антиоксидантная система Nrf2/ARE также регулирует синтез и восстановление глутатиона, влияя на экспрессию каталитической субъединицы глутаматцистеинлигазы (GCLC) и глутатионредуктазы (GSR1) [116, 117]. Данное свойство имеет решающее значение для контроля ROS, генерируемых митохондриями. Установлено, что уровень глутатиона в нейронах снижается при болезни Паркинсона, однако он может быть восстановлен активацией Nrf2 [118, 119]. В ряде работ на различных клеточных линиях было показано, что диметилфумарат, одобренный для терапии рассеянного склероза, способствует увеличению уровня глутатиона, активируя Nrf2 и далее индуцируя гены *GCLC*, *GCLM* и *GSR* [119–121].

Таким образом, к настоящему моменту имеется достаточно доказательств, подтверждающих, что антиоксидантная система Nrf2/ARE играет важную роль при нейродегенеративных нарушениях, в том числе при болезни Паркинсона, т.к. регулирует уровень ROS в клетке.

Влияние окислительного стресса на метаболизм дофамина. Значительные количества ROS вырабатываются в дофаминергических нейронах черной субстанции и окружающей глии в результате

окислительного метаболизма дофамина [122]. Окислительное дезаминирование дофамина моноаминоксидазами приводит к образованию H_2O_2 в качестве побочного продукта, тогда как ферментативное окисление катехольной группы дофамина при участии циклооксигеназы, тирозиназы и других ферментов – к образованию O_2^- [123]. Кроме того, окисление дофамина также может происходить при взаимодействии с лабильным железом, генерируя ROS (H_2O_2 , O_2^- , $\cdot OH$), прооксидантные дофаминхиноны (DAQ) и множество других нейротоксинов [124, 125].

Из перечисленных метаболитов дофамина дофаминхиноны представляют особый интерес, т.к. помимо собственной способности алкилировать белковые тио- и аминогруппы, они – предшественники потенциально опасных прооксидантных производных дофамина [126]. Один из таких производных DAQ – сальсолинол, усиливающий окислительный стресс и повреждение митохондрий, подавляя функцию ЭТЦ [127]. Другое производное, 6-гидроксидофамин (6-OHDA), способствует генерации значительных количеств O_2^- , ингибируя митохондриальные комплексы ЭТЦ I и IV [128].

Кроме того, DAQ, как и L-DOPA, способен превращаться в полимер нейромеланин. Считается, что нейромеланин выполняет функцию связывания и депонирования свободного дофамина, а также участвует в регуляции катионов Fe^{2+} и связывает ряд токсичных катионов металлов (цинк, медь, марганец, хром, кобальт, ртуть, свинец, кадмий) и некоторых других соединений (производные сальсолинола, МРТР) [129]. Таким образом, нейромеланин играет важную роль в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза в нейронах. Однако превращение DAQ в нейромеланин происходит сравнительно медленно, поэтому исследователи предположили, что существуют механизмы детоксикации DAQ. В работе Naque et al. [130] на клетках нейробластомы SH-SY5Y было показано, что токсическое действие DAQ предотвращается в присутствии SOD1 и восстановленной формы глутатиона.

Таким образом, основная причина гибели нейронов при болезни Паркинсона – окислительный стресс, запускающий сложный дегенеративный каскад, инициирующий и ускоряющий гибель нейронов. Эндеогенные антиоксиданты функционируют в интегрированной и скоординированной сети, поэтому антиоксидантная терапия должна быть направлена сразу на несколько мишеней.

4-Гидрокси-2-ноненаль – важнейший маркер перекисного окисления липидов. Митохондрии представляют собой уникальные органеллы с двумя мембранами. Нарушение структурной целостности

мембранных митохондриальных липидов приводит к дисфункции митохондрий [131, 132].

Основные митохондриальные фосфолипиды – фосфатидилэтаноламин (PE), фосфатидилглицерин (PG), кардиолипин (CL), фосфатидилхолин (PC), фосфатидилсерин (PS) и фосфатидилинозит (PI) [132, 133]. Распределение различных фосфолипидов в митохондриальной мембране важно для поддержания структуры мембраны и надлежащих функций белковых комплексов в митохондриях [134, 135].

Специфический компонент митохондриальных мембран – фосфолипид CL, содержание которого во внутренней мембране митохондрий достигает 20% [136, 137]. CL играет важнейшую роль в митохондриальной биоэнергетике и поддержании структурной целостности внутренней мембраны митохондрий и комплекса дыхательной цепи для производства ATP [138].

CL – уникальный класс фосфолипидов, который содержит в своей структуре три глицериновых скелета, две полярные головки и четыре цепи жирных кислот. Хотя было показано, что жирнокислотный состав CL зависит от вида ткани, тетралинолеилкардиолипин (TLCL) – основной вид митохондриального CL в большинстве клеток и тканей млекопитающих [139, 140].

В работах [141, 142] было показано, что CL подвергается перекисному окислению липидов именно из-за наличия в его структуре четырех цепей непредельной линолевой кислоты.

Интересно, что TLCL предпочтительнее окисляется по сравнению с другими фосфолипидами, включая PS, PI, PE и PC, даже в присутствии более окисляемых жирных кислот, таких как арахидоновая кислота (AA), докозагексаеновая кислота (DHA) и эйкозапентаеновая кислота (EPA) [143, 144].

В результате перекисного окисления TLCL образуется α,β -ненасыщенный альдегид – 4-гидроксиноненаль (4-HNE) (схема 3). В физиологическом состоянии 4-HNE присутствует почти во всех клетках в низких концентрациях и действует как медиатор, регулирующий различные пути передачи сигналов и клеточные процессы, в том числе активирует систему Nrf2/ARE [145–149]. Сигнальная функция 4-HNE определяется его структурой. Выступая альдегидом, он легко образует основания Шиффа, вступает по β -двойной связи в реакцию Михаэля с боковыми группами аминокислот белков и тем самым изменяет конформацию и функцию белков [148, 150].

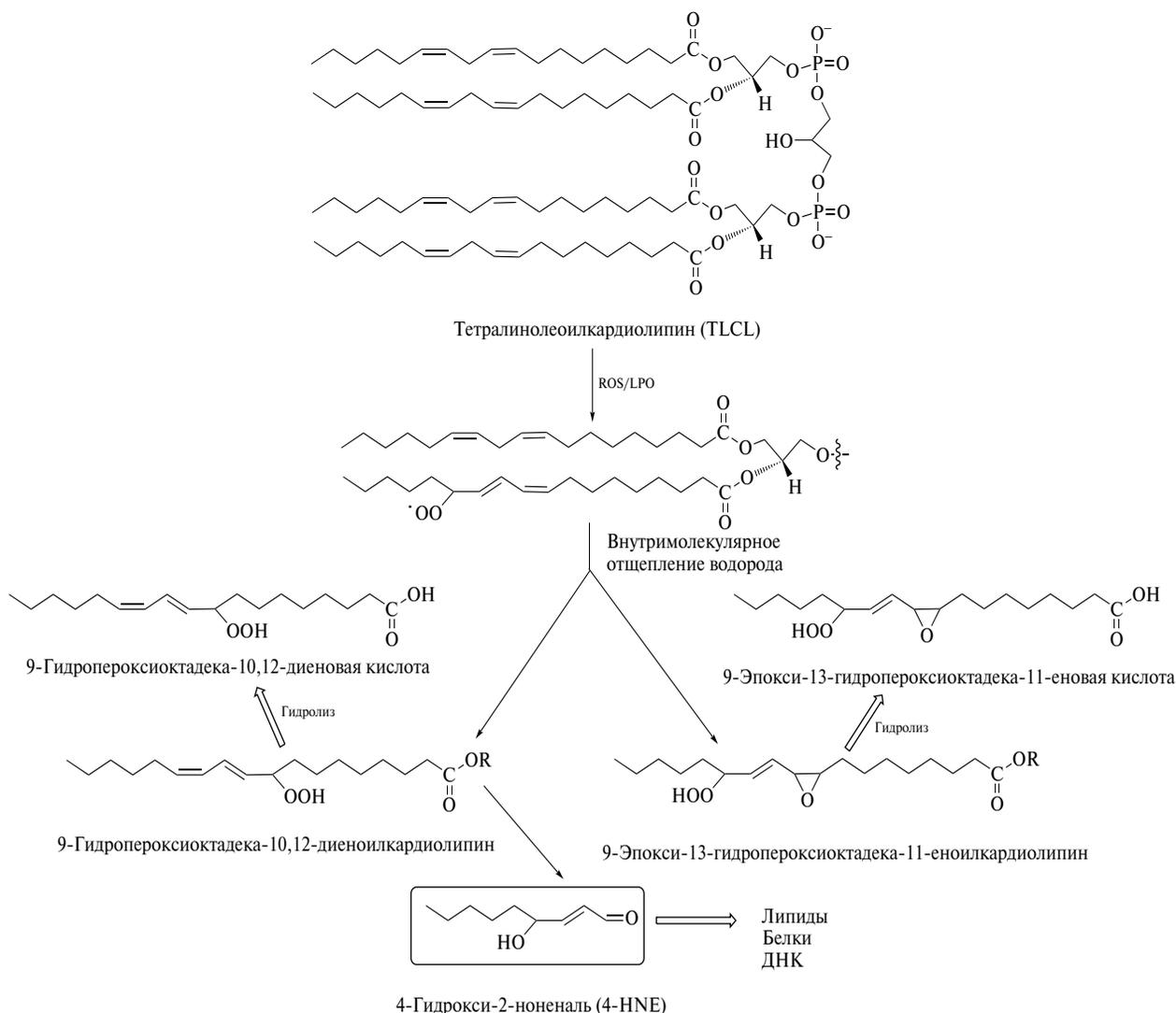


Схема 3. Перекисное окисление тетралинолеилкардиолипина (TLCL) и образование 4-гидрокси-2-ноненала (4-HNE) [143].

Однако во время окислительного стресса концентрация 4-HNE значительно увеличивается [151]. Дисфункциональные аддукты 4-HNE с белками играют ключевую роль при старении, а также в патологии различных заболеваний, включая нейродегенеративные, онкологические и сердечно-сосудистые [152–157].

Первые доказательства апоптоза нейрональных клеток, опосредованного 4-HNE, были представлены в работе Kruman et al. [158]. Клетки PC12, экспрессирующие регулятор апоптоза Bcl-2, демонстрировали более высокий уровень глутатиона и более низкий уровень 4-HNE после окислительного стресса. Было продемонстрировано, что глутатион защищал первичные нейроны гиппокампа крысы и клетки PC12 от апоптоза, индуцированного 4-HNE и окислительным стрессом. Эти данные указывали на то, что 4-HNE — новый небелковый медиатор апоптоза нейронов, индуци-

рованного окислительным стрессом, и продемонстрировали, что антиапоптотическое действие глутатиона может включать и детоксикацию 4-HNE.

В работе Abarikwu et al. [159] было продемонстрировано, что 4-HNE оказывает дозозависимое цитотоксическое действие на культуру клеток SH-SY5Y. Окислительный стресс, индуцированный 4-HNE, вызывал аномальную экспрессию апоптотических маркеров p53, Вах и каспазы-3, что приводило к гибели нейрональных клеток. Также было показано, что 4-HNE способствует протеолизу нейротрофинового рецептора p75, что приводит к фрагментации аксонов и гибели нейронов [160].

Перечисленные выше примеры влияния высокорекреационноспособного альдегида 4-HNE на клеточные процессы не являются исчерпывающими [161]. Так, в работе Shin et al. [162] впервые было показано, что 4-HNE инактивирует D1/D5-

рецепторы, модифицируя сайт связывания лиганда по остаткам цистеина и, таким образом, затрудняя взаимодействие с дофамином, а в работе Fleuranceau-Morel et al. [163] было продемонстрировано, что 4-HNE ингибирует активность транспортера дофамина в нейрональных клетках.

Как уже упоминалось выше, дегенерация дофаминергических нейронов в черной субстанции сопровождается накоплением цитоплазматических включений, известных как тельца Леви, которые образуются в результате агрегации амилويدного белка α -синуклеина. Получены данные, что α -синуклеин образует аддукты с 4-HNE [164], которые более склонны к олигомеризации и образованию нерастворимых амилонидных фибрилл, чем сам α -синуклеин, и токсичны для клеток нейробластомы SH-SY5Y и дофаминергических нейронов.

Таким образом, в результате перекисного окисления липидов клетки, вызванного окислительным стрессом, повышается концентрация различных токсичных метаболитов, наиболее изученный и важнейший из которых — 4-HNE. 4-HNE влияет на множество сигнальных путей клетки и вносит значительный вклад в патогенез нейродегенерации, стимулируя экспрессию апоптотических маркеров и образование агрегатов α -синуклеина, а также нарушает нормальное функционирование дофаминовых рецепторов и дофаминового транспортера.

ТЕРАПИЯ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Леводопа. Гибель дофаминергических нейронов черной субстанции приводит к истощению запасов дофамина в полосатом теле и выступает основным механизмом, лежащим в основе кардинальных моторных особенностей болезни Паркинсона. Восстановление уровня дофамина в результате регулярного приема предшественника дофамина — аминокислоты L-DOPA (леводопа) — стало революционным прорывом в терапии болезни Паркинсона более 50 лет назад.

Леводопа до сих пор остается золотым стандартом для терапии болезни Паркинсона и паркинсонизма, вызванного другими нейродегенеративными заболеваниями: почти все пациенты проходят лечение этим препаратом на разных стадиях заболевания [165, 166]. Однако леводопа вызывает развитие побочных моторных эффектов, например, дискинезий. Механизмы, лежащие в основе этих эффектов, в частности те, которые ответственны за развитие дискинезий при заместительной терапии L-DOPA, до сих пор не полностью понятны [167, 168]. Предполагается, что основные причины — прерывистая доставка L-DOPA из-за короткого периода полувыведения, непостоянство величины абсорбции в желу-

дочно-кишечном тракте и низкая проницаемость гематоэнцефалического барьера. Для преодоления этих проблем разрабатываются новые препараты с пролонгированным высвобождением L-DOPA, а также непрерывной доставкой (либо через эндоскопические гастроэнтеростомические трубки, либо подкожно через мини-насосы) [169].

Ингибиторы катехол-*O*-метилтрансферазы. Современные препараты L-DOPA комбинируют с ингибиторами декарбоксилазы ароматических аминокислот (AADC), например, карбидопой, для предотвращения периферического метаболизма дофамина и повышения биодоступности действующего вещества. Вследствие этого периферический метаболизм L-DOPA смещается в сторону активности вторичного пути, в котором происходит ортометилирование L-DOPA при участии катехол-*O*-метилтрансферазы (COMT). Ингибирование этого фермента на периферии увеличивает биодоступность и период полувыведения L-DOPA [170]. Такие комбинированные препараты L-DOPA с ингибиторами COMT стали применяться в качестве препаратов первой очереди у пациентов с болезнью Паркинсона [171, 172].

Ингибиторы моноаминоксидазы типа В. Окисление с помощью моноаминоксидазы типа В (МАО-В) в глиальных клетках — основной механизм клиренса дофамина, высвобожденного в синаптическое пространство и оставшегося после обратного захвата с помощью DAT в пресинаптическую терминаль [173]. Ингибирование МАО-В продлевает время жизни и увеличивает концентрацию синаптического дофамина. Симптоматическая эффективность ингибирования МАО-В с использованием селективного ингибитора селегилина дополнительно к терапии L-DOPA была показана уже в 1970-х гг. [174]. Позднее была продемонстрирована антипаркинсоническая эффективность терапии (устранение немоторных симптомов БП) при комбинированном использовании L-DOPA с селегилином и более новым ингибитором МАО-В разагилином [171].

Агонисты дофамина. Дофаминомиметики с прямой активностью к дофаминовым рецепторам (агонисты дофаминовых рецепторов) в основном нацелены на семейство рецепторов D2 и впервые были введены в терапию болезни Паркинсона в 1970-х гг. [171, 175]. Первыми представителями таких лекарств были производные алкалоида эрголина, которые также активируют рецепторы серотонина (5-HT). Используемые в настоящее время препараты — неэрголиновые лекарственные средства, не обладающие побочными эффектами, связанными с действием на рецепторы 5-HT. Важное преимущество агонистов дофамина — их более длительный период полувыведения, чем у L-DOPA [171, 173]. Кроме того, некоторые препараты, например, ротигодин, доступны в виде трансдер-

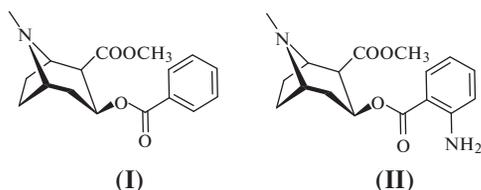


Рис. 1. Структуры кокаина (I) и 2'-аминококаина (II).

мального пластыря, который обеспечивает непрерывную доставку лекарственного средства [173, 176]. Однако агонисты дофамина не так эффективны в сравнении с L-DOPA, а также имеют ряд побочных эффектов, среди которых чрезмерная стимуляция системы вознаграждения в результате взаимодействия с D3-рецепторами, т.е. психотропный эффект [177].

Ингибиторы обратного захвата дофамина. Транспортёры моноаминов, в частности DAT, — привлекательные мишени для нейрофармакологии. Однако ограниченная эффективность используемых в настоящее время лекарств от расстройств ЦНС приводит к необходимости постоянного поиска новых потенциальных лекарств. Соединения на основе тропана и пиперазина — одни из самых популярных фармакофоров, используемые для разработки новых ингибиторов DAT.

Кокаин (соединение (I), рис. 1) — природное соединение, выделенное из листьев коки (*Erythroxylon coca*), — психостимулятор, связывающийся с определенными участками мозга млекопитающих. Кокаин вызывает различные физиологические эффекты в ЦНС млекопитающих посредством активации нейромедиаторных систем моноаминов: серотонина (5-HT), норэпинефрина (NE) и дофамина (DA). Однако данные исследований на животных показывают, что эффекты этого соединения опосредованы связыванием с высокой аффинностью и ингибированием DAT ($IC_{50} = 89$ нМ) [178–180]. Благодаря этой высокой ингибирующей и биологической активности кокаин становится фармакологической платформой для разработки новых ингибиторов DAT. Оценка зависимости ингибирования DAT от асимметричной конфигурации атомов углерода

показала, что среди восьми стереоизомеров только природное (выделенное из растений) соединение имело высокую аффинность к DAT, тогда как остальные семь изомеров были в 60–600 раз слабее [181]. Исследования взаимосвязи структура–активность (SAR) для производных кокаина включали изучение влияния заместителей в положении 2 на аффинность к DAT, учитывали влияние электронодонорных и электроноакцепторных групп и доноров водородных связей. Среди этих производных 2'-аминококаин (соединение (II), рис. 1) продемонстрировал наибольшую ингибирующую активность в отношении DAT ($IC_{50} = 18 \pm 2$ нМ), что подчеркивает влияние донорной группы с водородной связью в положении 2' на ингибирование DAT [182].

В дальнейшем были получены различные аналоги кокаина замещением и варьированием фенольного фрагмента, а также исследована взаимосвязь структура–активность, но высокой селективности к DAT эти соединения не показали, однако данные по их взаимодействию с DAT позволили предположить существование нового центра связывания лигандов, отличного от установленного ранее [183–185].

В ряду ингибиторов DAT, базирующихся на структуре бензотропина (соединение (III), рис. 2), соединение AHN-1-055 (IV) имело высокое сродство к DAT ($K_i = 11.8$ нМ). Это послужило основанием к разработке серии производных AHN-1-055 с заместителем во 2-м положении тропанового ядра. Наибольшее сродство к DAT было обнаружено для соединений (V) и (VI) ($K_i = 13.4$ и 16.4 нМ соответственно) (рис. 2). Соединения (IV–VI) также были селективны к серотониновому и норэпинефриновому транспортерам SERT и NET ($K_i = 3260, 690$ и 1850 нМ для SERT, $K_i = 610, 269$ и 629 нМ для NET соответственно) [186, 187], что, однако, уступает селективности к DAT.

Работы с производными тропанового ряда, включая исследования взаимосвязи структура–активность, позволили предложить заменить тропановый цикл на пиперазин и, таким образом, послужили разработке нового класса ингибиторов обратного захвата дофамина. Производные

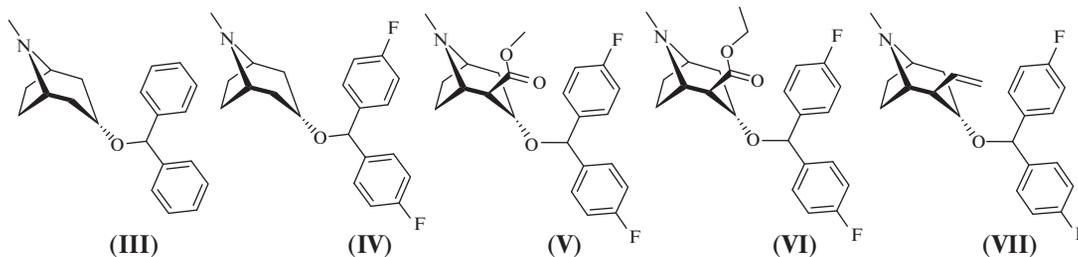


Рис. 2. Структуры ингибиторов DAT на основе бензотропина — соединений (III–VII).

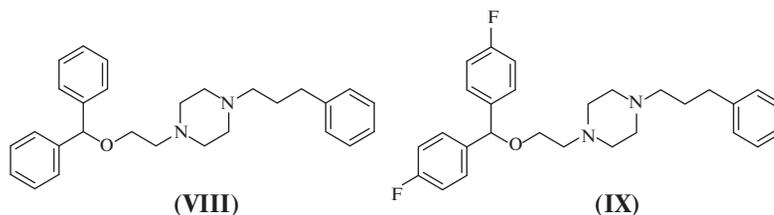


Рис. 3. GBR 12935 (VIII) и GBR 12909 (IX).

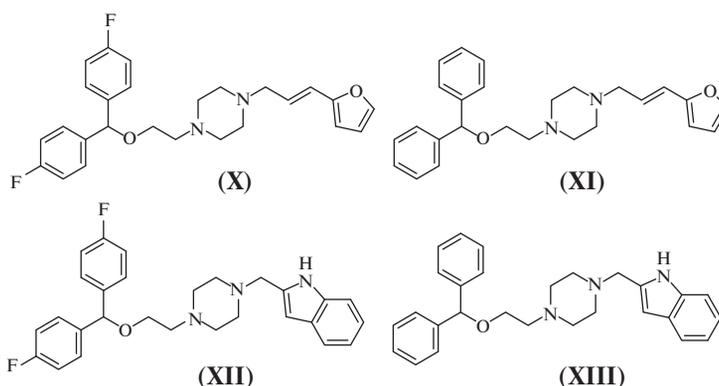


Рис. 4. Фурановые и индольные аналоги GBR (X–XIII).

пиперазина обладают значительным преимуществом перед тропановыми производными – не вызывают побочных психотропных эффектов [188, 189].

Соединения GBR 12935 (VIII) и GBR 12909 (IX) (рис. 3) в ряду дизамещенных производных пиперазина показали себя как наиболее высокоаффинные и селективные ингибиторы DAT этой группы ($IC_{50} = 3.7$ и 4.3 нМ соответственно) [190]. Эффект селективного ингибитора DAT GBR 12909 был продемонстрирован на приматах с МРТР-индуцированными симптомами болезни Паркинсона [65].

В результате дальнейшего поиска новых GBR-производных были синтезированы соединения с различной селективностью к транспортерам моноаминов. Введение гетероциклической ароматической системы вместо фенильного кольца в фенилпропильной боковой цепи производных GBR давало соединения с высокой аффинностью, но различной селективностью к DAT по сравнению с SERT. Среди синтезированных биоизостерических аналогов содержащее фурановый цикл соединение (X) (рис. 4) обладало наибольшей эффективностью ингибирования DAT ($IC_{50} = 1.8$ нМ), тогда как соединение (XI) было наиболее селективным по сравнению с SERT ($IC_{50} = 5.0$ нМ против 1840 нМ). В другой серии аналогов GBR с индольным циклом соединение (XII) (рис. 4) сильнее ингибировало DAT ($IC_{50} =$

$= 0.7$ нМ), тогда как соединение (XIII) продемонстрировало наивысшую селективность по сайту SERT ($IC_{50} = 1.1$ нМ против 668 нМ) [191].

Химические и фармакологические свойства этих производных GBR делают их идеальными кандидатами для исследований по распределению белка DAT в мозге и клетках, т.к. могут быть сконденсированы с флуоресцентными квантовыми точками и имеют сродство к DAT в наномолярном диапазоне. Например, в работе Tomlinson et al. [192] была синтезирована модификация соединения GBR 12909 для конъюгации с квантовыми точками типа ядро/оболочка (соединение (XIV), рис. 5, $IC_{50} = 10$ нМ).

Высокая аффинность и селективность, которую показали пиперазиновые ингибиторы DAT, делают их структуры перспективными для разработки новых ингибиторов обратного захвата дофамина с потенциальной терапевтической активностью при болезни Паркинсона. Однако при некоторых заболеваниях, например, при депрессии, необходимо применение двойных и тройных ингибиторов обратного захвата моноаминов (DAT, SERT и NET). Так, производные 5-пиперазин-замещенного индола – мощные ингибиторы обратного захвата DAT, SERT и NET *in vivo*. Наибольшее сродство DAT/SERT/NET в этой серии показали соединения (XV) ($pK_i = 8.2, 7.9$ и 8.1 нМ соответственно) и (XVI) ($pK_i 8.5, 8.1$ и 6.3 нМ соответственно) (рис. 6) [193].

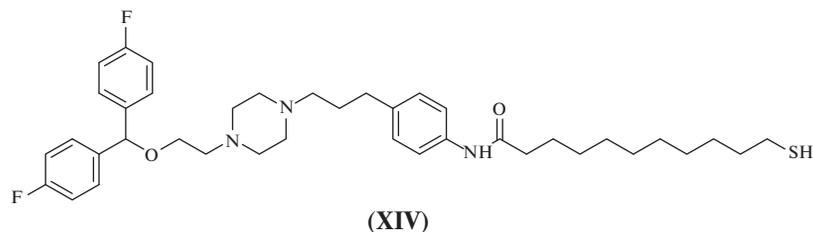


Рис. 5. Структура аналога GBR (XIV) для конъюгации с квантовыми точками.

Применение аналогичных двойных или тройных ингибиторов транспортеров моноаминов может быть эффективным и при терапии болезни Паркинсона на разных стадиях. Однако оценить относительную эффективность селективных ингибиторов DAT по сравнению с двойным или тройным ингибированием весьма трудно. Высказывается предположение, что двойные ингибиторы DAT/NET и тройные ингибиторы могут усиливать действие L-DOPA, но при этом могут усугублять дискинезию. Наиболее перспективный подход, по-видимому, – сочетание L-DOPA с ингибитором DAT/SERT, в котором сродство ингибитора к DAT/SERT – равное или более высокое по отношению к DAT [65].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Болезнь Паркинсона становится все более распространенной в стареющей человеческой популяции. Моторная дисфункция, характерная для этого заболевания, – результат гибели дофаминергических нейронов в черной субстанции и истощения запасов дофамина в синапсах. Хотя конкретный биохимический механизм остается неясным, установлено, что это мультифакторное заболевание, в котором окислительный стресс играет неоспоримую роль в сложном и прогрессирующем нейродегенеративном каскаде. Одним из направлений создания терапевтических средств нового поколения может быть создание препаратов, нацеленных избирательно на дофаминергические нейроны, но при этом включающих несколько фармакофоров, направленных на одновремен-

ную активацию нескольких разных мишеней, задействованных в устранении последствий окислительного стресса.

Тем не менее даже возможная полифункциональная антиоксидантная терапия не станет единственным подходом к лечению болезни Паркинсона из-за прогрессирующих симптомов заболевания, связанных со снижением уровня дофамина. Современные препараты, направленные на поддержание концентрации дофамина в синапсах, обладают серьезными побочными эффектами. Перспективной, но все еще не задействованной фармакологической мишенью служит транспортер дофамина DAT. Однако разработка ингибиторов DAT значительно осложнена схожестью его белковой структуры с транспортерами других моноаминов NET и SERT. На данный момент синтезированы разнообразные ингибиторы обратного захвата дофамина, отличающиеся селективностью и аффинностью к транспортерам моноаминов. GBR12909 – высокоаффинный и селективный к DAT ингибитор обратного захвата дофамина, поэтому может использоваться в качестве платформы для создания новых ингибиторов для повышения уровня дофамина в синапсах, а также новых средств для визуализации дофаминергических нейронов при клинических исследованиях. Кроме того, эксклюзивность экспрессии DAT в дофаминергических нейронах также может быть полезна при разработке мультифункциональных соединений для направленной доставки фармакофоров, в том числе активирующих антиоксидантную защиту клеток, к нейронам черной субстанции.

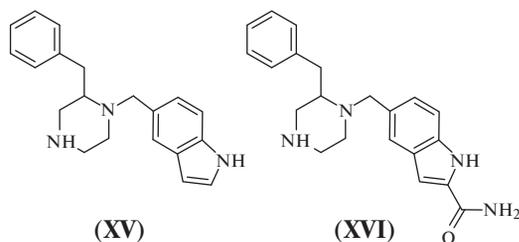


Рис. 6. Структуры производных 5-пиперазин-замещенного индола (XV, XVI).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Twelves D., Perkins K.S.M., Counsell C.* // *Mov. Disord.* 2003. V. 18. P. 19–31.
<https://doi.org/10.1002/mds.10305>
2. *Savica R., Grossardt B.R., Bower J.H., Ahlskog J.E., Rocca W.A.* // *JAMA Neurol.* 2013. V. 70. P. 859–866.
<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.114>
3. *Van Den Eeden S.K., Tanner C.M., Bernstein A.L., Fross R.D., Leimpeyer A., Bloch D.A., Nelson L.M.* // *Am. J. Epidemiol.* 2003. V. 157. P. 1015–1022.
<https://doi.org/10.1093/aje/kwg068>
4. *Dorsey E.R., Constantinescu R., Thompson J.P., Biglan K.M., Holloway R.G., Kieburtz K., Marshall F.J., Ravina B.M., Schifitto G., Siderowf A., Tanner C.M.* // *Neurology.* 2007. V. 68. P. 384–386.
<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000247740.47667.03>
5. *Lix L.M., Hobson D.E., Azimaee M., Leslie W.D., Burchill C., Hobson S.* // *J. Epidemiol. Commun. Health.* 2010. V. 64. P. 335–340.
<https://doi.org/10.1136/jech.2008.084954>
6. *Ascherio A., Schwarzschild M.A.* // *Lancet Neurol.* 2016. V. 15. P. 1257–1272.
[https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(16\)30230-7](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(16)30230-7)
7. *Угрюмов М.В.* // *Нейрохимия.* 2018. Т. 35. № 4. С. 281–288.
<https://doi.org/10.1134/S1027813318040088>
8. *Worth P.F.* // *Clin. Med. (Lond).* 2013. V. 13. P. 93–96.
<https://doi.org/10.7861/clinmedicine.13-1-93>
9. *Blaschko H.* // *J. Physiol.* 1942. V. 101. P. 337–349.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1942.sp003988>
10. *Hiroi T., Imaoka S., Funae Y.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. V. 249. P. 838–843.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9232>
11. *Bromek E., Haduch A., Gołombiowska K., Daniel W.A.* // *J. Neurochem.* 2011. V. 118. P. 806–815.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07339.x>
12. *Sánchez-Ferrer A., Rodríguez-López J.N., García-Cánovas F., García-Carmona F.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1995. V. 1247. P. 1–11.
[https://doi.org/10.1016/0167-4838\(94\)00204-t](https://doi.org/10.1016/0167-4838(94)00204-t)
13. *Rios M., Habecker B., Sasaoka T., Eisenhofer G., Tian H., Landis S., Chikaraishi D., Roffler-Tarlov S.* // *J. Neurosci.* 1999. V. 19. P. 3519–3526.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-09-03519.1999>
14. *Chaudhry F.A., Edwards R.H., Fonnun F.* // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2008. V. 48. P. 277–301.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141146>
15. *Miesenböck G., De Angelis D.A., Rothman J.E.* // *Nature.* 1998. V. 394. P. 192–195.
<https://doi.org/10.1038/28190>
16. *Vergo S., Johansen J.L., Leist M., Lotharius J.* // *Brain Res.* 2007. V. 1185. P. 18–32.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.09.028>
17. *Cartier E.A., Parra L.A., Baust T.B., Quiroz M., Salazar G., Faundez V., Egaña L., Torres G.E.* // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 1957–1966.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m109.054510>
18. *Beaulieu J.M., Gainetdinov R.R.* // *Pharmacol. Rev.* 2011. V. 63. P. 182–217.
<https://doi.org/10.1124/pr.110.002642>
19. *Torres G.E., Gainetdinov R.R., Caron M.G.* // *Nat. Rev. Neurosci.* 2003. V. 4. P. 13–25.
<https://doi.org/10.1038/nrn1008>
20. *Eiden L.E., Schäfer M.K., Weihe E., Schütz B.* // *Pflugers Arch.* 2004. V. 447. P. 636–640.
<https://doi.org/10.1007/s00424-003-1100-5>
21. *Kamal S., Lappin S.L.* *Biochemistry, Catecholamine Degradation* // In: *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2019.*
22. *Stefani A., Pierantozzi M., Olivola E., Galati S., Cerrotoni R., D'Angelo V., Hainsworth A.H., Saviozzi V., Fedele E., Liguori C.* // *Neurochem. Int.* 2017. V. 105. P. 58–63.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.01.007>
23. *Lohr K.M., Masoud S.T., Salahpour A., Miller G.W.* // *Eur. J. Neurosci.* 2017. V. 45. P. 20–33.
<https://doi.org/10.1111/ejn.13357>
24. *Benoit-Marand M., Jaber M., Gonon F.* // *Eur. J. Neurosci.* 2000. V. 12. P. 2985–2992.
<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00155.x>
25. *Gonon F., Burie J.B., Jaber M., Benoit-Marand M., Dumartin B., Bloch B.* // *Prog. Brain Res.* 2000. V. 125. P. 291–302.
[https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(00\)25018-8](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(00)25018-8)
26. *Cragg S.J., Rice M.E.* // *Trends Neurosci.* 2004. V. 27. P. 270–277.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.03.011>
27. *Schönfuss D., Reum T., Olshausen P., Fischer T., Morgenstern R.* // *J. Neurosci. Methods.* 2001. V. 112. P. 163–172.
[https://doi.org/10.1016/s0165-0270\(01\)00465-4](https://doi.org/10.1016/s0165-0270(01)00465-4)
28. *Grouleff J., Ladefoged L.K., Koldsø H., Schiøtt B.* // *Front. Pharmacol.* 2015. V. 6. P. 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00235>
29. *Kilty J.E., Lorang D., Amara S.G.* // *Science.* 1991. V. 254. P. 578–579.
<https://doi.org/10.1126/science.1948035>
30. *Giros B., El Mestikawy S., Bertrand L., Caron M.G.* // *FEBS Lett.* 1991. V. 295. P. 149–154.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)81406-x](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)81406-x)
31. *Penmatsa A., Wang K.H., Gouaux E.* // *Nature.* 2013. V. 503. P. 85–90.
<https://doi.org/10.1038/nature12533>
32. *Bisgaard H., Larsen M.A., Mazier S., Beuming T., Newman A.H., Weinstein H., Shi L., Loland C.J., Gether U.* // *Neuropharmacology.* 2011. V. 60. P. 182–190.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.08.021>
33. *Kristensen A.S., Andersen J., Jørgensen T.N., Sørensen L., Eriksen J., Loland C.J., Strømgaard K., Gether U.* // *Pharmacol. Rev.* 2011. V. 63. P. 585–640.
<https://doi.org/10.1124/pr.108.000869>
34. *Shan J., Javitch J.A., Shi L., Weinstein H.* // *PLoS One.* 2011. V. 6. P. e16350.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016350>
35. *Wheeler D.D., Edwards A.M., Chapman B.M., Ondo J.G.* // *Neurochem. Res.* 1993. V. 18. P. 927–936.
<https://doi.org/10.1007/bf00998279>
36. *Sonders M.S., Zhu S.J., Zahniser N.R., Kavanaugh M.P., Amara S.G.* // *J. Neurosci.* 1997. V. 17. P. 960–974.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-03-00960.1997>

37. *Ingram S.L., Prasad B.M., Amara S.G.* // *Nat. Neurosci.* 2002. V. 5. P. 971–978.
<https://doi.org/10.1038/nn920>
38. *Kahlig K.M., Binda F., Khoshbouei H., Blakely R.D., McMahon D.G., Javitch J.A., Galli A.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 3495–3500.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0407737102>
39. *Gorentla B.K., Vaughan R.A.* // *Neuropharmacology.* 2005. V. 49. P. 759–768.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.08.011>
40. *Johnson L.A., Furman C.A., Zhang M., Guptaroy B., Gnegy M.E.* // *Neuropharmacology.* 2005. V. 49. P. 750–758.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.08.018>
41. *Richards T.L., Zahniser N.R.* // *J. Neurochem.* 2009. V. 108. P. 1575–1584.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05910.x>
42. *Daws L.C., Callaghan P.D., Morón J.A., Kahlig K.M., Shippenberg T.S., Javitch J.A., Galli A.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. V. 290. P. 1545–1550.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6384>
43. *Mash D.C., Pablo J., Ouyang Q., Hearn W.L., Izenwasser S.* // *J. Neurochem.* 2002. V. 81. P. 292–300.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00820.x>
44. *Zapata A., Kivell B., Han Y., Javitch J.A., Bolan E.A., Kuraguntla D., Jaligam V., Oz M., Jayanthi L.D., Samuvel D.J., Ramamoorthy S., Shippenberg T.S.* // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 35842–35854.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m611758200>
45. *Chen R., Daining C.P., Sun H., Fraser R., Stokes S.L., Leitges M., Gnegy M.E.* // *J. Neurochem.* 2013. V. 125. P. 663–672.
<https://doi.org/10.1111/jnc.12229>
46. *Cervinski M.A., Foster J.D., Vaughan R.A.* // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 40442–40449.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m501969200>
47. *Schmitt K.C., Rothman R.B., Reith M.E.A.* // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2013. V. 346. P. 2–10.
<https://doi.org/10.1124/jpet.111.191056>
48. *Boudanova E., Navaroli D.M., Melikian H.E.* // *Neuropharmacology.* 2008. V. 54. P. 605–612.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.11.007>
49. *Sorkina T., Hoover B.R., Zahniser N.R., Sorkin A.* // *Traffic.* 2005. V. 6. P. 157–170.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00259.x>
50. *Miranda M., Wu C.C., Sorkina T., Korstjens D.R., Sorkin A.* // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 35617–35624.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m506618200>
51. *Miranda M., Dionne K.R., Sorkina T., Sorkin A.* // *Mol. Biol. Cell.* 2007. V. 18. P. 313–323.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e06-08-0704>
52. *Block M.L., Zecca L., Hong J.S.* // *Nat. Rev. Neurosci.* 2007. V. 8. P. 57–69.
<https://doi.org/10.1038/nrn2038>
53. *Carvelli L., Morón J.A., Kahlig K.M., Ferrer J.V., Sen N., Lechleiter J.D., Leeb-Lundberg L.M., Merrill G., Lafer E.M., Ballou L.M., Shippenberg T.S., Javitch J.A., Lin R.Z., Galli A.* // *J. Neurochem.* 2002. V. 81. P. 859–869.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00892.x>
54. *Morón J.A., Zakharova I., Ferrer J.V., Merrill G.A., Hope B., Lafer E.M., Lin Z.C., Wang J.B., Javitch J.A., Galli A., Shippenberg T.S.* // *J. Neurosci.* 2003. V. 23. P. 8480–8488.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-24-08480.2003>
55. *Bolan E.A., Kivell B., Jaligam V., Oz M., Jayanthi L.D., Han Y., Sen N., Urizar E., Gomes I., Devi L.A., Ramamoorthy S., Javitch J.A., Zapata A., Shippenberg T.S.* // *Mol. Pharmacol.* 2007. V. 71. P. 1222–1232.
<https://doi.org/10.1124/mol.106.027763>
56. *Foster J.D., Adkins S.D., Lever J.R., Vaughan R.A.* // *J. Neurochem.* 2008. V. 105. P. 1683–1699.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05262.x>
57. *Cremona M.L., Matthies H.J., Pau K., Bowton E., Speed N., Lute B.J., Anderson M., Sen N., Robertson S.D., Vaughan R.A., Rothman J.E., Galli A., Javitch J.A., Yamamoto A.* // *Nat. Neurosci.* 2011. V. 14. P. 469–477.
<https://doi.org/10.1038/nn.2781>
58. *Sorkina T., Caltagarone J., Sorkin A.* // *Traffic.* 2013. V. 14. P. 709–724.
<https://doi.org/10.1111/tra.12059>
59. *Zahniser N.R., Sorkin A.* // *Neuropharmacology.* 2004. V. 47. P. 80–91.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.07.010>
60. *Zhu J., Reith M.E.A.* // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2008. V. 7. P. 393–409.
<https://doi.org/10.2174/187152708786927877>
61. *Bromberg-Martin E.S., Matsumoto M., Hikosaka O.* // *Neuron.* 2010. V. 68. P. 815–834.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.022>
62. *Brudzynski S.M.* // *Behav. Brain Res.* 2007. V. 182. P. 261–273.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.03.004>
63. *Brudzynski S.M., Silkstone M.J.D., Mulvihill K.G.* // *Handbook of Behavioral Neuroscience.* 2018. V. 25. P. 239–251.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809600-0.00023-8>
64. *Fernagut P.O., Chalon S., Diguët E., Guilloteau D., Tison F., Jaber M.* // *Neuroscience.* 2003. V. 110. P. 1123–1130.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00778-9](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00778-9)
65. *Huot P., Fox S.H., Brotchie J.M.* // *Parkinson's Disease.* 2015. V. 2015. P. 1–71.
<https://doi.org/10.1155/2015/609428>
66. *Aggarwal S., Mortensen O.V.* // *Curr. Protoc. Pharmacol.* 2017. V. 79. P. 12.16.1–12.16.17.
<https://doi.org/10.1002/cpph.32>
67. *Lavrova A.V., Akimov M.G., Blokhin V.E., Gretskaya N.M., Bezuglov V.V.* // XVI International Interdisciplinary Congress “Neuroscience for Medicine and Psychology”. Sudak, 2020. P. 291.
<https://doi.org/10.29003/m1121.sudak.ns2020-16/291>
68. *Fearnley J.M., Lees A.J.* // *Brain.* 1991. V. 114. P. 2283–2301.
<https://doi.org/10.1093/brain/114.5.2283>
69. *Damier P., Hirsch E.C., Agid Y., Graybiel A.M.* // *Brain.* 1999. V. 122. P. 1437–1448.
<https://doi.org/10.1093/brain/122.8.1437>
70. *Dijkstra A.A., Voorn P., Berendse H.W., Groenewegen H.J., Rozemuller A.J., van de Berg W.D.* // *Mov. Disord.*

2014. V. 29. P.1244–1251.
<https://doi.org/10.1002/mds.25952>
71. *Iacono D., Geraci-Erck M., Rabin M.L., Adler C.H., Serrano G., Beach T.G., Kurlan R.* // *Neurology*. 2015. V. 85. P. 1670–1679.
<https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000002102>
 72. *Lamberts J.T., Hildebrandt E.N., Brundin P.* // *Neurobiol. Dis.* 2015. V. 77. P. 276–283.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.07.002>
 73. *Heald C.B.* // *Proc. R Soc. Med.* 1932. V. 25. P. 326–327.
 74. *Borghammer P., Van Den Berge N.* // *J. Parkinson's Dis.* 2019. V. 9. P. S281–S295.
<https://doi.org/10.3233/jpd-191721>
 75. *Leclair-Visonneau L., Neunlist M., Derkinderen P., Lebouvier T.* // *Neurogastroenterol. Motil.* 2020. V. 32. P. 1–6.
<https://doi.org/10.1111/nmo.13777>
 76. *Nalls M.A., Pankratz N., Lill C.M., Do C.B., Hernandez D.G., Saad M., DeStefano A.L., Kara E., Bras J., Sharma M., Schulte C., Keller M.F., Arepalli S., Letson C., Edsall C., Stefansson H., Liu X., Pliner H., Lee J.H., Cheng R., Ikram M.A., Ioannidis J.P., Hadjigeorgiou G.M., Bis J.C., Martinez M., Perlmutter J.S., Goate A., Marder K., Fiske B., Sutherland M., Xiromerisiou G., Myers R.H., Clark L.N., Stefansson K., Hardy J.A., Heutink P., Chen H., Wood N.W., Houlden H., Payami H., Brice A., Scott W.K., Gasser T., Bertram L., Eriksson N., Foroud T., Singleton A.B.* // *Nat. Genet.* 2014. V. 46. P. 989–993.
<https://doi.org/10.1038/ng.3043>
 77. *Brand M.D., Affourtit C., Esteves T.C., Green K., Lambert A.J., Miwa S., Pakay J.L., Parker N.* // *Free Radic. Biol. Med.* 2004. V. 37. P. 755–767.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.05.034>
 78. *Dröse S., Brandt U.* // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 21649–21654.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m803236200>
 79. *Kusssmaul L., Hirst J.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 7607–7612.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0510977103>
 80. *Weidinger A., Kozlov A.V.* // *Biomolecules.* 2015. V. 5. P. 472–484.
<https://doi.org/10.3390/biom5020472>
 81. *Ruszkiewicz J., Albrecht J.* // *Neurochem.* 2015. V. 88. P. 66–72.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.12.012>
 82. *Brigelius-Flohe R., Maiorino M.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. V. 1830. P. 3289–3303.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>
 83. *Collins Y., Chouchani E.T., James A.M., Menger K.E., Cochemé H.M., Murphy M.P.* // *J. Cell Sci.* 2012. V. 125. P. 1837.
<https://doi.org/10.1242/jcs.098475>
 84. *Murphy M.P.* // *Biochem. J.* 2009. V. 417. P. 1–13.
<https://doi.org/10.1042/bj20081386>
 85. *Eaton P.* // *Free Radic. Biol. Med.* 2006. V. 40. P. 1889–1899.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.12.037>
 86. *D'Auréaux B., Toledano M.B.* // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007. V. 8. P. 813–824.
<https://doi.org/10.1038/nrm2256>
 87. *Schapira A.H.V., Cooper J.M., Dexter D., Clark J.B., Jenner P., Marsden C.D.* // *J. Neurochem.* 1990. V. 54. P. 823–827.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1990.tb02325.x>
 88. *Langston J.W.* // *J. Parkinson's Dis.* 2017. V. 7. P. S11–S19.
<https://doi.org/10.3233/jpd-179006>
 89. *Ren J.P., Zhao Y.W., Sun X.J.* // *Chin. Med. J. (Engl).* 2009. V. 122. P. 2366–2371.
<https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2009.19.032>
 90. *Martinez T.N., Greenamyre J.T.* // *Antioxid. Redox Signal.* 2012. V. 16. P. 920–934.
<https://doi.org/10.1089/ars.2011.4033>
 91. *Johnson M.E., Bobrovskaya L.* // *Neurotoxicology.* 2015. V. 46. P. 101–116.
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2014.12.002>
 92. *Ramsay R.R., Krueger M.J., Youngster S.K., Gluck M.R., Casida J.E., Singer T.P.* // *J. Neurochem.* 1991. V. 56. P. 1184–1190.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb11409.x>
 93. *Richardson J.R., Quan Y., Sherer T.B., Greenamyre J.T., Miller G.W.* // *Toxicol. Sci.* 2005. V. 88. P. 193–201.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi304>
 94. *Chan P., DeLanney L.E., Irwin I., Langston J.W., Di Monte D.* // *J. Neurochem.* 1991. V. 57. P. 348–351.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb02134.x>
 95. *Pathak D., Berthet A., Nakamura K.* // *Ann. Neurol.* 2013. V. 74. P. 506–516.
<https://doi.org/10.1002/ana.24014>
 96. *Schapira A.* // *Cell Death Differ.* 2007. V. 14. P. 1261–1266.
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402160>
 97. *Bose A., Beal M.F.* // *J. Neurochem.* 2016. V. 139. P. 216–231.
<https://doi.org/10.1111/jnc.13731>
 98. *Zheng B., Liao Z., Locascio J.J., Lesniak K.A., Roderick S.S., Watt M.L., Eklund A.C., Zhang-James Y., Kim P.D., Hauser M.A., Grünblatt E., Moran L.B., Mandel S.A., Riederer P., Miller R.M., Federoff H.J., Wüllner U., Papapetropoulos S., Youdim M.B., Cantuti-Castelvetri I., Young A.B., Vance J.M., Davis R.L., Hedreen J.C., Adler C.H., Beach T.G., Graeber M.B., Middleton F.A., Rochet J.C., Scherzer C.R.* // *Sci. Transl. Med.* 2010. V. 2. P. 52–73.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001059>
 99. *Devi L., Raghavendran V., Prabhu B.M., Avadhani N.G., Anandatheerthavarada H.K.* // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 9089–9100.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m710012200>
 100. *Eschbach J., von Einem B., Müller K., Bayer H., Schefold A., Morrison B.E., Rudolph K.L., Thal D.R., Witting A., Weydt P., Otto M., Fauler M., Liss B., McLean P.J., Spada A.R., Ludolph A.C., Weishaupt J.H., Danzer K.M.* // *Ann. Neurol.* 2015. V. 77. P. 15–32.
<https://doi.org/10.1002/ana.24294>
 101. *Ekstrand M.I., Terzioglu M., Galter D., Zhu S., Hofstetter C., Lindqvist E., Thams S., Bergstrand A., Hansson E.S., Trifunovic A., Hoffer B., Cullheim S., Mohammed A.H., Olson L., Larsson N.G.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 1325–1330.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0605208103>

102. Nordström U., Beauvais G., Ghosh A., Pulikkaparambil Sasidharan B.C., Lundblad M., Fuchs J., Joshi R.L., Lipton J.W., Roholt A., Medicetty S., Feinstein T.N., Steiner J.A., Escobar Galvis M.L., Prochiantz A., Brundin P. // *Neurobiol. Dis.* 2015. V. 73. P. 70–82. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.09.012>
103. Sossi V., de la Fuente-Fernández R., Holden J.E., Schutzer M., Ruth T.J., Stoessl J. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2004. V. 24. P. 869–876. <https://doi.org/10.1097/01.wcb.0000126563.85360.75>
104. Sossi V., de la Fuente-Fernández R., Nandhagopal R., Schutzer M., McKenzie J., Ruth T.J., Aasly J.O., Farrer M.J., Wszolek Z.K., Stoessl J.A. // *Mov. Disord.* 2010. V. 25. P. 2717–2723. <https://doi.org/10.1002/mds.23356>
105. Kordower J., Olanow C.W., Dodiya H.B., Chu Y., Beach T.G., Adler C.H., Halliday G.M., Bartus R.T. // *Brain.* 2013. V. 136. P. 2419–2431. <https://doi.org/10.1093/brain/awt192>
106. Pickrell A.M., Youle R.J. // *Neuron.* 2015. V. 85. P. 257–273. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.007>
107. Hayes J.D., Dinkova-Kostova A.T. // *Mol. Cell.* 2017. V. 68. P. 5–7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.023>
108. Yamamoto M., Kensler T.W., Motohashi H. // *Phys. Rev.* 2018. V. 98. P. 1169–1203. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2017>
109. Wang Q., Li W.X., Dai S.X., Guo Y.C., Han F.F., Zheng J.J., Li G.H., Huang J.F. // *J. Alzheimer's Dis.* 2017. V. 56. P. 1525–1539. <https://doi.org/10.3233/jad-161032>
110. Zhang H., Davies K.J.A., Forman H.J. // *Free Radic. Biol. Med.* 2015. V. 88. P. 314–336. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.036>
111. Tufekci K.U., Civi Bayin E., Genc S., Genc K. // *Parkinson's Dis.* 2011. V. 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/314082>
112. Zhou J., Wang H., Shen R., Fang J., Yang Y., Dai W., Zhu Y., Zhou M. // *Am. J. Transl. Res.* 2018. V. 10. P. 1887–1899.
113. Fu M.H., Wu C.W., Lee Y.C., Hung C.Y., Chen I.C., Wu K.L.H. // *Biomed. J.* 2018. V. 41. P. 169–183. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.02.005>
114. Merry T.L., Ristow M. // *J. Physiol.* 2016. V. 594. P. 5195–5207. <https://doi.org/10.1113/jp271957>
115. Wang P., Li C.G., Qi Z., Cui D., Ding S. // *Exp. Physiol.* 2016. V. 101. P. 410–420. <https://doi.org/10.1113/ep085493>
116. Harvey C.J., Thimmulappa R.K., Singh A., Blake D.J., Ling G., Wakabayashi N., Fujii J., Myers A., Biswal S. // *Free Radic. Biol. Med.* 2009. V. 46. P. 443–453. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.040>
117. Sasaki H., Sato H., Kuriyama-Matsumura K., Sato K., Maehara K., Wang H., Tamba M., Itoh K., Yamamoto M., Bannai S. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 44765–44771. <https://doi.org/10.1074/jbc.m208704200>
118. Cook A.L., Vitale A.M., Ravishankar S., Matigian N., Sutherland G.T., Shan J., Sutharsan R., Perry C., Silburn P.A., Mellick G.D., Whitelaw M.L., Wells C.A., Mackay-Sim A., Wood S.A. // *PLoS One.* 2011. V. 6. P. e21907. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021907>
119. Brennan M.S., Matos M.F., Li B., Hronowski X., Gao B., Juhasz P., Rhodes K.J., Scannevin R.H. // *PLoS One.* 2015. V. 10. P. e0120254. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120254>
120. Ahuja M., Ammal Kaidery N., Yang L., Calingasan N., Smirnova N., Gaisin A., Gaisina I.N., Gazaryan I., Hushpilian D.M., Kaddour-Djebbar I., Bollag W.B., Morgan J.C., Ratan R.R., Starkov A.A., Beal M.F., Thomas B. // *J. Neurosci.* 2016. V. 36. P. 6332–6351. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0426-16.2016>
121. Jing X., Shi H., Zhang C., Ren M., Han M., Wei X., Zhang X., Lou H. // *Neuroscience.* 2015. V. 286. P. 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.11.047>
122. Westlund K.N., Denney R.M., Rose R.M., Abell C.W. // *Neuroscience.* 1988. V. 25. P. 439–456. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(88\)90250-3](https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90250-3)
123. Muñoz P., Huenchuguala S., Paris I., Segura-Aguilar J. // *Parkinson's Dis.* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/920953>
124. Hare D.J., Double K.L. // *Brain.* 2016. V. 139. P. 1026–1035. <https://doi.org/10.1093/brain/aww022>
125. Sun Y., Pham A.N., Hare D.J., Waite T.D. // *Front. Neurosci.* 2018. V. 12. P. 1–18. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00859>
126. Meiser J., Weindl D., Hiller K. // *Cell Commun. Signal.* 2013. V. 11. P. 1–18. <https://doi.org/10.1186/1478-811x-11-34>
127. Su Y., Duan J., Ying Z., Hou Y., Zhang Y., Wang R., Deng Y. // *Neuroscience.* 2013. V. 233. P. 72–85. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.12.045>
128. Puspita L., Chung S.Y., Shim J.W. // *Mol. Brain.* 2017. V. 10. P. 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0340-9>
129. Haining R.L., Achat-Mendes C. // *Neural. Regener. Res.* 2017. V. 12. P. 372–375. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.202928>
130. Haque M.E., Asanuma M., Higashi Y., Miyazaki I., Tanaka K., Ogawa N. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2003. V. 1619. P. 39–52. [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(02\)00440-3](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(02)00440-3)
131. Colquhoun A. // *Mol. Neurobiol.* 2010. V. 42. P. 76–88. <https://doi.org/10.1007/s12035-010-8134-4>
132. Horvath S.E., Daum G. // *Prog. Lipid Res.* 2013. V. 52. P. 590–614. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.07.002>
133. Daum G., Vance J.E. // *Prog. Lipid Res.* 1997. V. 36. P. 103–130. [https://doi.org/10.1016/s0163-7827\(97\)00006-4](https://doi.org/10.1016/s0163-7827(97)00006-4)
134. Mårtensson C.U., Doan K.N., Becker T. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2017. V. 1862. P. 102–113. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2016.06.015>
135. Hsu P., Shi Y. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2017. V. 1862. P. 114–294. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2016.08.003>

136. Nelson D., Cox M. // *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5th ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2008.
137. Paradies G., Paradies V., Ruggiero F.M., Petrosillo G. // *Cells*. 2019. V. 8. P. 728.
<https://doi.org/10.3390/cells8070728>
138. Maguire J.J., Tyurina Y.Y., Mohammadyani D., Kapralov A.A., Anthonymuthu T.S., Qu F., Amoscato A.A., Sparvero L.J., Tyurin V.A., Planas-Iglesias J. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2017. V. 1862. P. 8–24.
<https://doi.org/10.1016/j.bbali.2016.08.001>
139. De Bruijn J.H. // *Br. J. Vener. Dis.* 1966. V. 42. P. 125–128.
<https://dx.doi.org/10.1136%2Fsti.42.2.125>
140. Schlame M., Towbin J.A., Heerdt P.M., Jehle R., DiMauro S., Blanck T.J. // *Ann. Neurol.* 2002. V. 51. P. 634–637.
<https://doi.org/10.1002/ana.10176>
141. Kagan V.E., Tyurin V.A., Jiang J., Tyurina Y.Y., Ritov V.B., Amoscato A.A., Osipov A.N., Belikova N.A., Kapralov A.A., Kini V. // *Nat. Chem. Biol.* 2005. V. 1. P. 223–232.
<https://doi.org/10.1038/nchembio727>
142. Kagan V.E., Chu C.T., Tyurina Y.Y., Cheikhi A., Bayir H. // *Chem. Phys. Lipids*. 2014. V. 179. P. 64–69.
<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.11.010>
143. Xiao M., Zhong H., Xia L., Tao Y., Yin H. // *Free Radic. Biol. Med.* 2017. V. 111. P. 316–327.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.363>
144. Tyurina Y.Y., Poloyac S.M., Tyurin V.A., Kapralov A.A., Jiang J., Anthonymuthu T.S., Kapralova V.I., Vikulina A.S., Jung M.Y., Epperly M.W. // *Nat. Chem.* 2014. V. 6. P. 542–552.
<https://doi.org/10.1038/nchem.1924>
145. Shoeb M., Ansari N.H., Srivastava S.K., Ramana K.V. // *Curr. Med. Chem.* 2014. V. 21. P. 230–237.
<https://doi.org/10.2174/09298673113209990181>
146. Forman H.J., Fukuto J.M., Miller T., Zhang H., Rinna A., Levy S. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2008. V. 477. P. 183–195.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.06.011>
147. Jaganjac M., Cacev T., Cipak A., Kapitanović S., Gall Troselj K., Zarković N. // *Croat. Med. J.* 2012. V. 53. P. 304–309.
<https://doi.org/10.3325/cmj.2012.53.304>
148. Ullery J.C., Marnett L.J. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2012. V. 1818. P. 2424–2435.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.04.014>
149. Hayes J.D., Dinkova-Kostova A.T. // *Trends Biochem. Sci.* 2014. V. 39. P. 199–218.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.002>
150. Poli G., Chiarpotto E., Biasi F., Pavia R., Albano E., Dianzani M.U. // *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 1982. V. 38. P. 71–76.
151. Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. // *Free Radic. Biol. Med.* 1991. V. 1. P. 81–128.
[https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90192-6)
152. Bradley M.A., Markesbery W.R., Lovell M.A. // *Free Radic. Biol. Med.* 2010. V. 48. P. 1570–1576.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.02.016>
153. Zhong H., Yin H. // *Redox Biol.* 2015. V. 4. P. 193–199.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.12.011>
154. Liu H., Xu J.Y. // *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2012. V. 35. P. 758–761.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23289993/>
<https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2012.10.012>
155. Csala M., Kardon T., Legeza B., Lizak B., Mandl J., Margittai E., Puskas F., Szaraz P., Szelenyi P., Banhegyi G. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2015. V. 1852. P. 826–838.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.01.015>
156. Xiao M., Zhong H., Xia L., Tao Y., Yin H. // *Free Radic. Biol. Med.* 2017. V. 111. P. 316–327.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.363>
157. Fedorova T.N., Logvinenko A.A., Poleshchuk V.V. // *Neurochem. J.* 2019. V. 13. P. 391–395.
<https://doi.org/10.1134/S1819712419040020>
158. Kruman I., Bruce-Keller A.J., Bredesen D., Waeg G., Mattson M.P. // *J. Neurosci.* 1997. V. 17. P. 5089–5100.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-13-05089.1997>
159. Abarikwu S.O., Pant A.B., Farombi E.O. // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2012. V. 110. P. 441–448.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00834.x>
160. Kraemer B.R., Snow J.P., Vollbrecht P., Pathak A., Valentine W.M., Deutch A.Y., Carter B.D. // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. P. 21205–21216.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m114.563403>
161. Poli G., Schaur R.J., Siems W.G., Leonarduzzi G. // *Med. Res. Rev.* 2008. V. 28. P. 569–631.
<https://doi.org/10.1002/med.20117>
162. Shin Y., White B.H., Uh M., Sidhu A. // *Brain Res.* 2003. V. 968. P. 102–113.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)04279-8](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)04279-8)
163. Fleuranceau-Morel P., Barrier L., Fauconneau B., Piriou A., Huguet F. // *Neurosci. Lett.* 1999. V. 277. P. 91–94.
[https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(99\)00652-7](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(99)00652-7)
164. Romano A., Serviddio G., Calcagnini S., Villani R., Giudetti A.M., Cassano T., Gaetani S. // *Free Radic. Biol. Med.* 2017. V. 111. P. 281–293.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.046>
165. Gray R., Ives N., Rick C., Patel S., Gray A., Jenkinson C., McIntosh E., Wheatley K., Williams A., Clarke C.E. // *Lancet*. 2014. V. 384. P. 1196–1205.
[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(14\)60683-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(14)60683-8)
166. Witt P.A.L., Fahn S. // *Neurology*. 2016. V. 86. P. S3–S12.
<https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000002509>
167. Mahlknecht P., Iranzo A., Högl B., Frauscher B., Müller C., Santamaria J., Tolosa E., Serradell M., Mitterling T., Gschliesser V., Goebel G., Brugger F., Scherfler C., Poewe W., Seppi K. // *Neurology*. 2015. V. 84. P. 654–658.
<https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000001265>
168. Cenci M.A. // *Front. Neurol.* 2014. V. 5. P. 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2014.00242>
169. Poewe W., Antonini A. // *Mov. Disorders*. 2015. V. 30. P. 114–120.
<https://doi.org/10.1002/mds.26078>
170. Müller T. // *Drugs*. 2015. V. 75. P. 157–174.
<https://doi.org/10.1007/s40265-014-0343-0>
171. Seppi K., Weintraub D., Coelho M., Perez-Lloret S., Fox S.H., Katzenschlager R., Hametner E.M., Poewe W., Rascol O., Goetz C.G., Sampaio C. // *Mov. Disord.* 2011. V. 26. P. S42–S80.
<https://doi.org/10.1002/mds.23884>
172. Ferreira J.J., Lees A., Rocha J.F., Poewe W., Rascol O., Soares-da-Silva P. // *Lancet Neurol.* 2016. V. 15.

- P. 154–165.
[https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(15\)00336-1](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(15)00336-1)
173. *Schapira A.H.V.* // *CNS Drugs*. 2011. V. 25. P. 1061–1071.
<https://doi.org/10.2165/11596310-000000000-00000>
174. *Birkmayer W., Riederer P., Ambrozi L., Youdim M.B.* // *Lancet*. 1977. V. 309. P. 439–443.
[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(77\)91940-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(77)91940-7)
175. *Connolly B.S., Lang A.E.* // *JAMA*. 2014. V. 311. P. 1670–1683.
<https://doi.org/10.1001/jama.2014.3654>
176. *Jankovic J., Poewe W.* // *Curr. Opin. Neurol.* 2012. V. 25. P. 433–447.
<https://doi.org/10.1097/wco.0b013e3283542fc2>
177. *Voon V., Mehta A.R., Hallett M.* // *Curr. Opin. Neurol.* 2011. V. 24. P. 324–330.
<https://doi.org/10.1097/wco.0b013e3283489687>
178. *de Lima M.S., de Oliveira Soares B.G., Reisser A.A., Farrell M.* // *Addiction*. 2002. V. 97. P. 931–949.
<https://doi.org/10.1046/j.1360-0443.2002.00209.x>
179. *Carroll F.I., Lewin A.H., Boja J.W., Kuhar M.J.* // *J. Med. Chem.* 1992. V. 35. P. 969–981.
<https://doi.org/10.1021/jm00084a001>
180. *Carroll F.I., Howell L.L., Kuhar M.J.* // *J. Med. Chem.* 1999. V. 42. P. 2721–2736.
<https://doi.org/10.1021/jm9706729>
181. *Carroll F.I., Lewin A.H., Abraham P., Parham K., Boja J.W., Kuhar M.J.* // *J. Med. Chem.* 1991. V. 34. P. 883–886.
<https://doi.org/10.1021/jm00113a008>
182. *El-Moselhy T.F., Avor K.S., Basmadjian G.P.* // *Archiv der Pharmazie*. 2001. V. 334. P. 275–278.
[https://doi.org/10.1002/1521-4184\(200109\)334:8/9%3C275::AID-ARDP275%3E3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1521-4184(200109)334:8/9%3C275::AID-ARDP275%3E3.0.CO;2-B)
183. *Plisson C., McConathy J., Martarello L., Malveaux E.J., Camp V.M., Williams L., Votaw J.R., Goodman M.M.* // *J. Med. Chem.* 2004. V. 47. P. 1122–1135.
<https://doi.org/10.1021/jm030384e>
184. *Blough B.E., Keverline K.I., Nie Z., Navarro H., Kuhar M.J., Carroll F.I.* // *J. Med. Chem.* 2002. V. 45. P. 4029–4037.
<https://doi.org/10.1021/jm020098n>
185. *Carroll F.I., Blough B.E., Nie Z., Kuhar M.J., Howell L.L., Navarro H.A.* // *J. Med. Chem.* 2005. V. 48. P. 2767–2771.
<https://doi.org/10.1021/jm040185a>
186. *Zou M.F., Kopajtic T., Katz J.L., Newman A.H.* // *J. Med. Chem.* 2003. V. 46. P. 2908–2916.
<https://doi.org/10.1021/jm0300375>
187. *Raje S., Cornish J., Newman A.H., Cao J., Katz J.L., Eddington N.D.* // *Pharm. Res.* 2005. V. 22. P. 603–612.
<https://doi.org/10.1007/s11095-005-2488-8>
188. *Andersen P.H.* // *Eur. J. Pharmacol.* 1989. V. 166. P. 493–504.
[https://doi.org/10.1016/0014-2999\(89\)90363-4](https://doi.org/10.1016/0014-2999(89)90363-4)
189. *Izenwasser S., Werling L.L., Cox B.M.* // *Brain Res.* 1990. V. 520. P. 303–309.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91719-W](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91719-W)
190. *Matecka D., Rothman R.B., Radesca L., de Costa B.R., Dersch C.M., Partilla J.S., Pert A., Glowa J.R., Wojnicki F.H., Rice K.C.* // *J. Med. Chem.* 1996. V. 39. P. 4704–4716.
<https://doi.org/10.1021/jm960305h>
191. *Matecka D., Lewis D., Rothman R.B., Dersch C.M., Wojnicki F.H., Glowa J.R., DeVries A.C., Pert A., Rice K.C.* // *J. Med. Chem.* 1997. V. 40. P. 705–716.
<https://doi.org/10.1021/jm9606599>
192. *Tomlinson I.D., Mason J., Burton J.N., Blakely R., Rosenthal S.J.* // *Tetrahedron*. 2003. V. 59. P. 8035–8047.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(03\)01179-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(03)01179-7)
193. *Carter D.S., Cai H.Y., Lee E.K., Iyer P.S., Lucas M.C., Roetz R., Schoenfeld R.C., Weikert R.J.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010. V. 20. P. 3941–3945.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.05.008>

Role of Oxidative Stress in the Etiology of Parkinson's Disease. Advanced Therapeutic Products

A. V. Lavrova*, #, N. M. Gretskaya*, and V. V. Bezuglov*

*Phone: +7 (495) 330-65-92; e-mail: alinalavrova1@gmail.com

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

The etiology of Parkinson's disease is not exactly known. However, it has been established that oxidative stress is a key factor initiating and accelerating neurodegeneration. The lack of clear understanding of the etiology and the delayed manifestation of the disease symptoms complicate the prevention and drugs development for the etiotropic therapy of Parkinson's disease. Nevertheless, modern medicine is able to maintain the patient's quality of life by providing symptomatic treatment with drugs that increase dopamine levels and, thereby, eliminate the motor symptoms of the disease. This article discusses the mechanisms of oxidative stress in dopaminergic neurons, provides an overview of modern agents for the treatment of Parkinson's disease that maintain dopamine levels in synapses, and proposes a promising approach aimed at eliminating oxidative stress in cells of the dopaminergic system.

Keywords: Parkinson's disease, dopaminergic system, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, levodopa, dopamine transporter, dopamine agonists, dopamine reuptake inhibitors



УДК 577.115:616.8

РОЛЬ СФИНГОЗИН-1-ФОСФАТА В НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

© 2021 г. У. А. Гутнер*, #, М. А. Шупик*

**Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Косыгина, 4*

Поступила в редакцию 26.11.2020 г.

После доработки 15.12.2020 г.

Принята к публикации 18.12.2020 г.

Сфингозин-1-фосфат (S1P) — биологически активный сфинголипидный метаболит, обладающий антиапоптотическим действием. В качестве сигнальной молекулы S1P регулирует выживаемость клеток и их дифференцировку, подвижность и динамику цитоскелета, участвует в процессах клеточной миграции, пролиферации и аутофагии. Содержание S1P в клетке регулируется специфическими киназами и фосфатазами, а также ферментом деградации S1P — S1P-лиазой. Значительную часть своих функций S1P осуществляет в качестве лиганда к специфическим мембранным рецепторам, связанным с G-белками (S1PR₁₋₅). Рецепторы S1P экспрессируются всеми типами клеток, в том числе нейронами и клетками глии. В центральной нервной системе S1P может выполнять защитные функции и индуцировать стимулирующие выживание сигнальные пути или же, напротив, способствовать развитию патологических процессов, в том числе при нейродегенеративных заболеваниях. Функции S1P, экспрессия его рецепторов и их действие зависят от типа клеток ЦНС, стадии их развития и состояния всего организма. На основе действия S1P разработан препарат финголимод, который, связываясь с рецепторами S1P с высокой аффинностью, уменьшает воспалительную клеточную инфильтрацию, повреждение тканей и демиелинизацию. В настоящем обзоре освещаются последние достижения в понимании механизмов действия S1P и его роли в нейродегенеративных заболеваниях (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз).

Ключевые слова: сфингозин-1-фосфат, сфингозинкиназа, нейродегенеративные заболевания, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз

DOI: 10.31857/S0132342321050274

ВВЕДЕНИЕ

В основе всех нейродегенеративных заболеваний (НДЗ) лежат изменения в структуре и функциях нейронов, приводящие к гибели этих клеток. Общеизвестно, что каскад нейробиологических событий, приводящих к развитию НДЗ, начинается задолго до появления симптомов болезни, прогрессирование нейродегенерации происходит медленно и незаметно, поэтому когда проявляются явные симптомы, популяции специфических нейронов уже фактически уничтожены [1]. Современная мультифакторная концепция НДЗ заключается в том, что НДЗ не являются прямым результатом определенного этиопатоген-

нетического процесса (например, только вследствие нарушения амилоидогенеза при болезни Альцгеймера), а развиваются при комплексном взаимодействии между различными патогенетическими процессами, включая предрасполагающие факторы (факторы риска), последствия тех или иных патогенетических событий, например, нарушения в иммунной системе или нарушения церебральной гемодинамики и микроциркуляции, или параллельно развивающиеся патогенетические процессы — аномальный амилоидогенез, воспалительная реакция глии, нарушение фосфорилирования τ -белка и др. [2]. Несмотря на многочисленные исследования нейробиологических основ и патогенетических механизмов НДЗ, до сих пор не найдены ни их основные причины, ни эффективные терапевтические подходы в борьбе с этими заболеваниями [3].

Значительную роль в нормальной физиологии ЦНС играют липиды, оказывая влияние на широкий спектр функций мозга, вплоть до изменений настроения, восприятия и эмоционального поведения. Липиды, наряду со структурными и

Сокращения: БА — болезнь Альцгеймера; БАС — боковой амиотрофический склероз; БП — болезнь Паркинсона; НДЗ — нейродегенеративные заболевания; S1P — сфингозин-1-фосфат; S1PR — рецептор сфингозин-1-фосфата; SK — сфингозинкиназа; СФМ — сфингомиелин; A β — β -амилоидный пептид; APP — предшественник β -амилоидного пептида; PLC — фосфолипаза C; SOD — супероксиддисмутаза.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 939-71-59; эл. почта: uliana.goutner@gmail.com).

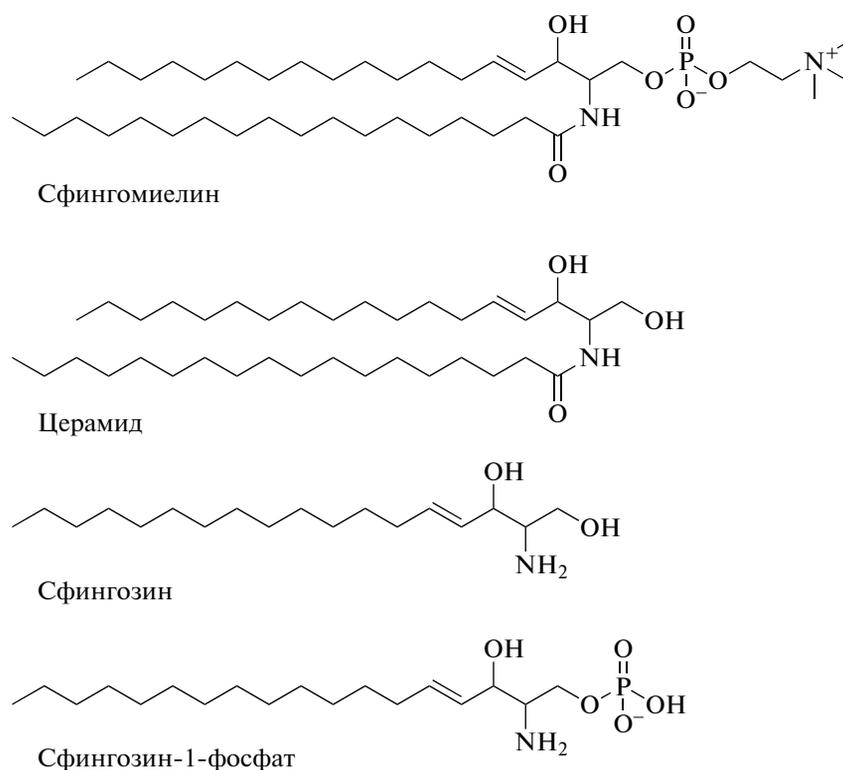


Рис. 1. Основные метаболиты сфингомиелинового цикла.

энергетическими, выполняют также регуляторные функции и служат источником биоактивных молекул-посредников межклеточной коммуникации и передачи сигналов внутри клетки, а липидный дисбаланс – характерная черта нейродегенерации. В последнее десятилетие значительно возрос интерес к изучению роли липидов в патогенезе заболеваний мозга, включая рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера (БА) и болезнь Паркинсона (БП), боковой амиотрофической склероз (БАС), шизофрению, инсульты и др. [4, 5]. Полученные данные дают представление о тесной связи патогенеза заболеваний ЦНС с нарушениями метаболизма липидов, среди которых особый интерес вызывают сфинголипиды.

Сфинголипиды представляют собой класс высокоактивных биологических соединений, выполняющих не только структурную функцию в клеточной мембране, но и участвующих в передаче клеточных сигналов, регуляции клеточного роста, миграции клеток, апоптозе, воспалении, ангиогенезе [6–9]. В ЦНС сфинголипиды играют исключительно важную роль: они служат необходимыми компонентами миелина, необходимыми для нейрогенеза, синаптогенеза, передачи нервного импульса и многих других процессов, поддерживающих гомеостаз мозга в норме и/или участвующих в развитии патологии [6]. Нарушения сфинголипидного метаболизма оказывают

негативное влияние на структурные и физиологические свойства мозга, функции нейронов и нейроглии, включая мембранный транспорт и контроль над активностью ферментов. Многие заболевания ЦНС, включая НДЗ, связаны с дисбалансом сфинголипидного метаболизма [6, 7, 10].

Среди разнообразных представителей класса сфинголипидов (рис. 1) выделяют группу сфингоидных оснований, или сфингоидов, которые обладают относительно небольшой молекулярной массой и отличаются друг от друга длиной углеродной цепи, количеством двойных связей и их расположением. К этой группе относят сфингозин, сфингозин-1-фосфат, сфинганин, психозин и др. [8, 11]. Сфингоиды выполняют функции метаболических медиаторов, которые модулируют широкий спектр физиологических процессов, включая передачу клеточного сигнала, регуляцию клеточного метаболизма и устойчивости клетки к стрессу, пролиферацию, дифференциацию [8, 12]. Постоянно увеличивается количество данных, доказывающих участие биоактивных сфинголипидов, в частности сфингоидов, в процессах развития НДЗ [6, 12–14].

Основное внимание в данном обзоре уделено сфингозин-1-фосфату (S1P) в связи с его уникальными свойствами. S1P – один из липидных мессенджеров, научный интерес к которому постоянно возрастает в течение последних несколь-

ких десятилетий [15]. Интерес к S1P вызван его широким спектром действия: несмотря на то, что S1P – минорный компонент клеточного метаболизма, он обладает исключительными биологическими свойствами: регулирует выживаемость клеток и их дифференцировку, подвижность и динамику цитоскелета, играет специфическую роль в иммунном статусе и ангиогенезе [13, 16], участвует в регуляции сердечно-сосудистой деятельности [17], развитии патологий печени [18], атеросклероза [19], онкологических [13, 15, 20] и других патологических процессов.

В данном обзоре рассмотрены вопросы метаболизма S1P, механизмы его действия как аутокринного и паракринного агента, а также роль S1P в ЦНС в норме и при нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и боковой амиотрофический склероз.

СТРУКТУРА И МЕТАБОЛИЗМ СФИНГОЗИН-1-ФОСФАТА

Биосинтез S1P. S1P принадлежит к классу сфинголипидов – амфипатических липидных молекул, содержащих в своей структуре алифатический спирт сфингозин. Начало биосинтеза всех сфинголипидов – конденсация L-серина и жирной кислоты при помощи фермента серин-С-пальмитойлтрансферазы. Продукт этой реакции – 3-кетодигидросфингозин, редуцирующийся затем до сфинганина (дигидросфингозина). Сфинганин путем ацилирования жирными кислотами превращается в дигидроцерамид с помощью одной из шести церамидсинтаз (CerS1–CerS6). В результате десатурации дигидроцерамид превращается в церамид – проапоптотический вторичный мессенджер, играющий важную роль в развитии клетки как в норме, так и при различных патологиях, включая нейродегенеративные процессы [4, 12]. Далее церамид может быть модифицирован и при посредстве добавления различных групп образовывать сложные сфинголипиды – сфингомиелины, церамид-1-фосфат, гликозилцерамиды, ганглиозиды и др. [4], и, наоборот, вследствие обратимых реакций сфингомиелинового метаболизма, сложные сфинголипиды могут быть источником церамида.

В процессе деацилирования церамида ферментом церамидазой образуется сфингозин. Сфингозин, в свою очередь, может быть использован либо для ресинтеза церамида, либо для образования S1P (рис. 2) [7, 21]. Наиболее распространенная форма S1P – фосфат 18-углеродного сфингозина (sphing-4-enine-1-phosphate ($C_{18}H_{38}NO_5P$), $M_r = 379.2488$), хотя существуют и другие сфингоидные основания и их фосфаты [11]. Баланс между церамидом, сфингозином и S1P – так называ-

емый сфинголипидный реостат – имеет жизненно важное значение для поддержания гомеостаза организма [13, 22–26]. Основные регуляторы, осуществляющие контроль над точным соотношением содержания в клетке проапоптотических церамида и сфингозина и, с другой стороны, S1P, обладающий антиапоптотическим и пролиферативным действием, – сфингозинкиназы (SK).

Выделены и описаны две основные изоформы сфингозинкиназ – типа 1 и 2, которые, имея сходную полипептидную структуру, существенно отличаются кинетическими свойствами, локализацией в клетке и физиологическими функциями [13, 22, 23]. Сфингозинкиназа 1 (SK-1) – ключевой фермент, регулирующий сфинголипидный реостат и выступающий наиболее изучаемым ферментом метаболизма S1P. Базовый уровень активности SK-1 сохраняет клеточный баланс сфингозина и S1P, а при воздействии на клетку ряда агонистов, включая провоспалительные цитокины, различные факторы роста и, что особенно интересно, сам S1P, происходит активация SK-1 посредством ее фосфорилирования, связанного с ERK1/2, и перемещение на плазматическую мембрану [24].

Мембраносвязанный фермент SK-1 локализован в обогащенных сфингомиелином и холестерином микродоменах (рафтах) и взаимодействует с кислыми фосфолипидами – фосфатидилсеринном и фосфатидной кислотой [25], а также связанными с SK-1 белками из семейства кальмодулинов [25]. S1P, образованный SK-1, проявляет антиапоптотические свойства, способствует пролиферации, выживаемости и миграции клеток, участвует в дифференциации, нейрогенезе и ангиогенезе [27].

Сфингозинкиназа 2 (SK-2) менее изучена, чем SK-1. Содержание SK-2 в клетках в несколько раз ниже, чем SK-1 [18], SK-2 локализована во внутриклеточных мембранных структурах и не секретируется во внеклеточное пространство. SK-2 находится в основном в клеточном ядре [28]. При активации SK-2, так же как и SK-1, происходит ее фосфорилирование, и так же, как и SK-1, SK-2 проявляет свойства “челнока” – способность перемещаться между ядром и цитозолем [22]. Ядерная форма SK-2 ингибирует деацетилазы гистонов HDAC1 и HDAC2, таким образом, через этот фермент проявляется опосредованное влияние сфингомиелинового метаболизма на регуляцию экспрессии генов [18]. Самое существенное отличие двух изоформ SK состоит в противоположном действии образуемого ими S1P: S1P, получившийся в результате активации SK-1, способствует клеточному росту и пролиферации, тогда как активация SK-2 и накопление S1P, образованного SK-2, приводит к ингибированию роста клеток и индуцирует апоптоз [29]. Это возможно след-



Рис. 2. Метаболизм сфингозин-1-фосфата (S1P) в клетке.

ствие того, что изоформы SK имеют различную локализацию в клетке: SK-1, перемещаясь при активации из цитозоля в плазматическую мембрану, способствует внеклеточному транспорту S1P и дальнейшему взаимодействию с рецепторами, сопровождающемуся пролиферативным действием; тогда как SK-2 в значительной мере находится в ЭПР и/или ядре и связана с образованием внутриклеточного S1P [24].

Образованный сфингозинкиназами S1P может выводиться из сфингомиелинового цикла: деградация S1P осуществляется при помощи S1P-лиазы, которая превращает S1P в этаноламинфосфат и гексадеценаль (рис. 2) [20, 21]. Этот процесс — единственная необратимая реакция цикла СФМ, в котором S1P выступает конечным звеном.

Механизмы действия сфингозин-1-фосфата. S1P включается в различные метаболические пути: он может быть вовлечен во внутриклеточный метаболизм или транспортироваться во внеклеточное пространство.

Внутриклеточный метаболизм S1P (рис. 3) в первую очередь связан с его способностью обратимо превращаться в сфингозин и затем церамид, и в таком случае S1P может служить проапоптотическим агентом, способствуя образованию церамида. Кроме того, S1P участвует в регуляции содержания внутриклеточного кальция: S1P активирует кальциевые рецепторы, которые через активацию

фосфолипазы C (PLC) ведут к высвобождению ионов кальция из внутриклеточных кальциевых депо [30]. Как уже было сказано, S1P, образованный ядерной формой SK-2, ингибирует ацетилирование гистоновых белков, таким образом опосредованно влияя на экспрессию генов [31]. Кроме того, S1P регулирует активность TRAF-2 (TNF receptor-associated factor 2), ключевого компонента в клеточном сигналинге NF-κB [32]. Также S1P — регулятор высококонсервативного митохондриального белка прохибитина 2 (PHB2), который необходим для нормального функционирования дыхательной цепи и других клеточных процессов [33].

Одна из наиболее важных функций S1P — участие в процессах аутофагии, способствующих воспроизводству необходимых компонентов для повышения жизненных функций клетки. S1P, совместно с другими сфинголипидами, — ключевое звено секреции экзосом, включая формирование экзосом, их инкапсулирование и перенос микроРНК через плазматическую мембрану, что может регулировать соотношение содержания биоактивных сфингоидных оснований сфингозин/S1P [34]. В свою очередь, ферменты метаболизма S1P — SK-1 и S1P-лиаза — могут влиять на процессы аутофагии: SK1 способствует развитию процессов аутофагии, S1P-лиаза положительно влияет на выживаемость нейронов, защищая их от действия токсичного белка хантингтина (Htt),

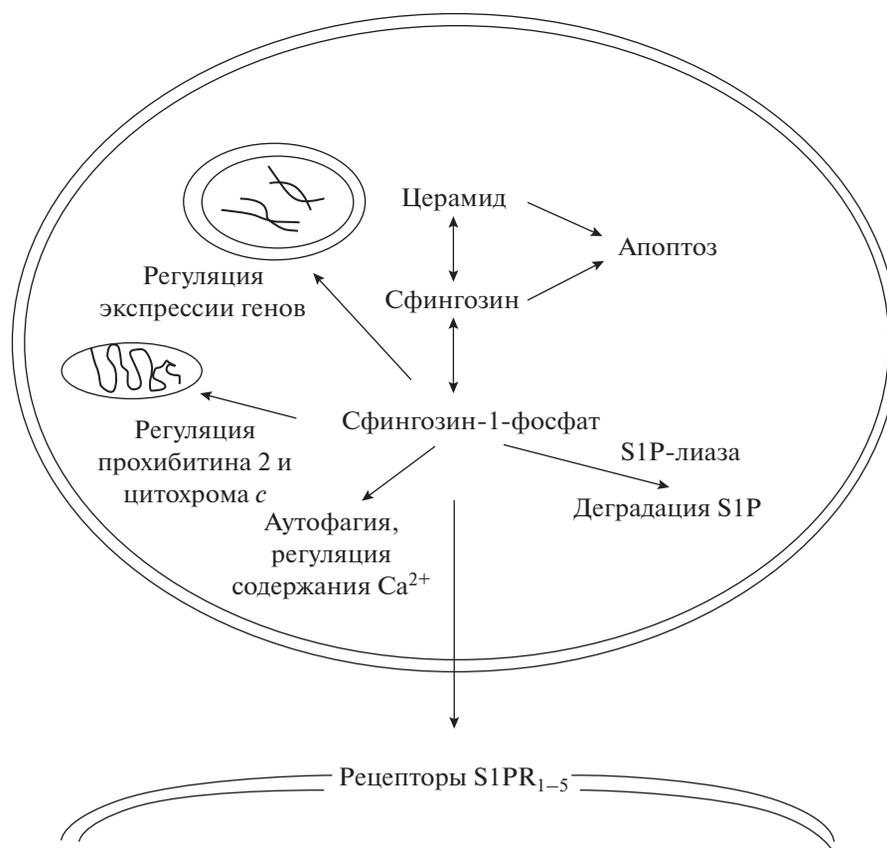


Рис. 3. Внутриклеточные пути метаболизма сфингозин-1-фосфата (S1P).

нарушения метаболизма которого связаны с нарушениями аутофагии [35].

Транспорт S1P во внеклеточное пространство. S1P может быть транспортирован несколькими путями: 1) при помощи транспортных белков ABC-семейства; 2) с помощью секретируемого в межклеточное пространство фрагмента сфингозинкиназы SK-1; 3) посредством АТФ-зависимого транспортного белка SPNS2 (spinster homolog 2) [13, 20, 21]. Далее S1P может действовать в качестве липидного мессенджера в свободной форме или, как и другие сфинголипиды, включаться в состав липопротеинов и транспортироваться в плазму крови. В плазме S1P содержится в основном в составе липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) (~50–60%) и альбумина (30–40%), незначительно – в составе липопротеинов низкой плотности ЛНП (8%) и липопротеинов очень низкой плотности ЛПОНП (2–3%) [9]. Основным источником S1P в плазме крови – клетки печени, а также эритроциты и тромбоциты, которые вследствие уникального сфинголипидного метаболизма способны накапливать S1P [19, 21]. Концентрация S1P в плазме в норме составляет в среднем ~200 нМ (100–370 нМ) [21] и регулируется как на клеточном уровне (при участии транспортного белка SPNS2), так и на организменном (напри-

мер, белок ApoM, связывающий S1P с липопротеином, защищает S1P от деградации фосфатазами) [19, 21]. Плазматический S1P может быть вовлечен в метаболические процессы через присоединение к специфическим рецепторам.

Рецепторы S1P. Основные свойства S1P проявляются при его связывании со специфическими рецепторами S1PR₁–S1PR₅ (рис. 4), которые отличаются друг от друга уровнем экспрессии в тканях и своими функциями [17, 36]. В клетках животных рецепторы S1PR₁–S1PR₃ встречаются во всех тканях, тогда как S1PR₄ обнаружен только в лимфоидных тканях и легких, а S1PR₅ – в мозге и эпителиальных клетках [37].

S1PR₁ специфически соединен с G_i-белком, α-субъединица которого ингибирует cAMP-зависимый сигнальный каскад и может активировать разные сигнальные пути: PI3K/AKT, PI3K/Rac, Ras/ERK и фосфолипазы C (PLC), которые способствуют клеточному росту, выживаемости клеток, их миграции и пролиферации, ангиогенезу, а также синтезу клетками цитокинов.

S1PR₂ может присоединяться к различным Gα-белкам, включая G_i, G_{12/13} и G_q, таким образом, этот рецептор способен запускать разнообразные сигнальные каскады и, соответственно,

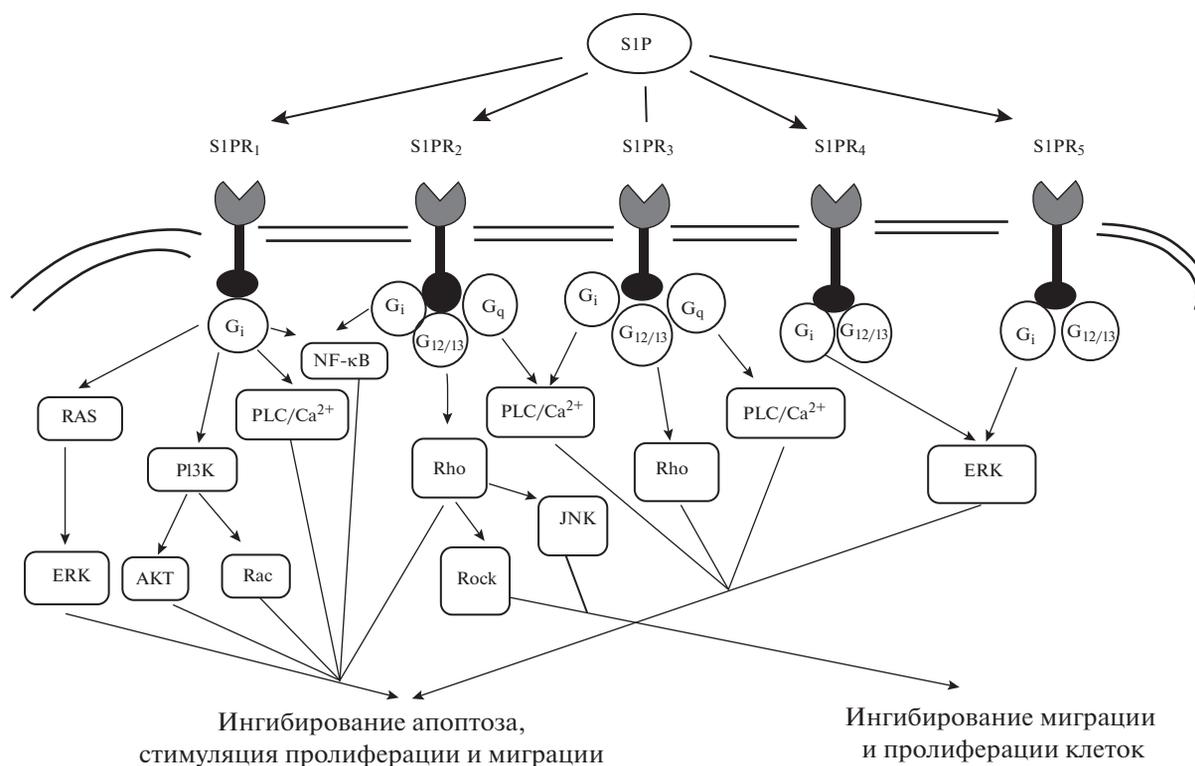


Рис. 4. Сигнальные пути, инициируемые активацией рецепторов сфингозин-1-фосфата (S1P).

индуцировать разные клеточные ответы. Исследования показывают, что активация S1PR₂ часто (хотя и не всегда) приводит к прекращению пролиферации клеток и, например, к подавлению опухолевой активности.

S1PR₃ по распространенности и своему действию сходен с S1PR₁, хотя и ассоциирован с G_i, G_q и G_{12/13} α-субъединицами G-белков. Результатом активации S1PR₃ чаще всего выступают клеточная миграция, пролиферация и ингибирование апоптоза.

S1PR₄ и S1PR₅ менее распространены в организме и менее изучены. Известно, что они присоединяются к G_i и G_{12/13}, способствуют пролиферации клеток и играют значительную роль в воспалительных процессах [20].

Кроме того, показано, что механизмы действия S1P/S1PR связаны с внеклеточными киназами, регулирующими проведение клеточного сигнала [38], экспрессию цитокинов (TNF-α) и их рецепторов (CD-40) [39, 40].

В основе антиапоптотических и цитопротекторных свойств S1P лежат различные механизмы регуляции S1P и его рецепторов, в первую очередь, опосредованных PI3K/Акт-сигнальным путем [41, 42]. Также, действуя как аутокринный фактор, S1P способен ингибировать образование церамида кислот сфингомиелиназой [43, 62]. S1P

снижает окислительный стресс и модулирует экспрессию про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2 и каспазы 3 [44]. S1P может активировать регуляторные белки p38, ERK и блокировать JNK в различных тканях [45]. Сигнальный путь ERK связан с цитопротекторным действием S1P и способствует выживаемости и пролиферации клеток, опосредованной активацией SK-1 [46]. S1P – регуляторный фактор активности AMP-активируемой протеинкиназы (АМПК) – одного из ключевых ферментов, отвечающих за фосфорилирование τ-белка [47]. S1P оказывает влияние на транскрипционные факторы FOXO3a [48], AP-1 [49] и NF-κB [50]. S1P и SK-1 взаимодействуют непосредственно с TNF-ассоциированным фактором TRAF2, причем S1P действует как кофактор TRAF2 [33, 50].

Таким образом, присоединение S1P к S1PR приводит к активации сопряженных с S1PR G-белками, которые могут индуцировать различные сигнальные пути (в зависимости от типа α-субъединицы G-белков), и чаще всего включает активацию фосфатидилинозитид-3-киназы (phosphoinositide 3-kinases, PI3Ks), протеинкиназы АКТ и фосфолипазы С. Соответственно, активация рецепторов S1P может приводить к различным, вплоть до антагонистичным, клеточным ответам, которые зависят от типа рецептора. Так, S1PR₁ и S1PR₃ индуцируют миграцию иммунных клеток,

тогда как S1PR₂ обладает противоположными функциями – запускает клеточный механизм ингибирования клеточного хемотаксиса, что особенно важно при воспалительных и иммунных процессах [16, 51]. Возможно, антиапоптотический и пролиферативный эффект S1P обеспечивается за счет наибольшей распространенности в тканях S1PR₁, тогда как другие рецепторы S1P выполняют локальные функции. Например, экспрессия S1PR₅ характерна только для клеток ЦНС, где этот рецептор играет особую роль в развитии и функционировании олигодендроцитов и нейронов [52].

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ S1P В ЦНС

Сфинголипиды играют важнейшую роль в метаболизме нервных клеток как на стадиях эмбрионального и постэмбрионального развития мозга, так и во взрослом организме, а также при нормальном старении и различных патологиях ЦНС [4, 6, 12]. Сфингомиелин и его метаболиты, выступающие основными структурными компонентами миелина, участвуют в дифференциации нейронов, синаптической трансмиссии, нейронально-глиальной взаимодействии, поддержании стабильности миелина [53]. S1P и ферменты его метаболизма также вовлечены в регуляцию гомеостаза мозга, участвуют в физиологических и патологических процессах в ЦНС (табл. 1) [12, 35, 51].

S1P и глия. Астроциты выступают наиболее распространенными клетками ЦНС и преобладающей частью глии, поддерживающей гомеостаз мозга. При нейропатологиях происходит активация астроглии, клетки которой начинают синтезировать провоспалительные медиаторы (цитокины), причем этот процесс взаимосвязан с метаболизмом S1P. Так, IL-1 индуцирует экспрессию SK-1, SK-1 генерирует S1P [54], в свою очередь, S1P может вызывать астроглиоз [55]. Делеция генов, кодирующих SK-1 или S1PR₃, в астроцитах также может усиливать астроглиоз, что указывает на участие S1P в астроглиозе и воспалительных процессах [56].

В норме астроциты преимущественно экспрессируют S1P-рецепторы типов 1 и 3, также могут экспрессировать S1PR₂, но на низком уровне; S1PR₅ не экспрессируется *in vivo*, но может быть обнаружен в клеточной культуре астроцитов [57]. При селективном удалении S1PR₁ у астроцитов наблюдалось снижение экспрессии провоспалительных цитокинов, повышение содержания S1P, а также замедление процессов демиелинизации, потери аксонов и астроглиоза, индуцированные при развитии патологии в модели рассеянного склероза (экспериментального аллергического энцефаломиелита (ЕАЕ)) [58]. В культурах клеток мозга, нокаутных по S1PR₁, не

обнаруживали признаков смягчения проявлений ЕАЕ [58], что говорит об участии S1PR₁ в активации астроглии. Кроме того, при воспалительных процессах в астроцитах отмечено повышение экспрессии S1PR₃ и SK [59]. Возможно, что опосредованная S1PR₁ активация астроглии – одно из ключевых звеньев в воспалительных процессах и, в целом, в развитии различных патологий нервной системы.

Микроглия участвует в различных процессах ЦНС, в том числе в процессах врожденного и приобретенного иммунитета, а также демиелинизации, при этом механизмы действия микроглии сопряжены с метаболизмом сфинголипидов [60]. Характерная для нейровоспалительных процессов активация микроглии, так же как и в астроглии, сопровождается экспрессией рецепторов S1P, причем экспрессия рецепторов типов 1 и 3 значительно выше, чем типов 2 и 5 [61].

Как и клетки астроглии, микроглиальные культуры при активации экспрессируют провоспалительные цитокины. При этом обнаружено, что S1P и SK вовлечены в процесс их синтеза: ингибирование SK1 приводит к снижению экспрессии мРНК TNF- α , IL-1 β и индуцибельной NO-синтазы, а также индукции синтеза TNF- α [62]. Активация микроглии (в условиях ишемического стресса) сопровождается повышением экспрессии SK-1, ингибирование SK-1 приводит к снижению синтеза IL-17 и снижению апоптоза нейронов, а добавление в культуральную среду S1P приводит к повышению синтеза цитокинов и усилению процессов апоптоза [63]. Эти немногочисленные данные подтверждают участие метаболизма S1P в активации клеток микроглии и, соответственно, в воспалительных и иммунных процессах мозга, однако требуют дополнительных исследований.

Олигодендроциты – миелинообразующие клетки ЦНС, непосредственно вовлеченные в характерные для всех НДЗ процессы демиелинизации и ремиелинизации. Для ремиелинизации необходимы клетки-предшественники олигодендроцитов, которые при патологических процессах мигрируют к месту повреждения и превращаются в зрелые олигодендроциты. В зависимости от стадии развития олигодендроцитов изменяются типы рецепторов S1P, а также действие S1P: если для клеток-предшественников характерен высокий уровень экспрессии S1PR₁ и значительно более низкий – S1PR₅ и S1PR₃, то зрелые олигодендроциты экспрессируют в основном S1PR₅ и значительно меньше – S1PR₁, S1PR₂ и S1PR₃ [52, 57, 64, 65]. В клетках-предшественниках олигодендроцитов S1P влияет на дифференциацию, миграцию и выживание [52, 64], тогда как на зрелые олигодендроциты S1P может оказывать проапоптотическое действие: как показано в иссле-

Таблица 1. Участие сфингозин-1-фосфата (S1P), ферментов его метаболизма и рецепторов S1P в физиологических и патофизиологических процессах, протекающих в ЦНС

Объект исследования/ патология	Действие S1P и его метаболитов	Ссылки
Астроциты	S1P и делеция гена, кодирующего SK-1 или S1PR ₃ , вызывают астроглиоз. S1PR ₁ , S1PR ₃ и SK-1 участвуют в воспалительных процессах	[55], [56] [58], [59]
Микроглия	Активация микроглии вызывает экспрессию S1PR ₁ и S1PR ₃ . S1P и SK-1 модулируют синтез провоспалительных цитокинов	[60], [61] [62], [63]
Олигодендроциты	S1P влияет на миграцию, дифференциацию и выживание клеток-предшественников. Экспрессия рецепторов: преобладание S1PR ₁ в клетках-предшественниках, S1PR ₅ – в зрелых клетках	[52], [64] [52], [57], [64], [65]
Нейроны	S1P участвует в нейрогенезе, способствует выживаемости клеток-предшественников и зрелых нейронов. Экспрессия рецепторов: S1PR ₁ , S1PR ₂ , S1PR ₃ и S1PR ₅ – в клетках-предшественниках, преобладание S1PR ₁ и S1PR ₃ в зрелых клетках. S1P стимулирует образование нейритов, секрецию нейромедиаторов, снижает эксайтотоксичность. Накопление S1P приводит к апоптозу нейронов. S1P способствует защите нейронов от цитотоксического действия Aβ. SK-1 способствует защите нейронов от апоптотического действия AФК	[68], [71] [57], [69] [41], [69], [72], [73], [74], [84] [75] [43] [79]
Болезнь Альцгеймера	Снижение уровня S1P, снижение активности SK-1 и S1P-лиазы в процессе развития патологии. Повышенная активность SK-1 и недостаток S1P-лиазы, активация S1PR ₁ при гиперфосфорилировании τ-белка. S1P модулирует активность BACE1. Повышение S1P способствует накоплению APP	[41], [91], [92] [47], [93] [94] [95]
Болезнь Паркинсона	Снижение активности и экспрессии генов, кодирующих SK-1 и SK-2. Снижение экспрессии S1PR ₁ . СК ингибируют секрецию α-синуклеина, участвуют в механизмах защиты нейронов от окислительного стресса. Ингибирование SK-1 и SK-2 способствует развитию цитотоксического ответа на секрецию α-синуклеина, нарушение дыхательной цепи, снижение клеточного АТФ. Ингибирование S1PR ₁ оказывает защитный эффект против нейродегенерации в клеточной модели БП и моделях БП на мышцах	[98], [99] [100] [99] [99] [99], [101], [103], [104]
Боковой амиотрофический склероз;	Экспрессия SK-1 и SK-2, уровень содержания некоторых молекулярных видов церамидов и сфингозина коррелирует со степенью тяжести заболевания. Повышение экспрессии S1P-лиазы, снижение экспрессии S1P-фосфатазы	[107] [108]

довании Qin et al. [66], добавление в культуральную среду S1P приводит к апоптозу олигодендроцитов и нейронов за счет накопления сфингозина и церамида. Влияние S1P на миграцию предшественников олигодендроцитов указывает на его потенциальную роль в процессах нейропластичности и ремиелинизации, для которых необходимы пролиферация клеток-предшественников, их миграция к месту демиелинизации и дифференциация. Специфика функций зрелых олигодендроцитов, очевидно, также связана с метаболизмом S1P и его рецепторов, о чем говорит, например, преобладание у них S1PR₅, в отличие от клеток-предшественников.

В ЦНС постоянно осуществляется активное взаимодействие клеток глии друг с другом как для поддержания гомеостаза мозга, так и в случае развития патологии. Например, в процессах демиелинизации реактивные астроциты формируют так называемый глиальный рубец, который ослабляет процесс ремиелинизации [54, 55]. С другой стороны, известно, что астроциты способны действовать как клеточные медиаторы миелинизации, способствуя миграции, пролиферации и дифференциации клеток-предшественников олигодендроцитов [55]. Было показано непосредственное участие в этих процессах рецепторов S1P: астроциты регулируют экспрессию S1PR₃ в клетках-предшественниках олигодендроцитов и способствуют их пролиферации [67].

Таким образом, S1P вовлечен в регуляцию активации клеток микроглии и астроцитов, а также индукцию ими синтеза провоспалительных цитокинов, тем самым способствуя развитию воспалительных, иммунных и нейрогенеративных процессов. С другой стороны, для олигодендроцитов S1P – фактор созревания клеток-предшественников, а также один из наиболее существенных компонентов для их миграции и дифференциации, необходимых для поддержания функций мозга, нейропластичности и ремиелинизации.

S1P и нейроны. Одна из наиболее значимых для ЦНС функция S1P и ферментов, регулирующих его метаболизм, – участие S1P в нейрогенезе. S1P способствует выживаемости и росту нейронов как на эмбриональных стадиях развития организма, так и в зрелом возрасте [68]. Однако метаболизм S1P в нейронах существенно отличается в зрелых нейронах и клетках-предшественниках, изменяясь в зависимости от степени их зрелости. Исследования на культурах нервных клеток-предшественников и моделях на трансгенных животных показали, что действие S1P в нейрогенезе в значительной степени связано с S1PR₁ [68]. Так, нервные клетки-предшественники могут экспрессировать S1P-рецепторы 1, 2, 3 и 5 типов, тогда как зрелые нейроны экспрессируют S1PR₁ и S1PR₃ [57, 69]. Изменения в метаболизме S1P

приводят к патологиям нейрогенеза, что происходит, например, при делеции гена S1P₁ или делеции обоих генов SK 1 и 2 [68]. S1PR₂-нокаутные мыши теряют слух, равновесие и проявляют другие признаки нарушения поведения и нейродегенерации [70]. В культурах нервных клеток-предшественников S1P вызывает клеточную пролиферацию, морфологические изменения и повышает выживаемость клеток [71].

В культурах зрелых нейронов S1P стимулирует образование нейритов [72], а также повышает возбудимость, индуцированную фактором роста нервов [73]. Была показана способность S1P увеличивать секрецию нейромедиаторов, в частности глутамата, в нейронах гиппокампа [69]. В культуре кортикальных нейронов S1P оказывал защитное действие от эксайтотоксической гибели клеток [74].

Однако если S1P способствует выживаемости и дифференцировке клеток-предшественников нейронов, то для зрелых нейронов показана роль S1P в индукции апоптоза в случае его накопления в клетке: апотоз протекает по зависимому от каспаз механизму и индуцируется церамидом и/или сфингозином, образованным путем дефосфорилирования S1P, при этом рецепторы S1P не вовлечены в процесс апоптоза [75]. При активации S1PR₂, связанных с ретикулонами Nogo-A, наблюдалось ингибирование роста нейритов и снижение синаптической пластичности [76]. Действие ретикулона Nogo-A осуществляется через присоединение к S1PR₂, причем через лиганд, отличный от лиганда, связывающего S1PR₂ с G-белками [76]. Другой ретикулон, Nogo-B, регулирует биосинтез сфингомиелинов, ингибируя фермент начального синтеза сфингозина [77].

Предполагают, что S1P вовлечен в нейроолигодендроцитарную сеть, поскольку он выполняет роль регулятора миграции клеток-предшественников олигодендроцитов [65], однако пока не накоплено достаточно данных и не ясны механизмы действия S1P и ферментов его метаболизма во взаимодействии нейронов и клеток глии.

Механизмы клеточного стресса, выступая исключительно важными для нормальной физиологии ЦНС, процессов старения и НДЗ, также связаны с метаболизмом S1P. В норме в зрелом организме S1P – цитопротекторный фактор. Например, он защищает кортикальные нейроны от токсического воздействия β-амилоидного пептида (Aβ) [43], что также может способствовать нейропластичности. S1P задерживает старение клеток, возможно, через присоединение к теломеразной обратной транскриптазе (hTERT), способствуя сохранению теломеразы [78]. SK-1 участвует в регуляции клеточного ответа на окислительный стресс, защищая клетки от апоптоза, вызванного активными формами кислорода [79]. На S1P, так же как

и на церамид, оказывает влияние стрессовый белок p53, а нарушение контроля АФК ведет к изменениям в S1P/церамидном сигнальном пути [80].

Исключительно важную роль в деятельности мозга играют процессы синаптической трансмиссии и, соответственно, синаптогенеза и синаптической пластичности. S1P, наряду с другими сфинголипидами, также участвует в модулировании нейротрансмиссии [81, 82], но может способствовать снижению пластичности синапсов [83]. S1P и SK-1 участвуют в регуляции высвобождения медиаторов и возбудимости мембраны [82]. Исследования на срезах гиппокампа показали участие S1P и SK-1 в формировании памяти [84]. Проведение сигнала от S1P через S1P₃, локализованный в пресинаптической мембране, стимулирует секрецию глутамата в нейронах гиппокампа, таким образом способствуя долговременной потенциации и участвуя в механизмах памяти [41, 84].

Предполагают, что S1P играет важную роль при физиологическом старении, способствуя увеличению продолжительности жизни [85]. Один из механизмов нормального старения – инсулин/инсулиноподобный сигналинг, связанный с PI3K/AKT, для которого исключительно важен баланс сфинголипидного реостата: в то время как церамид ингибирует PI3K/AKT-сигнальный путь [44], S1P оказывает стимулирующее действие на него [38]. И, если S1P-рецепторы могут модулировать активность Akt, то и наоборот, PI3K-Akt-сигнальный путь регулирует экспрессию и активность SK и рецепторов S1P [86]. Другой фактор старения – инактивация теломеразной активности – также связан с метаболизмом S1P, как уже отмечалось выше, причем у модельных мышей с дефицитом SK-2 обнаружена нестабильность активности теломеразы, что приводило к разрушению теломер и проявлению признаков раннего старения [78].

Очевидно, что метаболизм S1P играет значительную роль в нормальной деятельности ЦНС: он вовлечен в процессы клеточного роста, миграции, дифференциации нейронов и глии, а также их взаимодействия; синаптическую пластичность и, таким образом, в процессы памяти; в процессы нейропластичности, ремиелинизации, а также регуляцию физиологического старения. Функции S1P, экспрессия его рецепторов и их действие зависят от типа клеток ЦНС, стадии их развития и состояния всего организма (табл. 1) [57]. При нарушении метаболизма S1P, например, при его накоплении в клетках, S1P способен оказывать апоптотическое действие на нейроны, что, возможно, и происходит при НДЗ.

РОЛЬ S1P В ПАТОГЕНЕЗЕ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Ключевую роль в патогенезе НДЗ играет гибель специализированных нейронов, которая, в свою очередь, приводит к нарушению функций, в регуляции которых они участвуют: при болезни Альцгеймера наблюдается апоптоз холинергических нейронов гиппокампа и коры, сопровождающийся прогрессирующей потерей памяти, снижением способности к обучению и социальной дезадаптацией; характерная черта болезни Паркинсона – снижение количества дофаминергических нейронов нигростриатной системы мозга, что приводит к нарушению двигательной функции; при боковом амиотрофическом склерозе погибают двигательные нейроны спинного мозга и моторной коры и ствола головного мозга, следствием чего – атрофия мышц и паралич [87, 88].

Нейродегенеративные процессы ряда заболеваний, к которым принадлежат БА, БП и БАС, классифицируются как протеинопатии и имеют сходные молекулярные механизмы патогенеза: патологическую агрегацию белков, образование нерастворимых фибриллярных структур и их отложение в виде гистопатологических включений в тканях нервной системы [89]. При поддержании гомеостаза в норме нейроны избавляются от поврежденных и/или агрегировавших белков в процессе аутофагии; нарушение этого процесса служит причиной и/или способствует развитию патологических процессов при НДЗ [89].

Наряду с тем, что S1P – необходимый компонент нейрогенеза, проявляющий нейропротекторные свойства, многие исследователи отмечают двойственную роль S1P в гомеостазе ЦНС. Было показано, что метаболизм S1P вовлечен во множество клеточных процессов, ведущих к нейродегенерации, в том числе в апоптотическую гибель нейронов и аутофагию, стресс эндоплазматического ретикулума, нарушение регуляции белкового и липидного транспорта, секрецию экзосом, распространение нейротоксичных белков, нейровоспалительные процессы и дисфункции митохондрий [75]. При нейропатологиях S1P может выступать в качестве сигнальной молекулы, способствующей воспалительным процессам – вызывать астроглиоз [55, 81] и активацию клеток микроглии [61]. Участие S1P и SK в воспалении показано на культурах микроглиальных клеток, где SK-1, так же как и в астроглии, повышает экспрессию провоспалительных цитокинов [62], что в конечном итоге может приводить к апоптозу нейронов [63].

СФИНГОЗИН-1-ФОСФАТ И БОЛЕЗНЬ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Основная характеристика болезни Альцгеймера (БА) – накопление β -амилоидного пептида (А β), который в норме образуется при последовательном расщеплении предшественника А β (APP) ферментами β -секретазой (BACE1) и γ -секретазой; патологические нарушения фолдинга и протеолитического расщепления, а также последующая агрегация А β приводят к образованию внеклеточных сенильных бляшек. Кроме того, при БА в нейронах происходят изменения цитоскелета, которые связаны с гиперфосфорилированием и агрегацией τ -белка, ассоциированного с микротрубочками, с последующим образованием нейрофибриллярных клубков внутри клетки. Образование сенильных бляшек и агрегация белков приводит к разрушению нейритов, потере синапсов, а также сопровождается нейровоспалительными процессами, глиозом и снижением когнитивных способностей [10].

В патогенезе БА большую роль играют метаболиты сфинголипидного цикла, в том числе сфингоидные основания [4, 10]. Многочисленные наблюдения на клеточных культурах и животных моделях показали, что влияние сфингомиелина на процессинг А β осуществляется посредством изменения структуры липидных микродоменов (рафтов) [90]. Кроме того, на начальных стадиях заболевания наблюдаются повышенное содержание в клетках мозга церамида и активация нейтральной сфингомиелиназы [43, 44]. В настоящее время проводятся исследования по изменению метаболизма S1P при БА [41, 42, 44], однако их результаты бывают противоречивы.

В исследованиях Couttas et al. на постмортальном мозге было показано, что у больных БА содержание S1P снижается в зависимости от стадии заболевания, причем наиболее значимые изменения происходят в гиппокампе (зона С1), меньшие – в височных долях и мозжечке, при этом в гиппокампе наблюдалось снижение активности SK [41]. В аналогичном исследовании была обнаружена пониженная экспрессия ферментов SK-1 и S1P-лиазы, которая негативно коррелировала с отложениями А β [91]. Возможно, что с недостаточным содержанием S1P в мозге, особенно в гиппокампе, могут быть связаны дисфункции различных цитопротекторных процессов, включая нарушения в антиапоптотическом сигнальном пути PI3K-Akt при БА [92].

Одно из токсических проявлений А β на ранних стадиях развития БА – индуцирование им гиперфосфорилирования τ -белка, с которым, как показано, связан метаболизм S1P и его рецепторов. В мозге при БА отмечают повышенную активность SK-1 и, с другой стороны, недостаток S1P-лиазы, ассоциированные с гиперфосфори-

рованием τ -белка [93]. Кроме того, селективная активация S1PR₁ (но не S1PR₃) в клетках гиппокампа вызывает ингибирование AMPK (протеинкиназы, фосфорилирующей τ -белок по остатку Ser262), что приводит к значительному снижению фосфорилирования τ -белка [47]. Дефосфорилирование τ -белка, вызванное активацией и, возможно, интернализацией S1PR₁, может служить благоприятным фактором в первую очередь для нейронов гиппокампа, ослабляя процессы, приводящие к патологическим изменениям при БА [47].

Особый интерес исследователей вызывает взаимосвязь сфингомиелинового метаболизма и, в частности, S1P, с синтезом β -амилоидного пептида. Так, обнаружено влияние S1P на ферменты гидролиза белка-предшественника APP – BACE-1: было показано, что S1P способен присоединяться к BACE1 и модулировать его активность [94]. Снижение активности ферментов синтеза S1P (ингибирование SK нейронов мыши) и повышение активности ферментов его деградации привело к снижению активности BACE-1 и генерации А β [94]. С другой стороны, повышение уровня S1P, вызванного дефицитом S1P-лиазы, приводило к накоплению APP и C-концевого фрагмента APP в лизосомальных компартментах, а также к снижению активности γ -секретазы [95]. В модели клеток, нокаутных по S1P-лиазе, наблюдалось накопление APP и его C-концевых фрагментов [95]. Кроме того, было показано, что действие S1P может осуществляться путем, аналогичным нейротоксическому пути β -амилоидного пептида, включающего кальпаин/каспаза-12/кальциевый механизм [93]. Эти данные указывают не только на корреляцию между уровнем S1P и А β , но и на существенную регуляторную роль S1P в генерации А β в нейронах; соответственно, дисфункция метаболизма S1P приводит к развитию нейрогенерации.

Известно, что в норме в мозге с возрастом меняется соотношение S1P/сфингозин, которое может модулировать процессы накопления А β и гиперфосфорилирования τ -белка, что в совокупности с нарушениями процессов аутофагии приводит к гибели нейронов и в конечном итоге – к снижению когнитивных способностей [96]. Способность S1P влиять на генерацию и токсичность А β и фосфорилирование τ -белка указывает на участие S1P в образовании нейрофибриллярных клубков, в изменениях цитоскелета и других патологических процессах, что особенно важно при БА. Снижение содержания S1P при развитии БА, особенно в гиппокампе, на фоне общего изменения сфингомиелинового метаболизма в ЦНС при БА [4], может быть причиной снижения синаптической пластичности, потери синапсов и нейри-

тов, что может способствовать ухудшению памяти и когнитивных способностей при БА.

S1P И БОЛЕЗНЬ ПАРКИНСОНА

Болезнь Паркинсона (БП) – одно из наиболее часто встречающихся двигательных заболеваний, занимающее второе место по частоте встречаемости среди НДЗ после болезни Альцгеймера. Для патогенеза БП характерна прогрессирующая дегенерация дофаминергических нейронов nigrostriатной системы, приводящая к нарушению двигательной функции [3]. Одним из основных морфологических признаков БП считается формирование внутри клеток нейротоксических телец Леви, состоящих большей частью из пресинаптического белка α -синуклеина и убиквитина. До проявления моторной дисфункции существует длительный скрытый период, во время которого происходит нейродегенерация периферийных и некоторых центральных нейронов, вследствие которой, в частности, наблюдается снижение чувствительности обоняния, однако механизмы нейродегенерации при БП остаются неизвестными [3].

Для изучения БП была разработана модель, в которой, как на клеточных линиях, так и на животных, используют вещество 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП). В глиальных клетках МФТП превращается в нейротоксин 1-метил-4-фенилпиридин (МФП⁺), который избирательно действует на дофаминергические нейроны, вызывая их гибель. На такой же модели проводятся исследования участия сфинголипидов в развитии патологии БП, большей частью они направлены на изучение нейротоксичности церамида и его роли в процессах апоптоза дофаминергических нейронов [97].

Немногочисленные исследования роли S1P при БП продемонстрировали, что существует прямая взаимосвязь между метаболизмом S1P и патологическими процессами при БП. Как на культурах нейронов, так и на моделях БП на животных было показано, что действие нейротоксина MPP⁺ снижает активность и экспрессию генов SK-1 и SK-2 [98], в том числе отмечено специфическое снижение уровня SK-1 в *substantia nigra* у МФП⁺-мышей [99]. Этот токсин может снижать экспрессию S1PR₁, что может приводить к снижению выживаемости клеток и/или способствовать апоптотической гибели нейронов [100].

Ферменты метаболизма S1P выполняют цитопротекторные функции в нейронах при БП. Показано, что SK ингибируют секрецию α -синуклеина, а также играют значительную роль в молекулярных механизмах защиты нейронов от окислительного стресса, вызванного нейротоксином MPP⁺, и, наоборот, ингибирование SK-1 и

SK-2 индуцирует сигнал гибели клеток посредством секреции α -синуклеина [101].

При моделировании БП подтверждаются свойства S1P, способствующие выживанию клеток, в том числе при участии PI3K/Akt-пути: при ингибировании синтеза S1P снижается фосфорилирование и активность PI3K/Akt [101]. Ингибирование SK в MPP⁺-модели БП вызывает снижение экспрессии генов некоторых митохондриальных белков и факторов транскрипции, например, ядерного дыхательного фактора 1 (Nuclear respiratory factor 1 (NRF-1)) и митохондриального транскрипционного фактора A (Mitochondrial transcription factor A (TFAM)) [99]. Ингибирование SK также приводит к снижению экспрессии генов белков регуляции дыхательной цепи, в том числе супероксиддисмутазы 2, и при этом наблюдается значительное повышение уровня активных форм кислорода [99]. С функциями митохондрий связан также выход в цитозоль цитохрома c, причем при ингибировании SK наблюдался пониженный уровень цитохрома c [101]. И, кроме того, при ингибировании SK снижается содержание общего клеточного АТФ [99]. Таким образом, ингибирование SK при моделировании БП влияет на дыхательные и энергетические функции митохондрий, повышает уровень окислительного стресса и способствует апоптозу.

Предполагают, что S1P вовлечен в регуляцию механизмов апоптоза дофаминергических нейронов. При воздействии на клетки токсином MPP⁺ или при ингибировании SK происходило значительное усиление экспрессии проапоптотических белков Bax и Hrk, а в результате добавления в среду S1P повышалась выживаемость клеток [101]. Кроме того, добавление в культуральную среду S1P приводило к увеличению экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 и выживаемости клеток в условиях окислительного стресса, вызванного церамидом [42].

Возможное сходство в нарушении баланса сфингомиелинового метаболизма при БА и БП не ограничивается прямой регуляцией апоптотического сигнала. Например, было показано, что продукты деградации S1P модулируют аутофагально-лизосомальный путь деградации как $A\beta$, так и α -синуклеина [102]. Введение ингибитора рецепторов S1P оказывало защитный эффект против нейродегенерации и нарушений поведения в модели БП на животных через действие S1PR₁ и, возможно, Akt [103, 104]. В свою очередь, секретлируемый α -синуклеин может ингибировать сигнал S1PR₁ и изменять его положение в липидном рафте [105].

Факты влияния SK на секрецию α -синуклеина, синаптическую передачу и аутофагию служат доказательством того, что баланс S1P, поддерживаемый SK, может оказывать влияние не только

на гибель или выживаемость клеток ЦНС при БП, но и на центральные механизмы патогенеза этого заболевания.

S1P И БОКОВОЙ АМИОТРОФИЧЕСКИЙ СКЛЕРОЗ

Боковой амиотрофический склероз (БАС) – нейродегенеративное заболевание, характеризующееся дегенерацией двигательных нейронов спинного мозга, моторной коры и ствола головного мозга. Основные симптомы БАС проявляются в мышечном истощении, нарушении речи и глотания, фасцикуляции, изменении рефлексов и спастичности мышц. При БАС ярко выражены нарушения метаболизма липидов и, что особенно важно, выявляется регуляторная роль липидов в качестве вторичных мессенджеров. Например, при развитии воспалительных процессов при БАС повышается содержание цитокинов, в регуляции процессов синтеза которых активное участие принимают мессенджеры липидной природы [106]. Показано, что при БАС происходят изменения в содержании сфинголипидных метаболитов, что может быть проявлением БАС и оказывать влияние на скорость развития заболевания. Так, при анализе спинного мозга пациентов БАС и в модели на животных было обнаружено повышенное содержание церамида, сфингомиелина, цереброзидов (галакто-, глюко- и лактозилцерамидов) и ганглиозидов (GM3, GM1), а также снижение активности ферментов их деградации [106]. Предполагается, что церамиды и некоторые виды галактоцерамидов могут служить цитотоксичными агентами, накопление которых провоцирует развитие заболевания.

В наиболее распространенных моделях БАС на животных – у SOD-мутантных мышей – проявляются изменения в экспрессии генов белков, связанных с регуляцией иммунитета и/или экзосомальной секреции. Важно, что обнаруженное изменение экспрессии ключевого фермента метаболизма S1P – SK (причем и SK-1, и SK-2), а также уровень содержания некоторых молекулярных видов церамидов и сфингозина коррелирует со степенью тяжести заболевания [107]. В исследованиях Гутнер с соавт. (2019 г.) [108] с использованием модели БАС на FUS-трансгенной линии мышей было показано, что на терминальной стадии развития заболевания в спинном мозге происходят значительные изменения в экспрессии генов метаболизма S1P – повышение экспрессии S1P-лиазы и снижение экспрессии S1P-фосфатазы. При этом наблюдается увеличение содержания сфингозина, сфинганина и S1P, соответственно, снижается соотношение S1P к сфингозину и сфинганину, что может быть проявлением интенсивного развития апоптоза в клетках спинного мозга.

Можно предположить, что S1P способствует выживаемости нейронов и активации глии при БАС, а нарушения его метаболизма приводят к усилению нейродегенеративных процессов. Однако изучение роли S1P, как и других метаболитов сфингомиелинового обмена при БАС, находится в начальной стадии, поэтому требуются дальнейшие исследования в этой области.

МЕТАБОЛИЗМ S1P КАК МИШЕНЬ ДЛЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Безусловно, участие сигнальной системы S1P и его метаболитов в функционировании нервной системы не ограничивается НДЗ: роль S1P, его рецепторов и ферментов широко изучается при онкологических (глиомы [15]), демиелинизирующих (рассеянный склероз [37, 57, 58]), сосудистых (ишемия головного мозга [109]) и многих других заболеваниях центральной и периферической нервной системы. Так, характерная дисрегуляция метаболизма S1P проявляется при глиомах: сфингомиелиновый реостат сдвинут в сторону S1P, повышено содержание S1P, что способствует выживаемости, росту и делению клеток; в опухолевых тканях повышена активность SK-1, рецепторы S1P задействованы в миграции, пролиферации и повышенной инвазивности опухолевых клеток [15]. Тогда как при рассеянном склерозе наблюдаются пониженное содержание S1P в белом веществе мозга, повышенная экспрессия S1PR1 и S1PR3 астроцитами, повышенное содержание S1P в спинномозговой жидкости [37].

В настоящее время метаболиты сигнального пути S1P/S1PR рассматриваются в качестве мишеней при терапии различных заболеваний, в том числе НДЗ [13]. Среди лекарственных препаратов, уже применяющихся в клинической практике или проходящих испытания II стадии, находятся агонисты рецепторов S1P, такие как финголимод, сипонимод, понесимод; ингибиторы ферментов SK-1 (сафингол), SK-2 (опаганиб) и S1P-лиазы (LX3305) [15]. Эти препараты используются при лечении рассеянного склероза, опухолевых и воспалительных заболеваний [15], а также широко применяются в научных исследованиях для моделирования процессов метаболизма S1P [57, 58].

Первым препаратом этого ряда стал финголимод – молекулярный аналог сфингозина. При попадании в организм финголимод фосфорилируется при помощи SK-2 [110]. Активный метаболит финголимодфосфат, выступающий структурным аналогом S1P, способен присоединяться к рецепторам S1P (за исключением S1PR2) [57, 58]. Использование финголимода при лечении рассеянного склероза дало импульс к началу исследований возможного применения этого препарата при НДЗ, однако на данный момент полученные

данные противоречивы. Например, при БП финголимод оказывал защитное действие как на культурах клеток кортикальных нейронов [74], так и на оксидоаминовой (6-OHDA) модели животных [103], но при этом препарат не проявлял ожидаемого защитного эффекта в МФТП-модели БП [111]. Предполагают, что финголимод может оказывать положительное воздействие на немоторные симптомы БП [111]. На моделях БАС на трансгенных мышах было показано, что ингибирование S1PR финголимодом повышает неврологические показатели и выживаемость животных [112]. В настоящее время финголимод проходит клинические испытания фазы II для лечения БАС [113]. Осуществляются попытки применения финголимодов при аутоиммунных заболеваниях мозга, например, при хронической воспалительной демиелинизирующей полирадикулоневропатии [114].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нейродегенеративные заболевания, к которым относятся болезни Альцгеймера, Паркинсона и боковой амиотрофической склероз, — наиболее распространенная форма патологий ЦНС, связанных с возрастными изменениями. Множество клеточных процессов, характерных для НДЗ (в том числе повреждение клеточной мембраны, нарушение синаптической передачи и пластичности синапсов, аутофагии, апоптоза), связано с изменениями сфинголипидного метаболизма. Метаболиты сфинголипидов, в том числе сфингоидные основания, участвуют в регуляции этих процессов, выступая источником вторичных мессенджеров.

S1P — вторичный мессенджер, существенно отличающийся по своим функциям от своих метаболических предшественников: если церамиды и сфингозин играют роль проапоптотических агентов и индуцируют гибель клеток, то S1P — фактор, способствующий выживаемости клетки. Важно подчеркнуть, что S1P — уникальный компонент клеточной регуляции, который, в отличие от других сфингомиелиновых метаболитов, действует не только локально внутри клетки, но и внеклеточно, при участии S1PR, с которыми связано действие S1P на пролиферацию клеток и подавление апоптоза, способствующие выживанию клеток ЦНС. Существует тонкий баланс между влиянием S1P и его рецепторов на взаимодействие глиальных и нервных клеток на разных этапах развития организма, а также в норме и при патологических состояниях, однако очевидно, что в настоящее время этих сведений недостаточно для понимания функций S1P в развитии НДЗ.

Цитопротекторные свойства S1P определяют его возможное участие в следующих процессах: 1) в механизмах, обеспечивающих нейропластич-

ность мозга, которые включают предотвращение гибели нейронов [115]; 2) в стимуляции репаративных процессов, в том числе благодаря повышенной секреции ростовых (нейротрофических) факторов, поскольку S1P участвует в проведении их сигнала, способствующих развитию неповрежденных аксонов и тем самым увеличению числа синаптических контактов [116]; 3) в активации эндогенной антиоксидантной системы, предотвращающей гибель нейронов от оксидативного стресса; 4) в процессах аутофагии [117]. В дальнейшем необходимо исследовать содержание S1P в мозге на ранних стадиях НДЗ для выявления его участия в механизмах нейропластичности и возможности использования S1P в качестве потенциального маркера НДЗ.

Однако выявлена двойственная роль S1P в нервной системе: с одной стороны, S1P служит нейропротектором, защищая клетки от действия токсических факторов, таких как церамид, β -амилоид или α -синуклеин; с другой стороны, метаболизм S1P вовлечен во множество клеточных процессов, ведущих к нейродегенерации: стресс эндоплазматического ретикулума, аутофагию, нарушение регуляции белкового и липидного транспорта, секрецию экзосом, распространение нейротоксичных белков, нейровоспалительные процессы и дисфункцию митохондрий, в некоторых случаях индукцию апоптоза нейронов [96]. Подобное действие может осуществляться посредством нарушения метаболизма S1P, например, ингибированием ферментов его синтеза и деградации и/или накопления S1P в клетке, или через активацию S1PR₂. Яркий пример тому — нарушение поведенческих, физиологических, морфологических и молекулярных отклонений при ингибировании S1P-лиазы и, соответственно, накоплении S1P [81].

Особый интерес представляет исследование изменений содержания сфинголипидов и особенно S1P в плазме крови при лечении пациентов с НДЗ препаратами, влияющими на липидный метаболизм мозга. Такой препарат — финголимод, продемонстрировавший положительное действие как на биохимические, так и на когнитивные показатели.

Кроме того, в настоящее время в качестве лекарственных мишеней для лечения различных заболеваний апробируются SK и рецепторы S1P [15, 23]. Возможно, что рецепторы S1P и/или ферменты его метаболизма будут рассматриваться в качестве мишени для целевой терапии (например, в случае онкологических заболеваний мозга [118]). Развитие новых аналитических масс-спектрометрических технологий способствует расширению возможностей идентификации и количественного анализа S1P в разных объектах (тканях мозга, плазме крови), что позволяет ис-

следовать его в комплексе с другими липидами и рассматривать в качестве потенциального маркера различных заболеваний [119].

Таким образом, S1P и опосредуемые им сигнальные пути – потенциальные мишени при лечении НДЗ. Исследования метаболизма S1P могут предложить новые подходы в понимании механизмов этих заболеваний, а также новые методы диагностики и стратегии для их лечения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность проф. А.В. Алесенко за консультации, полученные при написании данной статьи.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ješko H., Lenkiewicz A.M.A.A. // J. Expert Opin. Ther. Patents. 2016. V. 27. P. 427–438. <https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1261112>
2. Гаврилова С.И., Алесенко А.В., Колыхалов И.В., Федорова Я.Б., Селезнева Н.Д., Пономарева Е.В., Гурьянова С.В., Гутнер У.А., Шупик М.А. // Психиатрия. 2017. Т. 73. С. 5–15.
3. Нигматуллина Р.Р., Залылова З.А., Кудрин В.С., Пронина Т.С., Георгиева С.Г., Воробьева Н.Е., Сошникова Н.В., Краснов А.Н., Кузьмина О.И., Угрюмов М.В. Оценка периферических проявлений болезни Паркинсона – новый подход к созданию доклинической диагностики // Нейродегенеративные заболевания от генома до целостного организма. М.: Научный мир, 2014. С. 203–232.
4. Grassi S., Giussani P., Mauri L., Prioni S., Sonnino S., Prinetti A. // J. Lipid. Res. 2020. V. 61. P. 636–654. <https://doi.org/10.1194/jlr.TR119000427>
5. Shamim A., Mahmood T., Ahsan F., Kumar A., Bagga P. // Clin. Nutr. Exp. 2018. V. 20. P. 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.yclnex.2018.05.001>
6. Alessenko A.V., Albi E. // Front. Neurol. 2020. V. 21. P. 437. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00437>
7. Hannun Y.A., Obeid L.M. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2018. V. 19. P. 175–191. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.107>
8. Merrill A.H. // Chem. Rev. 2011. V. 111. P. 6387–6422. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.107>
9. Iqbal J., Walsh M.T., Hammad S.M., Hussain M.M. // Trends Endocrinol. Metab. 2017. V. 28. P. 506–518. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.03.005>
10. Алесенко А.В., Гаврилова С.И. Потенциальная роль сфинголипидов в качестве биомаркеров болезни Альцгеймера // Нейродегенеративные заболевания от генома до целостного организма. М.: Научный мир, 2014. С. 298–320.
11. Pruett S.T., Bushnev A., Hagedorn K., Adiga M., Haynes C.A., Sullards M.C., Liotta D.C., Merrill A.H. // J. Lip. Res. 2008. V. 49. P. 1621–1639. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800012-JLR200>
12. Czubowicz K., Ješko H., Wencel P., Lukiw W.J., Strosznajder R.P. // Mol. Neurobiol. 2019. V. 56. P. 5436–5455. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1448-3>
13. Pyne S., Adams D.R., Pyne N.J. // In: Lipid Signaling in Human Diseases. Handbook of Experimental Pharmacology / Eds. Gomez-Cambronero J., Frohman M. Springer, Cham, 2020. V. 259. P. 49–76. https://doi.org/10.1007/164_2018_96
14. Алесенко А.В., Гаврилова, С.И., Гутнер У.А., Лебедева А.О., Шупик М.А., Колыхалов И.В., Пономарева Е.В., Селезнева Н.Д., Федорова Я.Б. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2017. Т. 6. С. 21–27. <https://doi.org/10.17116/jnevro20171176121-27>
15. Hawkins C.C., Ali T., Ramanadham S., Hjelmeland A.B. // Biomolecules. 2020. V. 23. P. 1357. <https://doi.org/10.3390/biom10101357>
16. Aoki M., Aoki H., Ramanathan R., Hait N.C., Takabe K. // Mediators Inflamm. 2016. V. 2016. P. 1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/8606878>
17. Ouyang J., Shu Z., Chen S., Xiang H., Lu H. // J. Cell. Mol. Med. 2020. V. 24. P. 10290–10301. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15744>
18. Rohrbach T., Maceyka M., Spiegel S. // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2017. V. 52. P. 543–553. <https://doi.org/10.1080/10409238.2017.1337706>
19. Kurano M., Yatomi Y. // J. Atheroscler. Thromb. 2018. V. 25. P. 16–26. <https://doi.org/10.5551/jat.RV17010>
20. Wang P., Yuan Y., Lin W., Zhong H., Xu K., Qi X. // Cancer Cell Int. 2019. V. 19. P. 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-1014-8>
21. Książek M., Chacirńska M., Chabowski A., Baranowski M. // J. Lip. Res. 2015. V. 56. P. 1271–1281. <https://doi.org/10.1194/jlr.R059543>
22. Wattenberg B.W. // World J. Biol. Chem. 2010. V. 1. P. 362–368. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v1.i12.362>
23. Adams D.R., Pyne S., Pyne N.J. // Cell Signal. 2020. V. 76. P. 109806. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109806>
24. Wattenberg B.W., Pitson S.M., Raben D.M. // J. Lip. Res. 2006. V. 47. P. 1128–1139. <https://doi.org/10.1194/jlr.R600003-JLR200>
25. Pitson S.M., D'Andrea R.J., Vandeleur L., Moretti P.A.B., Xia P., Gamble J.R., Vadas M.A., Wattenberg B. // Biochem. J. 2000. V. 350. P. 429–441. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3500429>

26. Siow D., Wattenberg B. // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2011. V. 46. P. 365–375.
<https://doi.org/10.3109/10409238.2011.580097>
27. Harikumar K.B., Yester J.W., Surace M.J., Oyeniran C., Price M.M., Huang W.C., Hait N.C., Allegood J.C., Yamada A., Kong X., Lazear H.M., Bhardwaj R., Takabe K., Diamond M.S., Luo C., Milstien S., Spiegel S., Kordula T. // *Nat. Immunol.* 2014. V. 15. P. 231–238.
<https://doi.org/10.1038/ni.2810>
28. Taniguchi M., Kitatani K., Kondo T., Hashimoto-Nishimura M., Asano S., Hayashi A., Mitsutake S., Igarashi Y., Umehara H., Takeya H., Kigawa J., Okazaki T. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. P. 39898–39910.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.416552>
29. Liu H., Toman R.E., Goparaju S.K., Maceyka M., Nava V.E., Sankala H., Payner S.G., Bektas M., Ishii I., Chun J., Milstien S., Spiegel S. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 40330–40336.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M304455200>
30. Mattie M., Brooker G., Spiegel S. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 3181–3188.
31. Hait N.C., Allegood J., Maceyka M., Strub G.M., Harikumar K.B., Singh S.K., Luo C., Marmorstein R., Kordula T., Milstien S., Spiegel S. // *Science.* 2009. V. 325. P. 1254–1257.
<https://doi.org/10.1126/science.1176709>
32. Xia P., Wang L., Moretti P.A.B., Albanese N., Chai F., Pitson S.M., D'Andrea R.J., Gamble J.R., Vadas M.A. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 7996–8003.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111423200>
33. Strub G.M., Paillard M., Liang J., Gomez L., Allegood J.C., Hait N.C., Maceyka M., Price M.M., Chen Q., Simpson D.C., Kordula T., Milstien S., Lesnfsky E.J., Spiegel S. // *FASEB J.* 2011. V. 25. P. 600–612.
<https://doi.org/10.1096/fj.10-167502>
34. Hannun Y.A., Obeid L.M. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008. V. 9. P. 139–150.
<https://doi.org/10.1038/nrm2329>
35. Moruno Manchon J.F., Uzor N.E., Dabaghian Y., Furr-Stimming E.E., Finkbeiner S., Tsvetkov A.S. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 15213.
<https://doi.org/10.1038/srep15213>
36. O'Sullivan S., Dev K.K. // *Neuropharm.* 2017. V. 2017. P. 597–607.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.11.006>
37. Chun J., Giovannoni G., Hunter S.F. // *Drugs.* 2021. V. 81. P. 207–231.
<https://doi.org/10.1007/s40265-020-01431-8>
38. Hla T., Lee M.J., Ancellin N., Paik J.H., Kluk M.J. // *Science.* 2001. V. 294. P. 1875–1878.
<https://doi.org/10.1126/science.1065323>
39. Lewis N.D., Haxhinasto S.A., Anderson S.M., Stefanopoulos D.E., Fogal S.E., Adusumalli P., Desai S.N., Patnaude L.A., Lukas S.M., Ryan K.R., Slavin A.J., Brown M.L., Modis L.K. // *J. Immunol.* 2013. V. 190. P. 3533–3540.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201810>
40. Zhang W., An J., Jawadi H., Siow D.L., Lee J.F., Zhao J., Gartung A., Maddipati K.R., Honn K.V., Wattenberg B.W., Lee M.J. // *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2013. V. 106. P. 62–71.
<https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2013.06.001>
41. Couttas T.A., Kain N., Daniels B., Lim X.Y., Shepherd C., Kril J., Pickford R., Li H., Garner B., Don A.S. // *Acta Neuropathol. Commun.* 2014. V. 2. P. 9.
<https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-9>
42. Czubowicz K., Cieslik M., Pyszko J., Strosznajder J.B., Strosznajder R.P. // *Mol. Neurobiol.* 2015. V. 51. P. 1300–1308.
<https://doi.org/10.1007/s12035-018-1448-3>
43. Malaplate-Armand C., Florent-Bécharde S., Youssef I., Koziel V., Sponne I., Kriem B., Leininger-Muller B., Olivier J.L., Oster T., Pillot T. // *Neurobiol. Dis.* 2006. V. 23. P. 178–189.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.02.010>
44. Czubowicz K., Strosznajder R. // *Mol. Neurobiol.* 2014. V. 50. P. 26–37.
<https://doi.org/10.1007/s12035-013-8606-4>
45. Van Brocklyn J.R., Williams J.B. // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2012. V. 163. P. 26–36.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2012.05.006>
46. Pitson S.M., Moretti P.A.B., Zebol J.R., Lynn H.E., Xia P., Vadas M.A., Wattenberg B.W. // *EMBO J.* 2003. V. 22. P. 5491–5500.
<https://doi.org/10.1093/emboj/cdg540>
47. Giguere F.S.C., Essis S.A., Chagniel L., Germain M., Cyr M., Massicotte G. // *Brain Res.* 2017. V. 1658. P. 51–59.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.01.014>
48. Safarian F., Khallaghi B., Ahmadiani A., Dargahi L. // *J. Mol. Neurosci.* 2015. V. 56. P. 177–187.
<https://doi.org/10.1007/s12031-014-0478-1>
49. Hsu C.K., Lee I.T., Lin C.C., Hsiao L.D., Yang C.M. // *J. Cell. Physiol.* 2015. V. 230. P. 702–715.
<https://doi.org/10.1002/jcp.24795>
50. Alvarez S.E., Harikumar K.B., Hait N.C., Allegood J., Strub G.M., Kim E.Y., Maceyka M., Jiang H., Luo C., Kordula T., Milstien S., Spiegel S. // *Nature.* 2010. V. 465. P. 1084–1088.
<https://doi.org/10.1038/nature09128>
51. Okamoto H., Takuwa N., Yokomizo T., Sugimoto N., Sakurada S., Shigematsu H., Takuwa Y. // *Mol. Cell. Biol.* 2000. V. 20. P. 9247–9261.
<https://doi.org/10.1128/mcb.20.24.9247-9261.2000>
52. Jaillard C., Harrison S., Stankoff B., Aigrot M.S., Calver A.R., Duddy G., Walsh F.S., Pangalos M.N., Arimura N., Kaibuchi K., Zalc B., Lubetzki C. // *J. Neurosci.* 2005. V. 25. P. 1459–1469.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4645-04.2005>
53. Olsen A.S.B., Færgeman N.J. // *Open Biol.* 2017. V. 7. P. 170069.
<https://doi.org/10.1098/rsob.170069>
54. Paugh B.S., Bryan L., Paugh S.W., Wilczynska K.M., Alvarez S.M., Singh S., Kapitonov D., Rokita H., Wright S., Griswold-Prenner I., Milstien S., Spiegel S., Kordula T. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 3408–3417.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M807170200>
55. Sorensen S.D., Nicole O., Peavy R.D., Montoya L.M., Lee C.J., Murphy T.J., Traynelis S.F., Hepler J.R. // *Mol. Pharmacol.* 2003. V. 64. P. 1199–1209.
<https://doi.org/10.1124/mol.64.5.1199>
56. Wu Y.P., Mizugishi K., Bektas M., Sandhoff R., Proia R.L. // *Hum. Mol. Genet.* 2008. V. 17. P. 2257–2264.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddn126>

57. Groves A., Kihara Y., Chun J. // *J. Neurol. Sci.* 2013. V. 328. P. 9–18.
<https://doi.org/10.1016/j.jns.2013.02.011>
58. Choi J.W., Gardell S.E., Herr D.R., Rivera R., Lee C.W., Noguchi K., Teo S.T., Yung Y.C., Lu M., Kennedy G., Chun J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 751–756.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1014154108>
59. Fischer I., Alliod C., Martinier N., Newcombe J., Brana C., Pouly S. // *PLoS One.* 2011. V. 6. P. e23905.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023905>
60. Gao Z., Tsirka S.E. // *Neurol. Res. Int.* 2011. V. 2011. P. 383087.
<https://doi.org/10.1155/2011/383087>
61. Tham C.S., Lin F.F., Rao T.S., Yu N., Webb M. // *Int. J. Dev. Neurosci.* 2003. V. 21. P. 431–443.
<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2003.09.003>
62. Nayak D., Huo Y., Kwang W.X.T., Pushparaj P.N., Kumar S.D., Ling E.A., Dheen S.T. // *Neuroscience.* 2010. V. 166. P. 132–144.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.12.020>
63. Lv M., Zhang D., Dai D., Zhang W., Zhang L. // *Inflamm. Res.* 2016. V. 65. P. 551–562.
<https://doi.org/10.1007/s00011-016-0939-9>
64. Jung C.G., Kim H.J., Miron V.E., Cook S., Kennedy T.E., Foster C.A., Antel J.P., Soliven B. // *Glia.* 2007. V. 55. P. 1656–1667.
<https://doi.org/10.1002/glia.20576>
65. Novgorodov A.S., El-Alwani M., Bielawski J., Obeid L.M., Gudz T.I. // *FASEB J.* 2007. V. 21. P. 1503–1514.
<https://doi.org/10.1096/fj.06-7420com>
66. Qin J., Berdyshev E., Goya J., Natarajan V., Dawson G. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 14134–14143.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.076810>
67. Xu D., Liu Z., Wang S., Peng Y., Sun X. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017. V. 490. P. 670–675.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.06.099>
68. Mizugishi K., Yamashita T., Olivera A., Miller G.F., Spiegel S., Proia R.L. // *Mol. Cell. Biol.* 2005. V. 25. P. 11113–11121.
<https://doi.org/10.1128/mcb.25.24.11113-11121.2005>
69. Kajimoto T., Okada T., Yu H., Goparaju S.K., Jahan-geer S., Nakamura S.-I. // *Mol. Cell. Biol.* 2007. V. 27. P. 3429–3440.
<https://doi.org/10.1128/mcb.01465-06>
70. Kono M., Belyantseva I.A., Skoura A., Frolenkov G.I., Starost M.F., Dreier J.L., Lidington D., Bolz S.S., Friedman T.B., Hla T., Proia R.L. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 10690–10696.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M700370200>
71. Callihan P., Alqinyah M., Hooks S.B. // *Methods Mol. Biol.* 2018. V. 1697. P. 141–151.
https://doi.org/10.1007/7651_2017_3
72. Quarta S., Camprubí-Robles M., Schweigreiter R., Matúsica D., Haberberger R.V., Proia R.L., Bandtlow C.E., Ferrer-Montiel A., Kress M. // *Front. Mol. Neurosci.* 2017. V. 10. P. 317.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00317>
73. Zhang Y.H., Vasko M.R., Nicol G.D. // *J. Physiol.* 2006. V. 575. P. 101–113.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.111575>
74. Di Menna L., Molinaro G., Di Nuzzo L., Riozzi B., Zappulla C., Pozzilli C., Turrini R., Caraci F., Copani A., Battaglia G., Nicoletti F., Bruno V. // *Pharmacol. Res.* 2013. V. 67. P. 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.004>
75. Hagen N., Van Veldhoven P.P., Proia R.L., Park H., Merrill A.H., Van Echten-Deckert G. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 11346–11353.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M807336200>
76. Kempf A., Tews B., Arzt M.E., Weinmann O., Obermair F.J., Pernet V., Zagrebelsky M., Delekate A., Iobbi C., Zemmara A., Ristic Z., Gullo M., Spies P., Dodd D.M., Gygax D., Korte M., Schwab M.E. // *PLoS Biol.* 2014. V. 12. P. e1001763.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001763>
77. Cantalupo A., Zhang Y., Kothiya M., Galvani S., Obinata H., Bucci M., Giordano F.J., Jiang X.C., Hla T., Di Lorenzo A. // *Nat. Med.* 2015. V. 21. P. 1028–1037.
<https://doi.org/10.1038/nm.3934>
78. Selvam S.P., Roth B.M., Nganga R., Kim J., Cooley M.A., Helke K., Smith C.D., Ogretmen B. // *J. Biol. Chem.* 2018. V. 293. P. 9784–9800.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003506>
79. Huwiler A., Kotelevets N., Xin C., Pastukhov O., Pfeilschifter J., Zangemeister-Wittke U. // *Br. J. Pharmacol.* 2011. V. 162. P. 532–543.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01053.x>
80. Van Brocklyn J.R., Lee M.J., Menzeleev R., Olivera A., Edsall L., Cuvillier O., Thomas D.M., Coopman P.J.P., Thangada S., Liu C.H., Hla T., Spiegel S. // *J. Cell Biol.* 1998. V. 142. P. 229–240.
<https://doi.org/10.1083/jcb.142.1.229>
81. Mitroi D.N., Deutschmann A.U., Raucamp M., Karunakaran I., Glebov K., Hans M., Walter J., Saba J., Gräler M., Ehninger D., Sopova E., Shupliakov O., Swandulla D., Van Echten-Deckert G. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 37064.
<https://doi.org/10.1038/srep37064>
82. Soliven B., Miron V., Chun J. // *Neurol.* 2011. V. 76. P. 9–14.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31820d9507>
83. Seyedsadr M.S., Weinmann O., Amorim A., Ineichen B.V., Egger M., Mirnajafi-Zadeh J., Becher B., Javan M., Schwab M.E. // *Neurobiol. Dis.* 2019. V. 124. P. 189–201.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.11.018>
84. Kanno T., Nishizaki T., Proia R.L., Kajimoto T., Jahan-geer S., Okada T., Nakamura S. // *Neuroscience.* 2010. V. 171. P. 973–980.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.10.021>
85. Jové M., Naudí A., Gambini J., Borrás C., Cabré R., Portero-Otín M., Viña J., Pamplona R. // *J. Gerontol.* 2017. V. 72. P. 30–37.
<https://doi.org/10.1093/gerona/glw048>
86. Marfe G., Di Stefano C., Gambacurta A., Ottone T., Martini V., Abruzzese E., Mologni L., Sinibaldi-Salimei P., de Fabritis P., Gambacorti-Passerini C., Amadori S., Birge R.B. // *Exp. Hematol.* 2011. V. 39. P. 653–665.
<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2011.02.013>
87. Угрюмов М.В. Трансляционная, персонализированная и профилактическая медицина как основа для борьбы с нейродегенеративными заболеваниями // *Нейродегенеративные заболевания от ге-*

- нома до целостного организма. М.: Научный мир, 2014. С. 22–44.
88. *Gutner U.A., Shupik M.A., Maloshitskaya O.A., Sokolov S.A., Rezvykh A.P., Funikov A.Yu., Lebedev A.T., Ustyugov A.A., Alessenko A.V.* // *Biochem.* 2019. V. 84. P. 1166–1176. <https://doi.org/10.1134/S0006297919100055>
89. *Шелковникова Т.А., Куликова А.А., Цветков Ф.О., Петерс О., Бачурин С.О., Бухман В.Л., Нинкина Н.Н.* // *Мол. биология.* 2012. Т. 46. С. 402–415.
90. *Grimm M.O.W., Michaelson D.M., Hartmann T.* // *J. Lipid Res.* 2017. V. 58. P. 2083–2101. <https://doi.org/10.1194/jlr.R076331>
91. *Ceccom J., Loukh N., Lauwers-Cances V., Touriol C., Nicaise Y., Gentil C., Uro-Coste E., Pitson S., Maurage C.A., Duyckaerts C., Cuvillier O., Delisle M.B.* // *Acta Neuropathol. Commun.* 2014. V. 2. P. 12. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-12>
92. *Moloney A.M., Griffin R.J., Timmons S., O'Connor R., Ravid R., O'Neill C.* // *Neurobiol. Aging.* 2010. V. 31. P. 224–243. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.04.002>
93. *Hagen N., Hans M., Hartmann D., Swandulla D., Van Echten-Deckert G.* // *Cell Death Differ.* 2011. V. 18. P. 1356–1365. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.7>
94. *Takasugi N., Sasaki T., Suzuki K., Osawa S., Isshiki H., Hori Y., Shimada N., Higo T., Yokoshima S., Fukuyama T., Lee V.M.Y., Trojanowski J.Q., Tomita T., Iwatsubo T.* // *J. Neurosci.* 2011. V. 31. P. 6850–6857. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6467-10.2011>
95. *Karaca I., Tamboli I.Y., Glebov K., Richter J., Fell L.H., Grimm M.O., Haupenthal V.J., Hartmann T., Gräler M.H., Van Echten-Deckert G., Walter J.* // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. P. 16761–16772. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.535500>
96. *Van Echten-Deckert G., Hagen-Euteneuer N., Karaca I., Walter J.* // *Cell. Physiol. Biochem.* 2014. V. 34. P. 148–157. <https://doi.org/10.1159/000362991>
97. *Pépin É., Jalinier T., Lemieux G.L., Massicotte G., Cyr M.* // *Front. Pharmacol.* 2020. V. 21. P. 77. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00077>
98. *Pyszko J., Strosznajder J.B.* // *Mol. Neurobiol.* 2014. V. 50. P. 38–48. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8622-4>
99. *Sivasubramanian M., Kanagaraj N., Dheen S.T., Tay S.S.W.* // *Neuroscience.* 2015. V. 260. P. 636–648. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.01.032>
100. *Gómez-López S., Martínez-Silva A.V., Montiel T., Osorio-Gómez D., Bermúdez-Rattoni F., Massieu L., Escalante-Alcalde D.* // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 24028. <https://doi.org/10.1038/srep24028>
101. *Pyszko J.A., Strosznajder J.B.* // *Folia Neuropathol.* 2014. V. 52. P. 260–269. <https://doi.org/10.5114/fn.2014.45567>
102. *Lwin A., Orvisky E., Goker-Alpan O., LaMarca M.E., Sidransky E.* // *Mol. Genet. Metab.* 2004. V. 81. P. 70–73. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2003.11.004>
103. *Ren M., Han M., Wei X., Guo Y., Shi H., Zhang X., Perez R.G., Lou H.* // *Neurochem. Res.* 2017. V. 42. P. 686–696. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2125-4>
104. *Zhao P., Yang X., Yang L., Li M., Wood K., Liu Q., Zhu X.* // *FASEB J.* 2017. V. 31. P. 172–179. <https://doi.org/10.1096/fj.201600751R>
105. *Mohamed Badawy S.M., Okada T., Kajimoto T., Hirase M., Matovelo S.A., Nakamura S., Yoshida D., Ijuin T., Nakamura S.* // *J. Biol. Chem.* 2018. V. 293. P. 8208–8216. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.001986>
106. *Dodge J.C., Treleaven C.M., Pacheco J., Cooper S., Bao C., Abraham M., Cromwell M., Sardi S.P., Chuang W.L., Sidman R.L., Cheng S.H., Shihabuddin L.S.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. P. 8100–8105. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508767112>
107. *Henriques A., Croixmarie V., Priestman D.A., Rosenbohm A., Dirrig-Grosch S., D'Ambra E., Huebecker M., Hussain G., Boursier-Neyret C., Echaniz-Laguna A., Ludolph A.C., Platt F.M., Walther B., Spedding M., Loeffler J.P., De Aguilar J.L.G.* // *Hum. Mol. Genet.* 2015. V. 24. P. 7390–7405. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv439>
108. *Гутнер У.А., Шупик М.А., Малошицкая О.А., Соколов С.А., Резвых А.П., Фуников С.Ю., Лебедев А.Т., Устюгов А.А., Алесенко А.В.* // *Биохимия.* 2019. Т. 84. С. 1437–1449. [Gutner U.A., Shupik M.A., Maloshitskaya O.A., Sokolov S.A., Rezvykh A.P., Funikov S.Yu., Lebedev A.T., Ustyugov A.A., Alessenko A.V. // *Biochemistry.* 2019. V. 84. P. 1166–1176.] <https://doi.org/10.1134/S0320972519100063>
109. *Li Y.J., Shi S.X., Liu Q., Shi F.D., Gonzales R.J.* // *Neurosci. Lett.* 2020. V. 14. P. 135160. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135160>
110. *Billich A., Bornancin F., Dévay P., Mechtcheriakova D., Urtz N., Baumruker T.P.* // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 47408–47415. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307687200>
111. *Komnig D., Dagli T.C., Toruntay C., Habib P., Zeyen T., Schulz J.B., Falkenburger B.H.* // *J. Neurochem.* 2018. V. 147. P. 678–691. <https://doi.org/10.1111/jnc.14575>
112. *Potenza R.L., De Simone R., Armida M., Mazzjotti V., Pèzzola A., Popoli P.* // *Neurotherapeutics.* 2016. V. 13. P. 918–927. <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0462-2>
113. *Berry J.D., Paganoni S., Atassi N., Macklin E.A., Goyal N., Rivner M., Simpson E., Appel S., Grasso D.L., Mejia N.I., Mateen F., Gill A., Vieira F., Tassinari V., Perrin S.* // *Muscle Nerve.* 2017. V. 56. P. 1077–1084. <https://doi.org/10.1002/mus.25733>
114. *Hughes R., Dalakas M.C., Merkies I., Latov N., Léger J.M., Nobile-Orazio E., Sobue G., Genge A., Cornblath D., Merschhemke M., Ervin C.M., Agoropoulou C., Hartung H.P.* FORCIDP Trial Investigators // *Lancet Neurol.* 2018. V. 17. P. 689–698. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30202-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30202-3)
115. *Tran C., Heng B., Teo J.D., Humphrey S.J., Qi Y., Couttas T.A., Stefen H., Brettle M., Fath T., Guillemin G.J., Don A.S.* // *J. Neurochem.* 2019. V. 11. P. 14917. <https://doi.org/10.1111/jnc.14917>

116. Joly S., Dalkara D., Pernet V. // *Neural. Plast.* 2017. V. 2017. P. 6818970. <https://doi.org/10.1155/2017/6818970>
117. Mitroi D.N., Karunakaran I., Gräler M., Saba J.D., Ehninger D., Ledesma M.D. // *Autophagy.* 2017. V. 13. P. 885–899. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1291471>
118. Voitova A.A., Dmitrieva M.D., Dymova M.A., Vasileva N.S., Nushtaeva A.A., Richter V.A., Kuligina E.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 783–792. <https://doi.org/10.1134/S1068162019060384>
119. Torkhovskaya T.I., Zakharova T.S., Korotkevich E.I., Ipatova O.M., Markin S.S. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 335–346. <https://doi.org/10.1134/S106816201905011X>

The Role of Sphingosin-1-Phosphate in the Neurodegenerative Disorders

U. A. Gutner*, # and M. A. Shupik*

*Phone: +7 (495) 939-71-59; e-mail: uliana.goutner@gmail.com

*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

Sphingosin-1-phosphate (S1P) is the bioactive sphingolipid metabolite with antiapoptotic action. As a signal molecule S1P regulates cell survival and differentiation, motility and dynamics of the cytoskeleton, and is involved in the processes of cell migration, proliferation, and autophagy. The cell level of S1P is regulated by specific kinases and phosphatases, and by the S1P degrading enzyme, S1P-lyase. S1P performs a significant part of its functions as a ligand to specific membrane G-proteins-coupled receptors (S1PR_{1–5}). S1P receptors are expressed by all cell types including neurons and glia. In the central nervous system S1P can provide protective functions and induce survival-promoting signaling pathways or, on the contrary, contribute to the development of pathological processes, including neurodegenerative disorders. S1P functions, expression and action of its receptors depend on the type of CNS cells, stage of their development and the state of the whole organism. Based on the action of S1P the drug Fingolimod (FTY720) was developed, which, by binding to S1P receptors with high affinity, reduces inflammatory cell infiltration, tissue damage and demyelination. This review highlights recent advances in the understanding of mechanisms of action of S1P and its role in neurodegenerative disorders (Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis).

Keywords: sphingosine-1-phosphate, sphingosine kinase, neurodegenerative diseases, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis



УДК 577.2.08

АМПЛИФИКАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ “КАТЯЩИМСЯ КОЛЬЦОМ” – УНИВЕРСАЛЬНЫЙ МЕТОД АНАЛИЗА ШИРОКОГО КРУГА БИОЛОГИЧЕСКИХ МИШЕНЕЙ¹

© 2021 г. Р. Р. Гарафутдинов*, #, А. Р. Сахабутдинова*, А. Р. Гильванов*, А. В. Чемерис*

*Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Россия, 450054 Уфа, просп. Октября, 71

Поступила в редакцию 26.03.2021 г.

После доработки 14.04.2021 г.

Принята к публикации 16.04.2021 г.

Обнаружение и количественное определение биомишеней – важная аналитическая задача, для решения которой используется широкий спектр различных методов. В последнее время значительное развитие получили методы, основанные на изотермической амплификации нуклеиновых кислот (НК). Среди них особое место занимает амплификация “катящимся кольцом” (АКК), которая используется не только для обнаружения специфических НК, но и для анализа других биомолекул, а также представляет собой универсальную платформу для разработки высокочувствительных методов и удобных диагностических устройств. В настоящем обзоре раскрыт ряд методических аспектов АКК-опосредованного анализа, в частности приведены данные о его ключевых молекулярных участниках, описаны способы повышения эффективности и производительности АКК, кратко охарактеризованы разновидности используемых репортерных систем. Показаны различия в технике АКК-опосредованного анализа биомишеней разных типов. Приведены отдельные примеры использования различных вариантов АКК для решения конкретных диагностических задач.

Ключевые слова: изотермическая амплификация, амплификация “катящимся кольцом”, С-проба, кольцевая матрица, аналит, нуклеиновые кислоты, микроРНК, белки

DOI: 10.31857/S0132342321060075

ВВЕДЕНИЕ

Амплификация нуклеиновых кислот (НК) *in vitro* – основа современных методов молекулярной диагностики различных заболеваний, анализа пищевых продуктов, биологических следов и объектов из окружающей среды. Из множества способов амплификации наибольшее применение получила полимеразная цепная реакция (ПЦР) [1], однако необходимость циклического изменения температуры реакционной смеси обуславливает зависимость ПЦР от дорогостоящего оборудования, что ограничивает ее применимость, особенно в “полевых” условиях. Альтернативой ПЦР служат изотермические методы, та-

кие как амплификация смещением цепи – SDA (Strand-Displacement Amplification), амплификация “катящимся кольцом” – АКК (Rolling Circle Amplification, RCA), петлевая изотермическая амплификация – LAMP (Loop-mediated AMPlification) и др. [2, 3]. В этих методах используются полимеразы с цепь-вытесняющей активностью, обеспечивающие денатурацию двухцепочечных НК в ходе полимеризации, благодаря чему отпадает необходимость циклирования этапов денатурации, отжига и элонгации, а для осуществления реакции достаточно термостата.

Среди изотермических методов АКК занимает особое место: это единственная реакция, позволяющая синтезировать НК-продукты с желаемой (искусственно задаваемой) нуклеотидной последовательностью. Характерная особенность АКК – использование кольцевых НК-матриц, при соответствующем дизайне которых становятся возможными комбинирование с другими ферментативными реакциями, различными репортерными системами, проведение биоанализа в растворе, на поверхности твердых материалов или в живых клетках, а также перевод в высокопроизводительные форматы. В отличие от всех остальных спосо-

¹ Статья победителей конкурса РФФИ “Экспансия”, 2020 г. (грант № 20-14-50120).

Сокращения: АКК – амплификация “катящимся кольцом”; ДНКзим – дезоксирибозим; КМ – кольцевая матрица; НК – нуклеиновые кислоты; НЧЗ – наночастицы золота; ПАКК – протяженный одноцепочечный продукт АКК; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ТКК – транскрипция “катящимся кольцом”; ФВС – функционально активная вторичная структура; SDA – амплификация смещением цепи; SNP – однонуклеотидный полиморфизм.

Автор для связи: (тел.: +7 (347) 235-60-88; эл. почта: garafutdinovr@gmail.com).

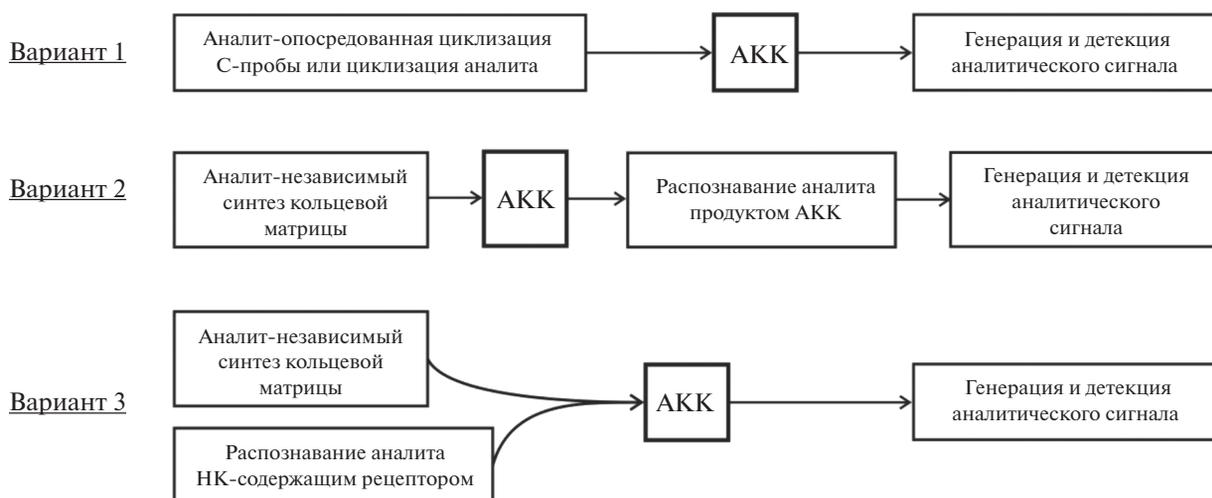


Рис. 1. Варианты включения амплификации “катящимся кольцом” как отдельного этапа в протокол биоаналитического исследования.

бов амплификации, АКК может использоваться не только как способ размножения и последующей детекции молекул аналита – нуклеиновых кислот, но и как инструмент для получения функционально активных НК, опосредующих обнаружение иных биомишеней. Универсальность АКК обусловила разработку множества разнообразных методов биоанализа, нашедших отражение в огромном количестве научных публикаций и послуживших основой для создания портативных микрофлюидных, электрохимических и биосенсорных диагностических устройств [4–7]. Несмотря на широкие возможности, АКК находит практическое применение в первую очередь в молекулярной диагностике, обеспечивая высокую чувствительность и специфичность обнаружения таких биоаналитов, как нуклеиновые кислоты и белки. В настоящем обзоре представлены молекулярные основы метода АКК и показано его применение для анализа биомишеней разной химической природы.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ АМПЛИФИКАЦИИ “КАТЯЩИМСЯ КОЛЬЦОМ”

Амплификация “катящимся кольцом” – это реакция синтеза нуклеиновых кислот на кольцевой матрице. АКК как метод увеличения количества аналита используется только в отношении НК, в остальных случаях реакцию совмещают с распознаванием биомишени специфическим рецептором. В зависимости от природы аналита (НК, белок, малая органическая молекула), особенностей анализируемого образца (происхождение, аналитическая чистота, наличие совместно выделяющихся веществ и проч.) и используемого

инструментария, АКК в качестве отдельного, самостоятельного этапа может занимать разное положение в биоаналитическом протоколе. Можно выделить три варианта использования данной реакции амплификации в анализе (рис. 1).

Вариант 1, применяемый при анализе нуклеиновых кислот, включает АКК как этап амплификации или непосредственно мишени, или кольцевой матрицы, полученной с ее участием. По варианту 2 аналит распознается с помощью продуктов АКК, формирующих функционально активные вторичные структуры (ФВС), а для проведения реакции используют предварительно синтезированную кольцевую матрицу. Этот путь, обеспечивающий повышение концентрации аналитического агента, универсален и реализуется для широкого круга биомишеней. Согласно варианту 3, аналит распознается с помощью рецептора, связанного с НК, которая, как правило, выступает праймером для АКК или НК-захватывающим зондом. Данный путь используется чаще всего в технологиях твердофазного анализа, когда осуществляют фиксацию аналита на подложке и проводят реакции синтеза, расщепления или гибридизации НК у поверхности твердой фазы.

Специфичность АКК-анализа определяется типом аналита и технологией его обнаружения. В целом бóльшую специфичность обеспечивают подходы, в которых реакция АКК приводит к повышению концентрации аналитического агента и/или усилению аналитического сигнала. Многие предложенные на сегодня методы АКК-анализа характеризуются высокой чувствительностью с пределами обнаружения в среднем на уровне фемтомолярных (для НК) и пикомолярных (для белков) концентраций.

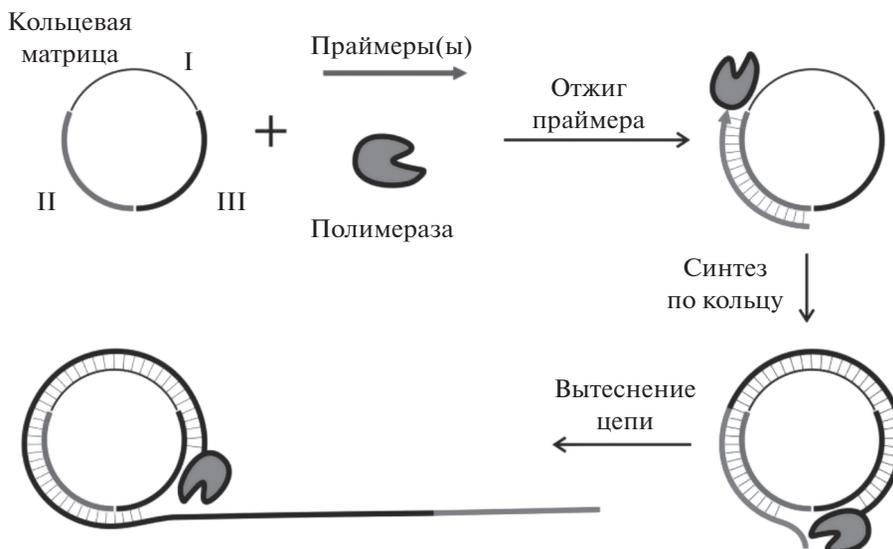


Рис. 2. Ключевые компоненты реакционной системы и протекание АКК. Для кольцевой матрицы разными зонами выделены мотивы, ответственные за связывание с мишенью (I), с праймером (II) и за образование ФВС продуктом АКК (III).

Ключевые компоненты реакционных систем для АКК. Ключевыми участниками АКК выступают одноцепочечная кольцевая матрица (КМ), как минимум один праймер, отжигающийся на КМ (“затравочный” праймер), и полимераза с цепьвытесняющей активностью (рис. 2) [8]. КМ может содержать несколько разных олигонуклеотидных мотивов, ответственных, например, за связывание с мишенью (I), с праймером (II) и за образование ФВС продуктом АКК (III).

После отжига праймера на КМ начинается синтез ее комплементарной копии, который продолжается до тех пор, пока полимераза не дойдет до 5'-конца праймера. Далее фермент вытесняет мешающую ему цепь и продолжает синтез по кольцу, делая множество оборотов и нарабатывая протяженный одноцепочечный продукт АКК (далее – ПАКК), длина которого может составлять десятки, сотни и даже тысячи tandemных повторов в зависимости от процессивности фермента [8, 9].

АКК осуществима не только с кольцевыми ДНК-, но и с РНК-матрицами [9]. В последнем случае реакцию чаще называют транскрипцией “катящимся кольцом” (ТКК), по своей сути – это разновидность АКК, поскольку для нее характерны те же базовые признаки и параметры, что и для АКК с использованием ДНК-матриц. Единственное существенное отличие заключается в применении РНК-зависимых полимераз, и инициация транскрипции может требовать наличия промоторных последовательностей, что накладывает ограничения при дизайне КМ и праймеров.

Как правило, кольцевые матрицы получают из олигонуклеотидов-предшественников, называемых С-проба (С-probe, padlock), путем циклизации их с помощью ДНК- или РНК-лигазы или посредством химического лигирования. В качестве С-проб обычно используют линейные ДНК или РНК протяженностью ~40–60 нт, однако имеются данные о замыкании как коротких (от 13 нт при химическом лигировании и от 25 нт при ферментативном лигировании), так и относительно протяженных (до 105 нт) олигонуклеотидов [9]. Циклизация НК может осуществляться матричным и нематричным способами. Первый вариант, схематично изображенный на рис. 3а, заключается в отжиге С-пробы на так называемой “поддерживающей матрице” (splint); в этом случае С-проба имеет по обоим концам нуклеотидные последовательности протяженностью 10–20 нт, комплементарные поддерживающей матрице [10]. Более короткие участки отжига (суммарно <15 нт) снижают устойчивость формирующейся дуплексной структуры, а протяженные повышают эффективность межмолекулярного взаимодействия, приводящего к образованию линейных продуктов [11]. Отожженные концы С-пробы конструируют таким образом, чтобы они располагались “встык” друг к другу и образовывали ник. В случае анализа НК-мишени в качестве поддерживающей матрицы часто выступает непосредственно детектируемая НК.

Матричный синтез КМ чаще всего проводят с помощью Т4 ДНК-лигазы, однако при анализе РНК используют лигазы с меньшей субстратной специфичностью, например, ДНК-лигазу вируса хлореллы (коммерческая лигаза SplintR) или Т4

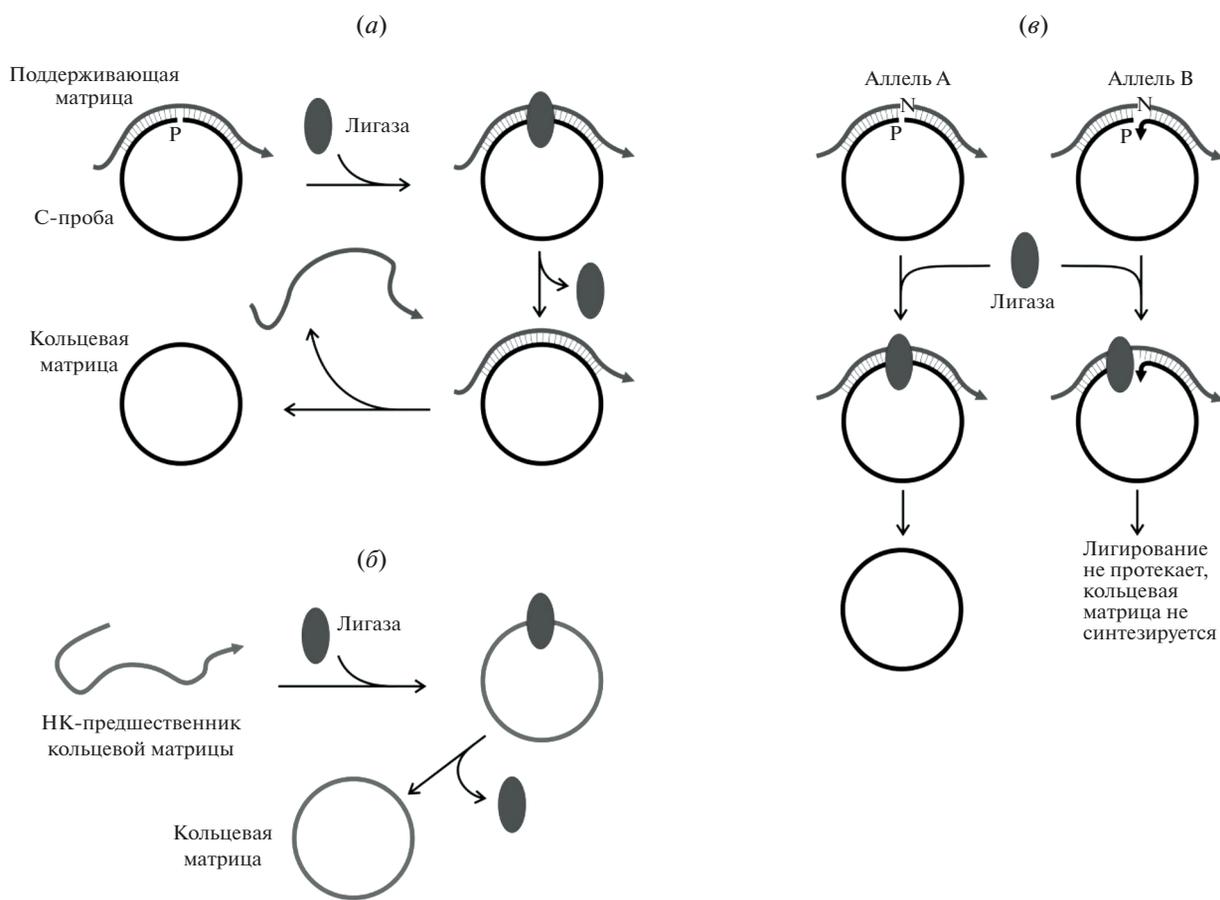


Рис. 3. Схема замыкания С-пробы с поддерживающей матрицей (а) и без нее (б), дискриминация полиморфных нуклеотидов с помощью аллель-специфичных С-проб при анализе однонуклеотидного полиморфизма (в).

РНК-лигазы [12, 13]. Нематричное лигирование не требует присутствия поддерживающей матрицы; его осуществляют с помощью T4 РНК-лигаз или CircLigase (рис. 3б). Хотя нематричное лигирование обеспечивает низкий выход целевого продукта, данный способ незаменим при изучении образцов НК неопределенного состава и при анализе короткоцепочечных НК, например, фрагментированной ДНК или малых РНК. Кроме того, известны способы повышения выхода КМ при лигировании за счет использования агентов молекулярного краудинга, таких как полиэтиленгликоль [14, 15].

Циклизация НК химическим способом в отдельных случаях — более удобная альтернатива лигазам, однако она требует использования дополнительных реагентов или модифицированных С-проб. Первые способы замыкания олигонуклеотидов заключались в конденсации 5'-концевого фосфата и 3'-гидроксигруппы под действием карбодимида или бромциана [16], 5'-концевого иодтимидина с 3'-фосфотиоатом [17] или за счет 5'-O-тозильной группы [18]. Позднее были предложены подходы, основанные на методах клик-

химии [19], в первую очередь азид-алкиновом циклоприсоединении [20].

Размер КМ оказывает значительное влияние на эффективность АКК. Небольшие НК-кольца (<40 нт), по-видимому, малоприспособлены для проведения этой реакции [14], хотя имеются единичные данные о возможности их использования для амплификации [9]. Для КМ, не превышающих в линейном двухцепочечном виде одну персистентную длину ДНК (~51 нм или ~160 п.н. для двухцепочечной ДНК в В-форме [21]), показано, что эффективность АКК коррелирует с количеством витков двойной спирали: для колец, имеющих целочисленное количество витков, наблюдается наименьшая эффективность амплификации, тогда как для колец с нецелочисленным количеством — наивысшая [22]. Для КМ, близких по размерам к плазидам, эффективность АКК существенно снижена [23].

Нуклеотидная последовательность КМ может быть задана таким образом, что отдельные ее участки отжигаются в пределах кольца, образуя вторичные структуры типа петли или «гантели» (dumbbell), способствующие повышению эффек-

тивности циклизации С-пробы и обуславливающие наличие в ПАКК двухцепочечных фрагментов. В зависимости от используемой после АКК системы детекции результатов, в структуру С-пробы могут быть включены последовательности, обеспечивающие образование ФВС (аптамеров, дезоксирибозимов, G-квадруплексов, петель и др.) или несущие сайты распознавания эндонуклеаз, участки для отжига специфических гибридационных зондов или гомонуклеотидные мотивы для связывания с металлическими наночастицами. Обнаружено также, что КМ с высоким содержанием нуклеотидов dA и dC повышают эффективность амплификации по кольцу [24].

АКК возможна только под действием полимераз с цепь-вытесняющей активностью. В этом случае фермент обеспечивает расхождение цепей НК и катализирует синтез новой цепи за счет вытеснения старой по мере продвижения по матрице. Выбор подобных полимераз достаточно широк, но наибольшее распространение получили ДНК-полимеразы Bst, Bsm и Vent без 5'-3'-экзонуклеазной активности, phi29, T7 РНК-полимераза и др. ДНК-полимераза phi29 обладает чрезвычайно высокой процессивностью, однако имеет слишком низкие оптимум активности и температуру инактивации (30 и 65°C соответственно). Большой фрагмент ДНК-полимеразы I из *Geobacillus stearothermophilus* (Bst exo-) — это относительно термостабильный (температурный оптимум 60–65°C) и процессивный фермент. Доступны его мутантные формы (например, Bst 2.0, Bst 2.0 Warm Start, Bst 3.0 компании New England Biolabs, США, <https://international.neb.com>), обладающие большей устойчивостью к действию ингибиторов и обеспечивающие большую скорость амплификации. Вариант Bst 3.0 обладает также активностью обратной транскриптазы. Vent exo- термостабильна, имеет высокий температурный максимум активности (75°C) и обладает процессивностью, сравнимой с Taq ДНК-полимеразой. РНК-полимераза бактериофага T7 применяется для проведения ТКК, однако требует наличия промоторных последовательностей или матрицы с повышенным содержанием пиримидиновых оснований. В то же время незначительное изменение в содержании ионов магния и рибонуклеотидтрифосфатов меняет ее субстратную специфичность [25]. Описано также использование обратных транскриптаз для проведения ТКК [26]. К сожалению, существенный недостаток наиболее популярной ДНК-полимеразы Bst exo- — способность наряду с синтезом специфического продукта реакции приводить к образованию неспецифических продуктов [27, 28]. По-видимому, аналогичным свойством обладают и прочие термостабильные полимеразы с цепь-вытесняющей активностью (собственные неопубликованные данные). Данная особенность обуславливает получение ложных результатов

или их неверную интерпретацию. Например, Yang et al. [29] предлагают новый механизм протекания амплификации, так называемую “скачкообразную” АКК, для объяснения наработки продуктов, характерных для АКК, но образовавшихся в отсутствие КМ. Ранее было предложено несколько способов предотвращения побочных реакций амплификации, протекающих под действием ДНК-полимеразы Bst exo- [30–32].

Способы повышения эффективности и производительности АКК. Изначально АКК рассматривалась как реакция удлинения единичного праймера, дающего только один длинный одноцепочечный продукт. В этом случае реакцию называют линейной АКК, а накопление продуктов носит арифметический характер, поскольку количество матриц, инициирующих амплификацию, остается постоянным. Чувствительность подходов, основанных на линейной АКК, низка и часто не позволяет осуществлять диагностически значимую детекцию биоаналита. Для повышения эффективности реакции используют более одного праймера. Вариант с отжигом на КМ сразу нескольких праймеров получил название мультипраймерная АКК (рис. 4а); его применение оправдано для относительно больших КМ (например, плазмид) с целью получения их копий для последующего секвенирования [33]. При использовании второго праймера, отжигающегося на одноцепочечном продукте удлинения первого, коэффициент размножения ампликонов увеличивается, реакция начинает носить экспоненциальный характер за счет постоянного вытеснения синтезированных цепей, многократного отжига и удлинения обоих праймеров (рис. 4б). Такой вариант АКК, называемый “сверхветвящаяся АКК”, или рамификация (hyperbranched RCA, ramification) [34], получил наибольшее распространение. В 2004 г. была разработана [35] и позднее усовершенствована [36] АКК “от кольца к кольцу” (Circle-to-Circle Amplification, C2CA), которая включает повторяющиеся циклы репликации КМ, расщепления ПАКК с помощью рестриктаз, получения и репликации новых КМ (рис. 4в). Murakami et al. предложили АКК, сопровождающуюся “генерацией праймеров” [37], которая основана на расщеплении ПАКК никазой и использовании дополнительной КМ (рис. 4г). Внешение ников в ПАКК приводит к увеличению количества 3'-концов, способных подвергаться удлинению полимеразой [38]. Для всех вариантов АКК с несколькими праймирующими последовательностями наиболее употребляемым стал термин “экспоненциальная АКК”.

Для повышения специфичности и производительности АКК-анализа, а также расширения спектра инструментальных методов, применимых для регистрации его результатов, были разработаны варианты амплификации на твердой по-

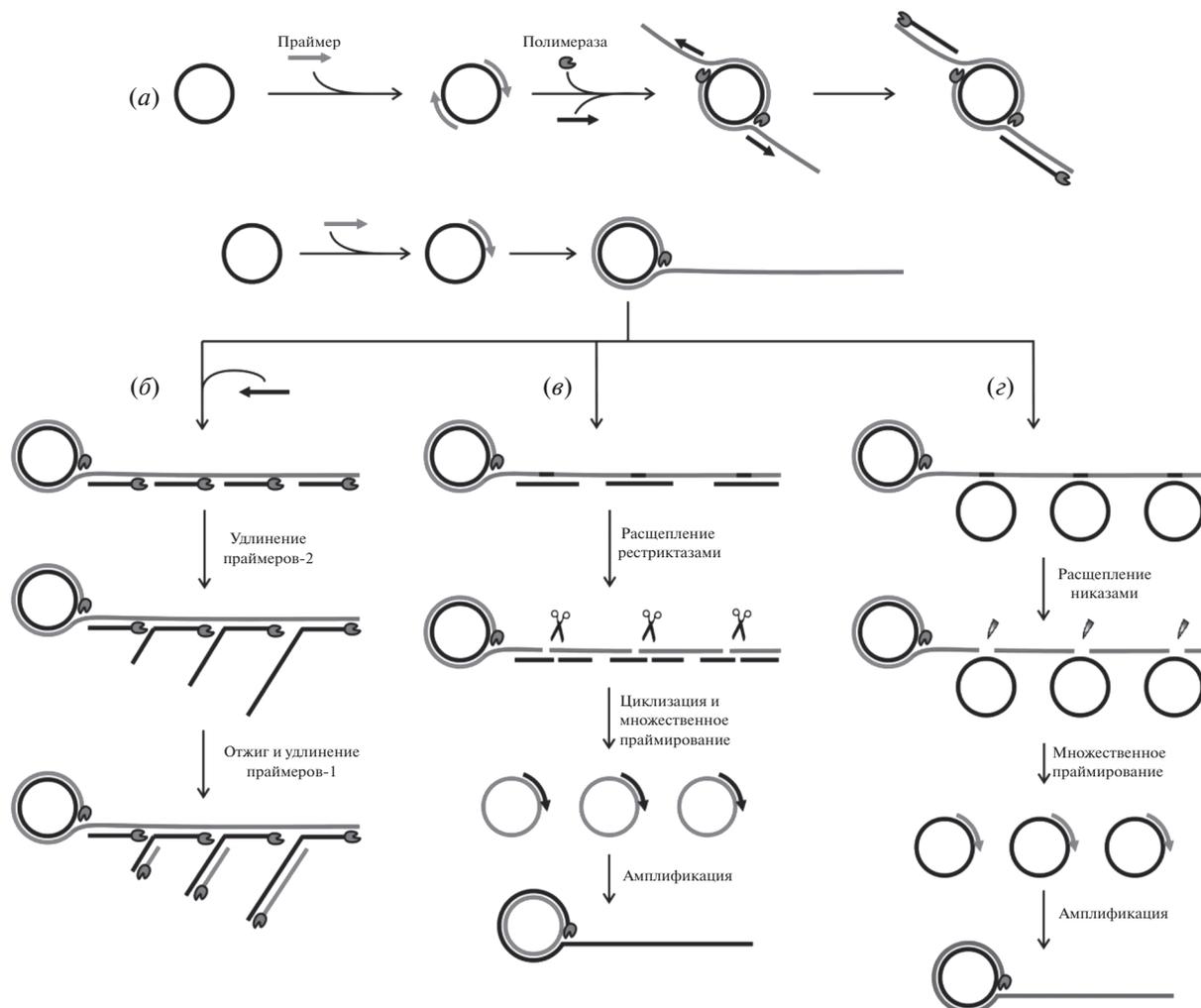


Рис. 4. Схемы протекания различных вариантов АКК с несколькими праймерами: мультипраймерная АКК (а), рамификация (б), амплификация “от кольца к кольцу” (в), АКК с генерацией праймеров (г).

верхности (“твердофазная АКК”). Для этого на подложке фиксируют один из НК-компонентов реакционной системы: праймер, поддерживающую матрицу или ДНК-пробу для распознавания мишени. В зависимости от метода анализа, иммобилизацию биомолекул осуществляют на поверхности стекла (формат микрочипов [39]), полимерных материалов (мембраны [40] и микроканалы [5, 41]), благородных металлов, графита (электрохимические биосенсоры [6, 7] и спектроскопия поверхностного плазмонного резонанса [42]). Химия иммобилизации определяется материалом подложки; как правило, закрепление биомолекул проводят путем образования ковалентных связей при взаимодействии функциональных групп или атомов поверхности и иммобилизуемой молекулы (COOH-, NH₂-, HS-, СНО-группы, поверхностные атомы металлов и др.) или за счет аффинного взаимодействия

(системы биотин–стрептавидин, диоксигенин–антитело, антиген–антитело и др.). Для повышения загрузки поверхность функционализируют дендримерными структурами [43].

АКК в формате микрочипов обеспечивает параллельный анализ множества образцов, превосходящий по производительности мультиплекс-анализы в микропробирках [39]. Закрепление НК-компонентов реакционных систем на поверхности магнитных микрочастиц позволяет осуществлять с помощью внешнего магнита либо селективное выделение исследуемого аналита и/или его транспортировку в зону реакции, или транспортировку продуктов АКК в зону регистрации аналитического сигнала [44], а при фиксации на проводящих поверхностях – использовать электрохимические методы анализа [4–6]. Технологии, включающие “твердофазную АКК”, характеризуются значительным разнообразием, и

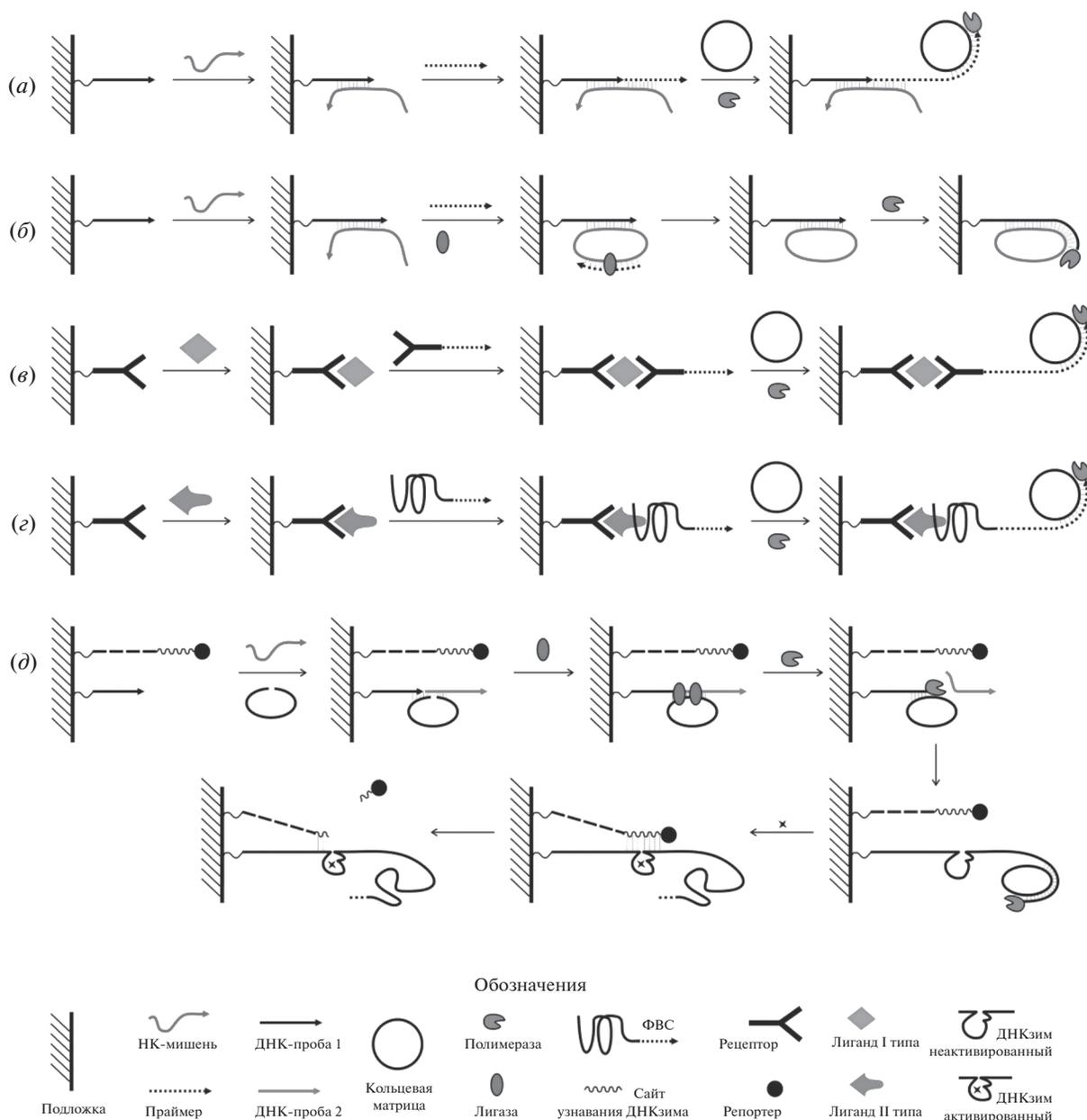


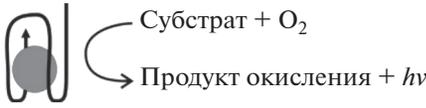
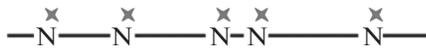
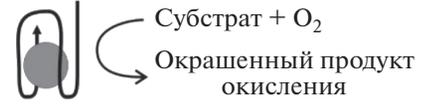
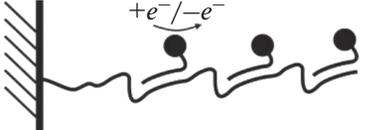
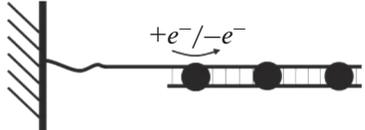
Рис. 5. Наиболее популярные варианты “твердофазной” АКК: (а) – захват НК-мишени иммобилизованной ДНК-пробой, мишень-опосредованное лигирование пробы с праймером и запуск АКК; (б) – захват НК-мишени иммобилизованной ДНК-пробой, циклизация НК-мишени и запуск АКК; (в) – распознавание биомисени, отличной от НК, иммобилизованным рецептором, образование сэндвич-комплекса с конъюгатом рецептора с праймером и запуск АКК; (г) – распознавание биомисени, отличной от НК, иммобилизованным рецептором и ФВС, несущей праймер, и запуск АКК; (д) – один из вариантов совмещения АКК с технологией “ДНК-ходоков” [45].

большинство из них представляют собой сложные каскадные процессы, сочетающие этапы распознавания биомисени, конкурентного отжига НК-структур, получение КМ, АКК, генерацию аналитического сигнала и др. (рис. 5).

Вследствие стерических затруднений ферментативные процессы у поверхности протекают с меньшей эффективностью, поэтому недавно для повышения коэффициента размножения ампли-

конов была предложена новая стратегия, заключающаяся в совмещении АКК с технологией так называемых “ДНК-ходоков” (DNA walker). Для этого на подложке закрепляют два или более типа ДНК-проб, одна из которых распознает исследуемую НК, остальные участвуют в генерации аналитического сигнала. После фиксации НК пробой № 1 на поверхности запускается каскад из повторяющихся событий денатурации–отжига

Таблица 1. Способы генерации аналитического сигнала, широко используемые в АКК-анализе

Вид сигнала	Репортер	Принцип функционирования	Ссылки
1) Флуоресцентный	а) Интеркалирующие красители		[48, 49]
	б) Флуоресцентные гибридизационные зонды		[50, 51]
	в) Флуорогенный субстрат		[52–57]
	г) Флуоресцентные нуклеотиды		[58–62]
	д) Наночастицы металлов и металлокомплексы		[63]
2) Колориметрический	а) Хромогенный субстрат		[64–66]
	б) Колориметрические гибридизационные зонды		[67]
3) Электрохимический	а) Гибридизационные зонды с электроактивной или проводящей меткой		[45, 46, 68, 69]
	б) НК-связывающие электроактивные частицы		[45, 70]

НК-структур и ферментативных реакций, приводящих к синтезу ПАКК [45–47].

Детекция результатов АКК-анализа. Совместимость АКК с различными репортерными системами обуславливает возможность детекции результатов с помощью широкого спектра инструментальных методов как по конечной точке, так и в реальном времени. Первыми способами регистрации продуктов АКК стали гель-электрофорез и применение интеркалирующих красителей и флуоресцентных гибридизационных зондов, в том числе функционирующих за счет FRET-эффекта (FRET – резонансный перенос энергии флуоресценции). Перевод АКК в твердофазный формат и использование микро- и наноразмерных структур (магнитных частиц, квантовых точек, наночастиц металлов и др.) сделало возможным применение электрохимических, спектроскопических, акустических и оптических методов. В табл. 1 приведены

наиболее используемые репортерные системы и принципы их функционирования.

Как и в большинстве амплификационных методов, измерение флуоресценции – самый популярный способ регистрации результатов АКК-анализа. Для получения флуоресцентного сигнала используют различные приемы; наиболее применяемыми остаются добавление в реакционные смеси интеркалирующих красителей (SYBR Green I, тиофлавин Т, порфирины и др.), флуоресцентных гибридизационных зондов или окисление флуорогенного субстрата (табл. 1). Хотя использование интеркалирующих красителей – это весьма удобный вариант детекции продуктов АКК, он, к сожалению, характеризуется невысокой специфичностью. Более достоверный результат получают при использовании флуоресцентных зондов – олигонуклеотидов, содержащих в молекуле как минимум один флуорофор (органический

краситель или квантовую точку), а также тушители/акцепторы светового излучения. Строение зондов может быть различным: применяются зонды простые (меченые одним флуорофором), шпильчатого типа (молекулярные биконы), расщепляющиеся под действием эндонуклеаз или каталитически активных ПАКК (дезоксирибозимов), составные и др. Также удобный прием – добавление в реакционные смеси флуоресцентных нуклеозидтрифосфатов, обеспечивающих синтез флуоресцентно-меченых продуктов амплификации [58–61], однако следует учитывать возможное снижение в отдельных случаях эффективности реакции или полное ее ингибирование при применении подобных субстратов [61, 62]. Интересной с точки зрения используемой репортерной системы представляется работа Chen et al. [63], которые предложили особые “инвертированные” С-пробы с поли-dA-мотивами, приводящими к образованию ПАКК с множественными повторами dT₄₀. Последние образуют прочный комплекс с наночастицами меди, характеризующийся высоким квантовым выходом флуоресценции с максимумом при 580–600 нм и большим стоксовым сдвигом ($\Delta\lambda \sim 150$ нм). В технологиях, предусматривающих измерение люминесцентного сигнала, ПАКК образуют дезоксирибозимы или G-квадруплексы, которые в присутствии соответствующих кофакторов (катионов металлов, гема, dNTP и др.) приобретают активность пероксидаз и катализируют окисление флуорогенных субстратов, например, люминола, сопровождающееся выделением светового излучения [52–57].

Детекция результатов АКК по изменению окраски раствора часто не требует использования дорогостоящего оборудования, поскольку может осуществляться визуально. Наибольшее применение в колориметрических методах нашло окисление хромогенных субстратов: 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоной) кислоты (ABTS), 3,3'-диаминобензидина (ДАБ), 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ), *o*-фенилендиамин (ОФД) – до окрашенных продуктов (табл. 1). Разработаны колориметрические гибридационные зонды на основе наночастиц металлов, в первую очередь золота (НЧЗ) (табл. 1). Тандемный характер ПАКК обуславливает сближение металлических наночастиц при отжиге на нем подобных зондов; в случае зондов на основе НЧЗ происходит изменение окраски раствора от красной (пурпурной), характерной для разобщенных в пространстве НЧЗ, до синеватой, характерной для агрегатов НЧЗ. Проблема устойчивости зондов на основе НЧЗ в условиях проведения амплификационного анализа достаточно важна; ранее нами был предложен способ повышения их стабильности [71]. Помимо возможности использования НЧЗ в создании колориметрических зондов, к преимуществам можно отнести возможность их

применения для доставки олигонуклеотидов в клетки [72], например, АКК-праймеров.

Большинство способов электрохимической детекции базируется на применении либо гибридационных зондов, несущих электроактивную (метиленовый синий, ферроцен и др.) или проводящую (наночастицы металлов) метку, либо электроактивных частиц (гем, наночастицы металлов, метиленовый синий и др.), нековалентно связывающихся с нуклеиновыми кислотами. Электрохимические подходы стали основой для разработки разнообразных портативных биосенсорных устройств, которые используют в основном в медицинской диагностике [6].

В последние годы в АКК-анализе начали находить применение нетрадиционные для биохимических исследований виды аналитического сигнала. Так, новым направлением стало использование методологий магнитооптики [44, 73] и акустики [74]. Согласно работе Garbarino et al. [73], исследуемую НК-мишень закрепляют на поверхности магнитных микрочастиц путем их захвата специальными ДНК-пробами, проводят АКК и далее по изменению оптических свойств раствора в магнитном поле судят о характере протекания ферментативной реакции. Yang et al. [74] разработали акустический анализатор, в котором исследуемую бактериальную ДНК фиксировали с помощью захватывающих ДНК-проб на магнитных микрочастицах и далее инициировали АКК. Поскольку молекулы ДНК поглощают звуковое излучение в терагерцевом диапазоне хуже, чем молекулы воды, продукты АКК обуславливают значительное поглощение терагерцевого излучения после успешного протекания реакции, что может быть зафиксировано с помощью акустической спектроскопии.

ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ АМПЛИФИКАЦИИ “КАТЯЩИМСЯ КОЛЬЦОМ”

АКК первоначально применялась в основном для обнаружения специфических нуклеотидных последовательностей, однако по мере развития и появления новых молекулярных инструментов она трансформировалась в удобный метод исследования более сложных биообъектов, в том числе *in vivo*, и стала обеспечивать высокочувствительное определение аналитов разных типов.

Анализ нуклеиновых кислот. Первое применение АКК нашла в генотипировании, в частности при изучении однонуклеотидного полиморфизма – SNP [75, 76]. Для этой цели конструируются аллель-специфичные С-пробы, циклизация которых посредством дискриминирующего лигирования возможна только при полной комплементарности 3'-концевого нуклеотида С-пробы матрице

(рис. 3е). Позднее SNP-типирование с помощью АКК было переведено в производительные чиповый [77] и мультиплексный [78] форматы, и были предложены подходы, совмещающие аллель-специфичное лигирование и АКК с новыми способами генерации аналитического сигнала [50].

Наибольшее число ранних работ по АКК было посвящено обнаружению ДНК различных организмов [4, 5, 7]. Совершенствование методологии АКК обусловило появление новых оригинальных способов анализа ДНК. Например, в работах [67, 79] описаны колориметрические методы определения генетического материала растительного патогена *Phytophthora infestans* [67] и бактерии *Staphylococcus aureus* [79]. Первый из них основан на использовании АКК, запускаемой системой CRISPR/Cas9, и функционализированных НЧЗ в качестве гибридационных зондов. Особенность второго – многоуровневая система распознавания мишени и генерации аналитического сигнала, включающая использование биотин-меченых праймеров, дигоксин-меченых зондов, конъюгата НЧЗ с антидигоксигенином и пероксидазой и окисление ТМБ пероксидазой в микропланшетах, функционализированных стрептавидином.

С развитием АКК больше внимания стало уделяться также выявлению генетического материала различных вирусов, содержащих одноцепочечные ДНК или РНК, удобных в качестве поддерживающей матрицы при циклизации специфических С-проб. В настоящее время АКК-опосредованное обнаружение вирусов реализуют как в растворе (пробирках), так и в микрофлюидных устройствах [80], в формате электрохимических биосенсоров [81], совмещают с другими ферментативными реакциями, например, с ПЦР с обратной транскрипцией и последующей SDA [82].

В последние годы акцент в применении АКК смещается в сторону анализа короткоцепочечных нуклеиновых кислот, в первую очередь малых и не кодирующих РНК. В работе Ning et al. [83] описан способ обнаружения малых РНК с известной длиной и последовательностью с помощью ТКК в присутствии обратной транскриптазы SuperScript IV, РНК-полимеразы *E. coli* и нуклеазы Nb.BbvCI. Ciftci et al. предложили метод детекции гипервариантных РНК-вирусов, основанный на использовании С-проб с вырожденными 3'-концевыми нуклеотидами [84]. Для однозначной дифференцировки изоформных РНК предложены особые варианты С-пробы – iLock-пробы [85].

Большая часть работ, посвященных применению АКК в анализе рибонуклеиновых кислот, затрагивает количественную оценку микроРНК, выступающих важным маркером при диагностике различных патологических состояний [86]. Достижения в этой области представлены в недавних об-

зорах [87–89]. Первая работа по обнаружению микроРНК с помощью АКК была опубликована в 2006 г. [90]. Иной подход, получивший название miR-ID и заключающийся в циклизации микроРНК путем нематричного лигирования и последующей ТКК с обратной транскриптазой, был предложен в 2011 г. [26]. Оригинальный способ анализа микроРНК описан в работе Zhao et al. [51], согласно которому АКК инициируется специальной ДНК-триплексной структурой с мотивом ТА·Т. В большинстве случаев микроРНК выступает в качестве поддерживающей матрицы при циклизации С-пробы, нередко она используется одновременно и как затравочный праймер. В табл. 2 с целью иллюстрации многообразия существующих подходов приведено лишь несколько оригинальных технологий последних лет, в которых реализованы необычные способы генерации аналитического сигнала при АКК-анализе микроРНК. Большинство из предложенных технологий позволяют определять фемтомолярные концентрации микроРНК, кроме того, многие обеспечивают также анализ полиморфных вариантов микроРНК в пределах одного семейства [92].

Буквально в последние годы метод АКК начал применяться для анализа кольцевых РНК, играющих, как и микроРНК, важную роль в регуляции работы генов [93]. При обнаружении данного типа мишеней осуществляют ТКК напрямую с образцом РНК, выделенным из биоматериала, поскольку нет необходимости проводить циклизацию НК или вводить ее дополнительно. При проведении ТКК с обратной транскриптазой синтезируются транскрипты, детекция которых возможна либо путем ОТ-ПЦР, либо с помощью гель-электрофореза [94].

При разработке новых методов АКК-анализа исследователи не обошли вниманием и CRISPR/Cas-системы редактирования генома. Первыми систему CRISPR/Cas9 для обнаружения микроРНК использовали Qiu et al. [95]. Позднее были предложены варианты экспоненциальной АКК, в которых микроРНК выступает праймером для ТКК, приводящей к получению однонитевой РНК с повторами, расщепляемыми нуклеазой Cas12a, в результате чего генерируются новые праймерные последовательности [96]. CRISPR/Cas-система была применена не только для обнаружения специфических НК-мишеней, но также и для оценки образования неспецифических продуктов АКК за счет использования в качестве внутреннего отрицательного контроля в диагностических тест-системах [97].

Значительным достижением стала возможность проводить с помощью АКК анализ нуклеиновых кислот *in vivo*, что особенно актуально для молекул РНК [98, 99]. В работе Duckworth et al. [100] предложен метод мультиплексного профилирования РНК и оценки экспрессии поверх-

Таблица 2. Примеры работ по анализу микроРНК, описывающих оригинальные способы получения аналитического сигнала

Ссылка	Роль микроРНК	Принцип технологии	Предел обнаружения, М
[48]	Праймер	МикроРНК праймирует АКК на гантелеобразной С-пробе; продукт линейной АКК образует G-квадруплексы, в которые интеркалирует тиофлавин Т, обеспечивая появление флуоресцентного сигнала	4.9×10^{-15}
[49]	Запуск расщепления ДНК-дуплексов и генерация праймеров	Молекулы микроРНК отжигаются на продукте АКК, получаемом с КМ № 1, и образующиеся двухцепочечные структуры расщепляются дуплекс-специфической нуклеазой до фрагментов, которые далее праймируют АКК с КМ № 2. Новый продукт АКК образует G-квадруплексы, связывание которых с комплексом протопорфирина IX и ионов Zn^{2+} вызывает появление флуоресцентного сигнала	1×10^{-15}
[53]	Поддерживающая матрица и праймер	МикроРНК обеспечивает замыкание С-пробы и праймирует АКК, продукт которой расщепляется рестриктазой до фрагментов, дающих отдельные G-квадруплексы, связывающиеся с гемом. Образующиеся комплексы катализируют окисление <i>o</i> -фенилендиамина до окрашенного продукта, вызывающего тушение флуоресценции квантовых точек на основе MoS_2	4.6×10^{-15}
[54]	Поддерживающая матрица	В присутствии микроРНК С-проба замыкается в кольцо, обеспечивающее в ходе АКК образование ФВС – тримера G3, приобретающего после связывания с гемом свойства пероксидазы. Аналитический сигнал (изменение окраски) обеспечивается за счет окисления АВТС, катализируемого указанным миметиком пероксидазы	3.7×10^{-14}
[59]	Поддерживающая матрица и праймер	МикроРНК обеспечивает замыкание С-пробы и праймирует АКК в присутствии модифицированного нафталимидом трифосфата dUTP, что обеспечивает наработку флуоресцирующего продукта амплификации	3.58×10^{-15}
[68]	Запуск каскада ферментативных реакций	МикроРНК из экзосом связываются со специальной LNA-пробой, иммобилизованной на магнитных микрочастицах, вытесняя из комплекса с ним олигонуклеотиды, которые далее гибридизуются с закрепленными на золотом электроде зондами и праймируют на его поверхности АКК. Продукт АКК образует G-квадруплексы, связывающие электроактивный краситель метиленовый синий, который обеспечивает появление электрохимического сигнала	2.75×10^{-15}
[91]	Праймер	МикроРНК захватывается КМ, удерживающейся частично комплементарным ей зондом на поверхности модифицированных стрептавидином магнитных микрочастиц. МикроРНК праймирует АКК, продукт амплификации детектируется с помощью интеркалирующего красителя SGI	1×10^{-13}
[92]	Поддерживающая матрица	МикроРНК с помощью захватывающей ДНК-пробы фиксируется на поверхности микрофлюидных каналов и опосредует последующее матричное лигирование адаптора, выступающего праймером для АКК. Расщепление продукта АКК нуклеазой приводит к образованию новых молекул, инициирующих амплификацию. Детекцию результатов проводят с помощью интеркалирующего красителя SGI	$<1 \times 10^{-20}$

ностных белков для единичной клетки, что обусловило возможность изучения фенотипической и функциональной гетерогенности клеточных популяций. Описанный в данной работе подход включает этап комплексообразования с ионами лантаноидов (для детекции с помощью масс-цитометрии) или флуорофорами (для детекции с помощью проточной цитометрии). Zhang et al. первыми осуществили прижизненное обнаружение микроРНК [101], разработав биоразлагаемые металлоорганические наночастицы для доставки ДНК-полимеразы phi29 и специфической КМ в живые клетки и проведения в них АКК.

Анализ белков и малых молекул. Белки – второй по популярности тип биомолекул после НК, детектируемый с помощью АКК-подходов, при этом последние нередко включают методики иммуноферментного анализа (ИФА). Сама АКК в случае белков выступает инструментом, опосредующим их распознавание и/или генерацию аналитического сигнала. Как правило, АКК предваряется распознаванием белковой мишени рецептором, конъюгированным с праймером или ДНК-пробой, нередко этот процесс сочетают с селективным извлечением мишени из образца и/или фиксацией его на твердом носителе. Первой технологией обнаружения белков с помощью АКК стал подход, названный авторами “иммуно-АКК” (immuno-RCA) [102]. Согласно данному подходу, предварительно получают конъюгат олигонуклеотидного праймера, запускающего АКК на специальной КМ, с антителом. По завершении АКК продукт амплификации остается связанным с антителом, и его обнаружение становится возможным с помощью ИФА, например, после закрепления в лунках стандартного планшета (как показано на рис. 5в, 5г). Аналогично нуклеиновым кислотам, в последние годы появилось множество оригинальных методических работ, посвященных обнаружению и высокочувствительному определению белков с помощью АКК (табл. 3).

В случае белков анализ *in vivo* ограничивается пока выявлением мембранных протеинов. Например, в работе Liu et al. [110] описан способ визуализации MUC1 с помощью комплекса из трех олигонуклеотидов, один из которых образовывал аптамер к белку и отвечал за локализацию указанного комплекса на поверхности клеток, второй инициировал АКК, а третий был мечен флуорофором Cy5 и обеспечивал появление аналитического сигнала.

АКК находит применение также для анализа относительно небольших органических молекул: нуклеозидтрифосфатов, лекарственных и наркотических веществ, токсинов, ядохимикатов. Так, Qiu et al. предложили способ определения dNTP в клеточных экстрактах с пределом обнаружения в

несколько пМ [111]. В работе Lin et al. [112] описан метод количественной оценки гепарина в плазме крови с пределом обнаружения 0.83 нМ, основанный на вытеснении гепарином из комплекса с протамином праймеров, запускающих АКК. Разработаны аптамер-опосредованные способы обнаружения токсинов в различных объектах (например, охратоксина А в пиве [113] и в моче [114]), фармакологических препаратов [115], фосфорорганических пестицидов [116].

Детекция экзосом и отдельных клеток. Под детекцией экзосом и отдельных клеток подразумевается селективный анализ их конкретных типов или популяций с помощью АКК-подходов. В его основе лежит распознавание поверхностных биомолекул, преимущественно белковых рецепторов, специфических для исследуемого объекта, сопровождающееся генерацией аналитического сигнала. Распознавание проводят с помощью аптамерных ФВС; тандемная природа их расположения в цепи ПАКК может обеспечить как фиксацию одной молекулы ПАКК в нескольких точках поверхности одной и той же клетки или везикулы, так и взаимодействие одной молекулы ПАКК с несколькими клетками или везикулами (рис. 6). Данная особенность обуславливает возможность образования трехмерного каркаса из цепей НК, способного захватывать и удерживать исследуемый объект. Формирование трехмерной структуры часто сопровождается конгломерацией, приводящей к желированию реакционной массы или выпадению осадка [117].

Выделение и последующий анализ экзосом стали представлять интерес в силу их вовлеченности в процессы межклеточной коммуникации. Экзосомы имеют значительный потенциал в качестве биомаркеров для диагностики различных патологических состояний, например, раковых заболеваний [118, 119]. Наиболее популярной мишенью для взаимодействия с аптамерами на поверхности экзосом выступает мембранный белок CD63, а для генерации аналитического сигнала используют различные репортерные системы, например, НЧЗ с закрепленными на них флуоресцентными зондами [120], электроактивные комплексы G-квадруплексов с гемом [121], окислительные АВТС инкапсулированной в наночастицы пероксидазой хрена [66] и др. Для повышения специфичности анализа экзосом был предложен метод с использованием двух ДНК-проб, несущих на 5'-концах остаток холестерина и аптамер к CD63 соответственно [122].

Несмотря на свои внушительные размеры, клетки также стали объектом приложения АКК. Так, в работе Yao et al. [117] описан способ селективного отбора мезенхимных стволовых клеток костного мозга, циркулирующих в крови человека. Он заключается в наработке с помощью АКК

Таблица 3. Примеры работ по анализу белков, описывающих оригинальные способы получения аналитического сигнала

Ссылка	Мишень	Принцип технологии	Предел обнаружения
[60]	Алкиладенингликозилаза (ААГ) и урацил-ДНК-гликозилаза (УДГ)	Бифункциональная биотинилированная двухцепочечная ДНК-проба, содержащая на противоположных цепях гипоксантин и урацил, подвергается действию алкиладенингликозилазы и урацил-ДНК-гликозилазы соответственно и затем расщепляется с помощью APE1 с образованием двух праймеров, которые иницируют АКК. Проведение амплификации в присутствии меченых нуклеотидов Су3-dCTP (для определения ААГ) и Су5-dGTP (для определения УДГ) обеспечивает появление флуоресцентного сигнала. Имобилизация продуктов АКК на стрептавидиновых магнитных микрочастицах обеспечивает селективное выделение их из раствора, а последующее расщепление экзонуклеазой позволяет проводить количественную оценку соответствующих ферментов по уровню флуоресценции	6.1×10^{-9} ед./мл ААГ, 1.5×10^{-9} ед./мл УДГ
[64]	Антитела к вирусу гепатита С (НСV)	Две специальные ДНК-пробы конъюгируют с антигеном НСV. В присутствии антител к НСV пробы сближаются и запускают реакцию SDA, в результате которой нарабатывается праймер, иницирующий АКК. Продукт АКК образует G-квадруплексы с активностью пероксидазы, катализирующие окисление 3,3',5,5'-тетраметилбензидина до окрашенного продукта	1.0×10^{-12} М
[70]	Тромбин	Графеновый электрод модифицируют наночастицами золота, к которым затем прикрепляют специальные ДНК-пробы, запускающие АКК. В результате амплификации образуются аптамеры к тромбину, связывание которого на поверхности электрода изменяет его электрохимический потенциал	3.5×10^{-14} М
[103]	T4 ДНК-лигаза и полинуклеотидкиназа	Полинуклеотидкиназа и лигаза катализируют фосфорилирование и циклизацию С-пробы соответственно. Их содержание в образце оценивают по количеству продукта АКК, эффективность наработки которого коррелирует с содержанием данных ферментов в образце	3.4×10^{-4} ед./мл лигазы, 3.8×10^{-4} ед./мл полинуклеотидкиназы
[104]	NF-κB p50	Связывание белка со специфической шпилечной ДНК-пробой запускает каскад ферментативных превращений, включающий реакции SDA, АКК и нуклеазного расщепления и приводящий в случае прочного связывания к образованию G-квадруплексов, взаимодействие которых с тиофлавином Т обуславливает появление флуоресцентного сигнала	1.0×10^{-13} М

Таблица 3. Окончание

Ссылка	Мишень	Принцип технологии	Предел обнаружения
[105]	Факторы транскрипции	Связывание белков со специфической шпилечной ДНК-пробой предотвращает ее расщепление нуклеазой и, обеспечивая ее целостность, позволяет далее проводить замыкание пробы и последующую АКК, в результате которой образуются G-квадруплексы. Взаимодействие последних с N-метил-мезопорфирином IX обуславливает появление флуоресцентного сигнала	88×10^{-12} М
[106]	Простат-специфический антиген (ПСА)	ПСА опосредует связывание магнитных частиц с НЧЗ, несущими праймеры для АКК, продукт которой гибридизуется с зондами, конъюгированными с инвертазой. Указанный фермент превращает сахарозу в глюкозу, уровень которой измеряется с помощью персонального глюкометра	0.1 пг/мл
[107]	ДНК-метилтрансфераза I и урацил-ДНК-гликозилаза (УДГ)	Специфическая ДНК-проба, несущая сайт распознавания метилтрансферазы I и урацил, подвергается действию ДНК-метилтрансферазы I и урацил-ДНК-гликозилазы, а затем обработке эндонуклеазами BssHII и Endo IV. В результате расщепления высвобождается короткая одноцепочечная ДНК, инициирующая АКК, продукт которой образует G-квадруплексы; интеркаляция в них тиофлавина Т вызывает появление флуоресцентного сигнала	0.009 ед./мл метилтрансферазы, 0.003 ед./мл УДГ
[108]	Dam-метилтрансфераза	Специальная шпилечная ДНК-проба с сайтом метилтрансферазы метилируется под действием фермента; ее последующее расщепление с помощью DpnI приводит к образованию праймеров, запускающих АКК. Продукт АКК детектируют с помощью красителя SGI	1.8 ед./мл
[109]	Теломераза	В присутствии активной теломеразы происходит удлинение специального праймера на пять нуклеотидов (GGGTT), что оказывается достаточным для его участия далее в качестве поддерживающей матрицы при циклизации C-пробы и запуске АКК. Уровень наработки продукта АКК детектируют с помощью молекулярных биконов	—

двух типов ПАКК, один из которых формирует аптамеры к белку APLP, а второй содержит участки, комплементарные первой цепи. В результате инкубации смеси ПАКК и крови происходит образование трехмерной сети из цепей ДНК, в которой фиксируются стволовые клетки; образующийся конгломерат легко выпадает в осадок и далее отделяется. Захват клеток патогенного штамма *Escherichia coli* O157:H7 путем закупорки жидкостных микроканалов осуществили Jiang et al. [41]. Был предложен высокочувствительный

спектрофлуориметрический способ обнаружения циркулирующих опухолевых клеток, отработанный на модели карциномы молочной железы человека [123]. Другой, электрохимический метод детекции циркулирующих опухолевых клеток основан на захвате опухолевых клеток продуктом АКК, биотинилированным за счет встраивания в ходе синтеза биотин-меченых нуклеотидов dA, и фиксации на модифицированном стрептавидином электроде [124].

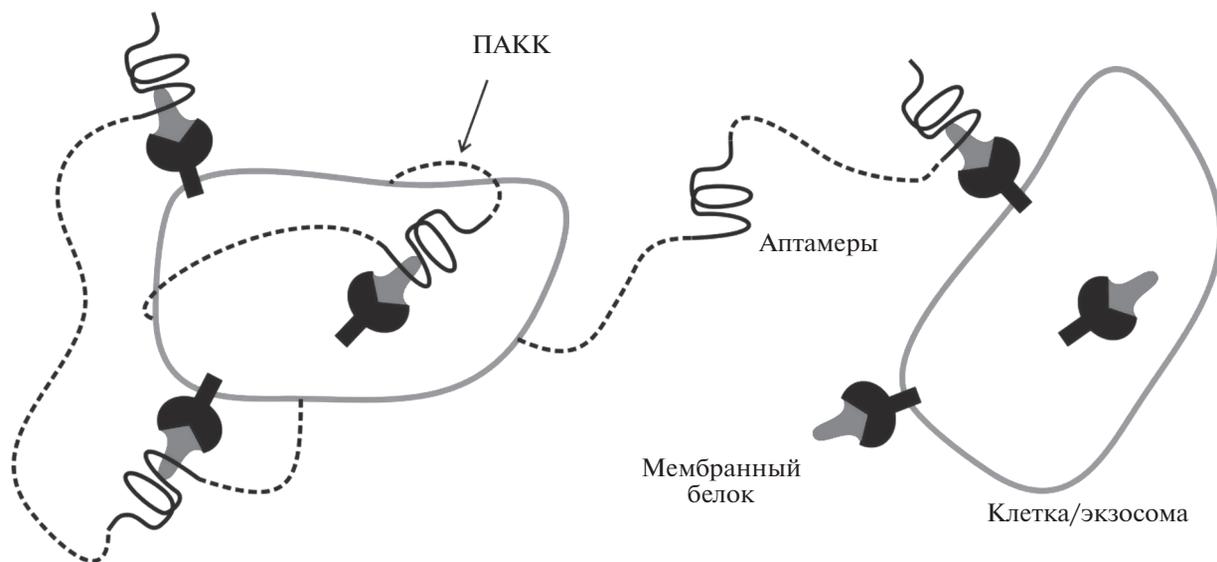


Рис. 6. Распознавание клеток или экзосом продуктом АКК путем взаимодействия аптамеров с рецепторами на их поверхности.

АКК-анализ применяется и для выявления различных патогенных микроорганизмов. Franch et al. разработали подход для определения микобактерий – возбудителей туберкулеза, в котором детектируется ферментативная активность кодируемого микобактериями фермента топоизомеразы IA [125]. На примере метициллин-устойчивого золотистого стафилококка предложена технология выявления микроорганизмов с устойчивостью к антибиотикам, основанная на образовании в ходе АКК специфических аптамеров и включающая усиление аналитического сигнала за счет совмещения с системой CRISPR-Cas12a [126]. Разработаны способы выявления грибных патогенов, например, встречающихся в Бразилии представителей рода *Fonsecaea* [127], и одноклеточных водорослей [128].

Прочие приложения АКК. Помимо анализа описанных выше биомешиней, АКК находит применение также для выявления аналитов небиологического происхождения. Так, предложены способы обнаружения ионов тяжелых металлов в объектах окружающей среды, основанные на расщеплении флуоресцентных зондов под действием дезоксирибозимов, находящихся в структуре ПАКК и активирующихся в присутствии данных катионов, или за счет комплексообразования с НК [129]. Кроме аналитических приложений, АКК используется для высокоэффективной амплификации крупных кольцевых матриц при создании библиотек для секвенирования [33], для генетического анализа бактериальных симбионтов путем наработки в ходе АКК продуктов амплификации их специфических плазмид [130]. Аналогично плазмидам, возможна

амплификация и последующее секвенирование митохондриального генома [131] и кольцевых вирусных геномов [132]. АКК – более удобная альтернатива ПЦР для наработки большого количества последовательностей-кандидатов при подборе аптамеров с помощью стратегии SELEX [133]. Возможность конструирования кольцевых матриц с заданной нуклеотидной последовательностью позволяет получать ПАКК, обеспечивающие образование самособирающихся ДНК-наноструктур, что представляет интерес для бионанотехнологии [4], в частности для таргетной доставки лекарственных средств, систем РНК-интерференции и геномного редактирования [134–136].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в настоящем обзоре данные демонстрируют, что амплификация “катящимся кольцом” – универсальный инструмент, который, будучи включенным в состав нового аналитического метода или технологии, может обеспечить проведение анализа биомешиней различной химической природы: нуклеиновых кислот, белков, ферментов, антибиотиков, токсинов и др. АКК-опосредованные подходы применимы как для качественного обнаружения аналитов, так и для их количественного определения, причем они характеризуются высокой чувствительностью с пределами обнаружения вплоть до концентраций порядка 10^{-15} М. Высокие специфичность и чувствительность АКК-анализа позволяют детектировать аналиты в сложных смесях, т.е. без выделения в чистом виде.

Огромное число работ по АКК-опосредованному анализу, опубликованных в последнее время, свидетельствует о повышенном интересе и значительном практическом потенциале реакции АКК, однако доля работ по ее применению в количественном определении биоаналитов в реальных образцах недостаточно велика. Кроме того, в отличие от прочих методов изотермической амплификации [137–139], АКК не нашла до сих пор применения в молекулярной диагностике коронавируса SARS-CoV-2. По-видимому, требуется проведение дальнейших исследований по усовершенствованию и оптимизации соответствующих АКК-опосредованных методов, отработке их на клиническом материале, упрощении, если это возможно, отдельных технологий и методов, поиск или создание новых молекулярных инструментов, расширяющих потенциал АКК. Несомненно, при разработке диагностических тест-систем должны быть обеспечены требуемая точность и специфичность анализа, исключающие получение как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-14-50120).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mullis K.B., Faloona F.A. // *Meth. Enzymol.* 1987. V. 155. P. 335–350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)
- Fakrudin Md., Mannan K.S.B., Chowdhury A., Mazumdar R.M., Hossain Md.N., Islam S., Chowdhury Md.A. // *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2013. V. 5. P. 245–252. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.120066>
- Бодулев О.Л., Сахаров И.Ю. // *Биохимия.* 2020. Т. 85. С. 174–196. <https://doi.org/10.31857/S0320972520020037>
- Ali M.M., Li F., Zhang Z., Zhang K., Kang D.-K., Ankrum J.A., Le X.C., Zhao W. // *Chem. Soc. Rev.* 2014. V. 43. P. 3324–3341. <https://doi.org/10.1039/c3cs60439j>
- Sarkar S., Sabhachandani P., Konry T. // *Trends Biotechnol.* 2017. V. 35. P. 186–189. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.09.006>
- Qi H., Yue S., Bi S., Ding C., Song W. // *Biosens. Bioelectron.* 2018. V. 110. P. 207–217. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.03.065>
- Gu L., Yan W., Liu L., Wang S., Zhang X., Lyu M. // *Pharmaceuticals.* 2018. V. 11. P. 35. <https://doi.org/10.3390/ph11020035>
- Fire A., Xu S.Q. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. P. 4641–4645. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.10.4641>
- Mohsen M.G., Kool E.T. // *Acc. Chem. Res.* 2016. V. 49. P. 2540–2550. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00417>
- Banér J., Nilsson M., Isaksson A., Mendel-Hartvig M., Antson D.-O., Landegren U. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001. V. 12. P. 11–15. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(00\)00174-9](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(00)00174-9)
- An R., Li Q., Fan Y., Li J., Pan X., Komiyama M., Liang X. // *Nucleic Acids Res.* 2017. V. 45. e139. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx553>
- Lohman G.J.S., Zhang Y., Zhelkovsky A.M., Cantor E.J., Evans T.C., Jr. // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. P. 1831–1844. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1032>
- Krzywkowski T., Nilsson M. // *Nucleic Acids Res.* 2017. V. 45. P. e161. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx708>
- Сахабутдинова А.Р., Максимова М.А., Гарафутдинов Р.Р. // *Мол. биология.* 2017. Т. 51. С. 724–733. <https://doi.org/10.7868/S0026898417040164>
- Sasaki N., Kase C., Chou M., Nakazato G., Sato K. // *Anal. Biochem.* 2020. V. 593. P. 113596. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113596>
- Dolinnaya N.G., Blumenfeld M., Merenkova I.N., Oretskaya T.S., Krynetskaya N.F., Ivanovskaya M.G., Vasseur M., Shabarova Z.A. // *Nucleic Acids Res.* 1993. Vol. 21. P. 5403–5407. <https://doi.org/10.1093/nar/21.23.5403>
- Xu Y., Kool E.T. // *Tetrahedron Lett.* 1997. V. 38. P. 5595–5598. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(97\)01266-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(97)01266-5)
- Herrlein M.K., Nelson J.S., Letsinger R.L. // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. V. 117. P. 10151–10152. <https://doi.org/10.1021/ja00145a042>
- El-Sagheer A.H., Brown T. // *Acc. Chem. Res.* 2012. V. 45. P. 1258–1267. <https://doi.org/10.1021/ar200321n>
- Устинов А.В., Степанова И.А., Дубнякова В.В., Зацепин Т.С., Ножевникова Е.В., Коршун В.А. // *Биоорг. химия.* 2010. Т. 36. С. 437–481. [Ustinov A.V., Stepanova I.A., Dubnyakova V.V., Nozhevnikova E.V., Korshun V.A., Zatsepin T.S. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2010. V. 39. P. 401–445.] <https://doi.org/10.1134/S1068162010040011>
- Hagerman P.J. // *Biopolymers.* 1981. V. 20. P. 1503–1535. <https://doi.org/10.1002/bip.1981.360200710>
- Joffroy B., Uca Y.O., Prešern D., Doye J.P.K., Schmidt T.L. // *Nucleic Acids Res.* 2018. V. 46. P. 538–545. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1238>

23. Dean F.B., Nelson J.R., Giesler T.L., Lasken R.S. // *Genome Res.* 2001. V. 11. P. 1095–1099. <https://doi.org/10.1101/gr.180501>
24. Mao Y., Liu M., Tram K., Gu J., Salena B.J., Jiang Y., Li Y. // *Chemistry.* 2015. V. 21. P. 8069–8074. <https://doi.org/10.1002/chem.201500994>
25. Li Z., Lau C., Lu J. // *Anal. Chem.* 2016. V. 88. P. 6078–6083. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01460>
26. Kumar, P. Johnston B.H., Kazakov S.A. // *RNA.* 2011. V. 17. P. 365–380. <https://doi.org/10.1261/rna.2490111>
27. Wang G., Ding X., Hu J., Wu W., Sun J., Mu Y. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 13928. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13324-0>
28. Garafutdinov R.R., Gilvanov A.R., Sakhabutdinova A.R. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2020. V. 190. P. 758–771. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03127-6>
29. Yang Q., Zhang Y., Li S., Lu X., Yuan Y., Zhang W. // *J. Dairy. Sci.* 2019. V. 102. P. 9702–9710. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16724>
30. Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Kupryushkin M.S., Pyshtnyi D.V. // *Biochimie.* 2020. V. 168. P. 259–267. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.11.013>
31. Сахабутдинова А.Р., Мирсаева Л.Р., Оскорбин И.П., Филипенко М.Л., Гарафутдинов Р.Р. // *Биоорг. химия.* 2020. Т. 46. С. 56–64. [Sakhabutdinova A.R., Mirsaeva L.R., Garafutdinov R.R., Oskorbin I.P., Filipenko M.L. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 39. P. 245–251.] <https://doi.org/10.1134/S1068162020010082>
32. Garafutdinov R.R., Gilvanov A.R., Kurova O.Y., Sakhabutdinova A.R. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 161. P. 1447–1455. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.028>
33. Maïno N., Hauling T., Cappi G., Madaboosi N., Dupouy D.G., Nilsson M. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 3542. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40026-6>
34. Zhang D.Y., Brandwein M., Hsuih T., Li H.B. // *Mol. Diagn.* 2001. V. 6. P. 141–150. <https://doi.org/10.1054/modi.2001.25323>
35. Dahl F., Banér J., Gullberg M., Mendel-Hartvig M., Landerger U., Nilsson M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. P. 4548–4553. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400834101>
36. Tian B., Gao F., Fock J., Dufva M., Hansen M.F. // *Biosens. Bioelectron.* 2020. V. 165. P. 112356. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112356>
37. Murakami T., Sumaoka J., Komiyama M. // *Nucleic Acids Res.* 2009. V. 37. P. e19. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn1014>
38. Li D., Zhang T., Yang F., Yang F., Yuan R., Xiang Y. // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. P. 2074–2079. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04585>
39. Nallur G., Luo C., Fang L., Cooley S., Varshal D., Lambert J., Kukanskis K., Kingsmore S., Lasken R., Schweitzer B. // *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29. P. e118. <https://doi.org/10.1093/nar/29.23.e118>
40. Xu X., Zhang B., Gan P., Wu J., Dai W., Zhang L., Wang J. // *Anal. Biochem.* 2017. V. 533. P. 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.06.005>
41. Jiang Y., Qiu Z., Le T., Zou S., Cao X. // *Anal. Chim. Acta.* 2020. V. 1127. P. 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.06.046>
42. Shi D., Huang J., Chuai Z., Chen D., Zhu X., Wang H., Peng J., Wu H., Huang Q., Fu W. // *Biosens. Bioelectron.* 2014. V. 62. P. 280–287. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.06.066>
43. Wang F., Lu C.-H., Liu X., Freage L., Willner I. // *Anal. Chem.* 2014. V. 86. P. 1614–1621. <https://doi.org/10.1021/ac4033033>
44. Minero G.A.S., Cangiano V., Fock J., Garbarino F., Hansen M.F. // *Methods Mol. Biol.* 2020. V. 2063. P. 3–15. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0138-9_1
45. Chai H., Wang M., Zhang C., Tang Y., Miao P. // *Bioconjug. Chem.* 2020. V. 31. P. 764–769. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00861>
46. Wang S., Ji Y., Fu H., Ju H., Lei J. // *Analyst.* 2019. V. 144. P. 691–697. <https://doi.org/10.1039/c8an01892h>
47. Zhou H., Duan S., Huang J., He F. // *Chem. Commun.* 2020. V. 56. P. 6273–6276. <https://doi.org/10.1039/D0CC01619E>
48. Liu L.-Q., Yin F., Lu Y., Yan X.-L., Wu C.-C., Li X., Li C. // *Nanomedicine.* 2020. V. 32. P. 102339. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2020.102339>
49. Kim M., Kim D.-M., Kim D.-E. // *Analyst.* 2020. V. 145. P. 6130–6137. <https://doi.org/10.1039/d0an01329c>
50. Гарафутдинов Р.Р., Никоноров Ю.М., Чемерис Д.А., Постригань Б.Н., Чубукова О.В., Талипов Р.Ф., Вахитов В.А., Чемерис А.В. // *Биоорг. химия.* 2009. Т. 35. С. 665–673. [Garafutdinov R.R., Nikonorov Y.M., Chemeris D.A., Postriгань B.N., Chubukova O.V., Vakhitov V.A., Chemeris A.V., Talipov R.F. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2009. V. 35. P. 599–606.] <https://doi.org/10.1134/S1068162009050100>
51. Zhao Y., Wang Y., Liu S., Wang C., Liang J., Li S., Qu X., Zhang R., Yu J., Huang J. // *Analyst.* 2019. V. 144. P. 5245–5253. <https://doi.org/10.1039/c9an00953a>
52. Ge J., Hu Y., Deng R., Li Z., Zhang K., Shi M., Yang D., Cai R., Tan W. // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. P. 13588–13594. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03405>
53. Qu X., Bian F., Guo Q., Ge Q., Sun Q., Huang X. // *Anal. Chem.* 2018. V. 90. P. 12051–12058. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02820>
54. Wang J., Mao S., Li H.-F., Lin J.-M. // *Anal. Chim. Acta.* 2018. V. 1027. P. 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.028>
55. Xu J., Guo J., Maina S.W., Yang Y., Hu Y., Li X., Qiu J., Xin Zh. // *Anal. Biochem.* 2018. V. 549. P. 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.03.013>
56. Mi L., Sun Y., Shi L., Li T. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2020. V. 12. P. 7879–7887. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b18053>

57. Wang J., Haghghatbin M.A., Shen W., Mi L., Cui H. // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. P. 7062–7070. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00377>
58. Smolina I.V., Cherny D.I., Nietupski R.M., Beals T., Smith J.H., Lane D.J., Broude N.E., Demidov V.V. // *Anal. Biochem.* 2005. V. 347. P. 152–155. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.06.002>
59. Kumara G.S.R., Pandith A., Seo Y.J. // *Analyst.* 2020. V. 145. P. 4777–4781. <https://doi.org/10.1039/d0an00723d>
60. Li C.-C., Chen H.-Y., Hu J., Zhang C.-Y. // *Chem. Sci.* 2020. V. 11. P. 5724–5734. <https://doi.org/10.1039/d0sc01652g>
61. Goryunova M.S., Arzhanik V.K., Zavriev S.K., Ryazantsev D.Y. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2021. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03322-7>
62. Tasara T., Angerer B., Damond M., Winter H., Dörhöfer S., Hübscher U., Amacker M. // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31. P. 2636–2646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg371>
63. Chen C.-A., Wang C.-C., Kou H.-S., Wu S.-M. // *Anal. Chim. Acta.* 2020. V. 1123. P. 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.04.026>
64. Li R., Liu Q., Jin Y., Li B. // *Microchim. Acta.* 2020. V. 187. P. 139. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-4093-2>
65. Gao T., Chai W., Shi L., Shi H., Sheng A., Yang J., Li G. // *Analyst.* 2019. V. 144. P. 6365–6370. <https://doi.org/10.1039/c9an01466g>
66. Zeng R., Wang J., Wang Q., Tang D., Lin Y. // *Talanta.* 2021. V. 221. P. 121600. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121600>
67. Chang W., Liu W., Liu Y., Zhan F., Chen H., Lei H., Liu Y. // *Microchim. Acta.* 2019. V. 186. P. 243. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3348-2>
68. Tang X., Wang Y., Zhou L., Zhang W., Yang S., Yu L., Yu L., Zhao S., Chang K., Chen M. // *Microchim. Acta.* 2020. V. 187. P. 6130–6137. <https://doi.org/10.1007/s00604-020-4143-9>
69. Gao F., Zhou F., Chen S., Yao Y., Wu J., Yin D., Geng D., Wang P. // *Analyst.* 2017. V. 142. P. 4308–4316. <https://doi.org/10.1039/c7an01434a>
70. Wu Z.-W., Xie X.-C., Guo H.-R., Xia H., Huang K.-J. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2020. V. 412. P. 915–922. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02314-y>
71. Гарафутдинов Р.Р., Сахабутдинова А.Р., Чемерис А.В. // *Биоорг. химия.* 2015. Т. 41. С. 327–335. [Garfutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Chemeris A.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2015. V. 41. P. 289–296.] <https://doi.org/10.1134/S1068162015030036>
72. Шашкова В.В., Епанчинцева А.В., Воробьев П.Е., Разум К.В., Рябчикова Е.И., Пышный Д.В., Пышная И.А. // *Биоорг. химия.* 2017. Т. 43. С. 75–82. [Shashkova V.V., Epanchintseva A.V., Vorobjev P.E., Razum K.V., Ryabchikova E.I., Pyshnyi D.V., Pyshnaya I.A. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017. V. 43. P. 64–70.] <https://doi.org/10.1134/S106816201606011X>
73. Garbarino F., Minero G.A.S., Rizzi G., Fock J., Hansen M.F. // *Biosens Bioelectron.* 2019. V. 142. P. 111485. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111485>
74. Yang X., Yang K., Zhao X., Lin Zh., Liu Zh., Luo Sh., Zhang Y., Wang Y., Fu W. // *Analyst.* 2017. V. 142. P. 4661–4669. <https://doi.org/10.1039/c7an01438d>
75. Lizardi P.M., Huang X., Zhu Z., Bray-Ward P., Thomas D.C., Ward D.C. // *Nat. Genet.* 1998. V. 19. P. 225–232. <https://doi.org/10.1038/898>
76. Christian A.T., Pattee M.S., Attix C.M., Reed B.E., Sorensen K.J., Tucker J.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 14238–14243. <https://doi.org/10.1073/pnas.251383598>
77. Hatch A., Sano T., Misasi J., Smith C.L. // *Genet. Anal.* 1999. V. 15. P. 35–40. [https://doi.org/10.1016/s1050-3862\(98\)00014-x](https://doi.org/10.1016/s1050-3862(98)00014-x)
78. Faruqi A.F., Hosono S., Driscoll M.D., Dean F.B., Alsmadi O., Bandaru R., Kumar G., Grimwade B., Zong Q., Sun Z., Du Y., Kingsmore S., Knott T., Lasken R.S. // *BMC Genomics.* 2001. V. 2. P. 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-2-4>
79. Li Y., Wang J., Wang S., Wang J. // *Microchim. Acta.* 2020. V. 187. P. 119. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-4082-5>
80. Soares R.R.G., Varela J.C., Neogi U., Ciftci S., Ashokkumar M., Pinto I.F., Nilsson M., Madaboosi N., Russon A. // *Biosens. Bioelectron.* 2020. V. 166. P. 112442. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112442>
81. Ciftci S., Cánovas R., Neumann F., Pailraj T., Nilsson M., Crespo G.A., Madaboosi N. // *Biosens. Bioelectron.* 2020. V. 151. P. 112002. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.112002>
82. Lee H., Kim D.-M., Kim D.-E. // *Analyst.* 2021. V. 145. P. 8002–8007. <https://doi.org/10.1039/d0an01326a>
83. Ning L., Wang X., Xu K., Song S., Li Q., Yang X. // *Biochimie.* 2019. V. 163. P. 137–141. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.06.003>
84. Ciftci S., Neumann F., Hernández-Neuta I., Hakhverdyan M., Bálint Á., Herthnek D., Madaboosi N., Nilsson M. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 2872. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39854-3>
85. Krzywkowski T., Kühnemund M., Nilsson M. // *RNA.* 2019. V. 25. P. 82–89. <https://doi.org/10.1261/rna.066753.118>
86. Saliminejad K., Khorshid H.R.K., Fard S.S., Ghaffari S.H. // *J. Cell. Physiol.* 2019. V. 234. P. 5451–5465. <https://doi.org/10.1002/jcp.27486>
87. Cheng Y., Dong L., Zhang J., Zhao Y., Li Z. // *Analyst.* 2018. V. 143. P. 1758–1774. <https://doi.org/10.1039/c7AN02001E>
88. Ye J., Xu M., Tian X., Cai S., Zeng S. // *J. Pharm. Anal.* 2019. V. 9. P. 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.05.004>
89. Gines G., Menezes R., Xiao W., Rondelez Y., Taly V. // *Mol. Aspects. Med.* 2020. V. 72. P. 100832. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.11.002>

90. *Jonstrup S.P., Koch J., Kjems J.* // RNA. 2006. V. 12. P. 1747–1752.
<https://doi.org/10.1261/rna.110706>
91. *Lu W., Wang Y., Song S., Chen C., Yao B., Wang M.* // Analyst. 2018. V. 143. P. 5046–5053.
<https://doi.org/10.1039/c8an01544a>
92. *Cao H., Zhou X., Zeng Y.* // Sens. Actuators B Chem. 2019. V. 279. P. 447–457.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.09.121>
93. *Li J., Mohammed-Elsabagh M., Paczkowski F., Li Y.* // Chembiochem. 2020. V. 21. P. 1547–1566.
<https://doi.org/10.1002/cbic.202000003>
94. *Boss M., Arenz C.* // ChemBioChem. 2020. V. 21. P. 793–796.
<https://doi.org/10.1002/cbic.201900514>
95. *Qiu X.-Y., Zhu L.-Y., Zhu C.-S., Ma J.-X., Hou T., Wu X.-M., Xie S.-S., Min L., Tan D.-A., Zhang D.-Y., Zhu L.* // ACS Synth Biol. 2018. V. 7. P. 807–713.
<https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00446>
96. *Tian W., Liu X., Wang G., Liu C.* // Chem. Commun. 2020. V. 56. P. 13445–13448.
<https://doi.org/10.1039/d0cc06034h>
97. *Tian B., Minero G.A.S., Fock J., Dufva M., Hansen M.F.* // Nucleic Acids Res. 2020. V. 48. P. e30.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa017>
98. *Takahashi H., Horio K., Kato S., Kobori T., Watanabe K., Aki T., Nakashimada Y., Okamura Y.* // Sci. Rep. 2020. V. 10. P. 9588.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-65864-7>
99. *Lin C., Jiang M., Duan S., Qiu J., Hong Y., Wang X., Chen X., Ke R.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2020. V. 526. P. 607–611.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.134>
100. *Duckworth A.D., Gherardini P.F., Sykorova M., Yasin F., Nolan G.P., Slupsky J.R., Kalakonda N.* // Nat. Protoc. 2019. V. 14. P. 901–920.
<https://doi.org/10.1038/s41596-018-0120-8>
101. *Zhang J., He M., Nie C., He M., Pan Q., Liu C., Hu Y., Yi J., Chen T., Xia C.* // Anal. Chem. 2019. V. 91. P. 9049–9057.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01343>
102. *Schweitzer B., Wiltshire S., Lambert J., O'Malley S., Kukanskis K., Zhu Z., Kingsmore S.F., Lizardi P.M., Ward D.C.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 10113–10119.
<https://doi.org/10.1073/pnas.170237197>
103. *Jiang H., Xu Y., Dai L., Liu X., Kong D.* // Sens. Actuators B Chem. 2018. V. 260. P. 70–77.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.12.203>
104. *Xu X., Wang L., Zhu D., Wang Y., Jiang W.* // Talanta. 2018. V. 186. P. 293–298.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.04.047>
105. *Zhang K., Wang L., Zhao H., Jiang W.* // Talanta. 2018. V. 179. P. 331–336.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.11.028>
106. *Sun F., Sun X., Jia Y., Hu Z., Xu S., Li L., Na N., Ouyang J.* // Analyst. 2019. V. 144. P. 6019–6024.
<https://doi.org/10.1039/c9an01558b>
107. *Fan L., Peng Y., Ning B., Wei H., Gao Z., Bai J., Guo L.* // Anal. Chim. Acta. 2020. V. 1103. P. 164–173.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.12.058>
108. *Chen L., Zhang Y., Xia Q., Luo F., Guo L., Qiu B., Lin Z.* // Anal. Chim. Acta. 2020. V. 1122. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.04.061>
109. *Liu Y., Li S., Zhang L., Zhao Q., Li N., Wu Y.* // ACS Omega. 2020. V. 5. P. 11836–11841.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01459>
110. *Liu X., Mao D., Deng G., Song Y., Zhang F., Yang S., Yang S., Li G., Liu F., Cao W., Zhu X.* // Theranostics. 2020. V. 10. P. 4410–4421.
<https://doi.org/10.7150/thno.42951>
111. *Qiu X., Guittet O., Mingoes C., El Banna N., Huang M.-E., Lepoivre M., Hildebrandt N.* // Anal. Chem. 2019. V. 91. P. 14561–14568.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03624>
112. *Lin L., Li B., Han X., Zhang F., Zhang X., Linhardt R.J.* // Analyst. 2021. V. 146. P. 714–720.
<https://doi.org/10.1039/d0an02061c>
113. *Hao L., Wang W., Shen X., Wang S., Li Q., An F., Wu S.* // J. Agric. Food. Chem. 2020. V. 68. P. 369–375.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06021>
114. *Santovito S., Greco D., D'Ascanio V., Sanzani S.M., Avantiaggiato G.* // Anal. Chim. Acta. 2020. V. 1133. P. 20–29.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.07.078>
115. *Huang Y., Wang C., Huo Q., Song Y., Du G., Wang L., Yang X., Chen X.* // Anal. Bioanal. Chem. 2020. V. 412. P. 4555–4563.
<https://doi.org/10.1007/s00216-020-02708-3>
116. *Tang J., Li J., Xiong P., Sun Y., Zeng Z., Tian X., Tang D.* // Microchim. Acta. 2020. V. 187. P. 450.
<https://doi.org/10.1007/s00604-020-04434-0>
117. *Yao C., Tang H., Wu W., Tang J., Guo W., Luo D., Yang D.* // J. Am. Chem. Soc. 2020. V. 142. P. 3422–3429.
<https://doi.org/10.1021/jacs.9b11001>
118. *Шушкова Н.А., Новикова С.Е., Згода В.Г.* // Биомед. хим. 2019. Т. 65. С. 457–467.
<https://doi.org/10.18097/PBMC20196506457>
119. *Yu W., Hurley J., Roberts D., Chakraborty S., Enderle D., Noerholm M., Breakefield X.O., Skog J.* // Ann. Oncol. 2021. V. 32. P. 466–477.
<https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.01.074>
120. *Gao M.-L., Yin B.-C., Ye B.-C.* // Analyst. 2019. V. 144. P. 5996–6003.
<https://doi.org/10.1039/c9an01328h>
121. *Huang R., He L., Xia Y., Xu H., Liu C., Xie H., Wang S., Peng L., Liu Y., Liu Y., He N., Li Z.* // Small. 2019. V. 15. P. e1900735.
<https://doi.org/10.1002/smll.201900735>
122. *Zhao X., Luo C., Mei Q., Zhang H., Zhang W., Su D., Fu W., Luo Y.* // Anal. Chem. 2020. V. 92. P. 5411–5418.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00141>
123. *Sun S., Yang S., Hu X., Zheng C., Song H., Wang L., Shen Z., Wu Z.-S.* // ACS Sens. 2020. V. 5. P. 3870–3878.
<https://doi.org/10.1021/acssensors.0c01082>
124. *Gao Z., Wu C., Lv S., Wang C., Zhang N., Xiao S., Han Y., Xu H., Zhang Y., Li F., Lyu J., Shen Z.* // Anal. Bioanal. Chem. 2018. V. 410. P. 6819–6826.
<https://doi.org/10.1007/s00216-018-1277-2>

125. Franch O., Han X., Marcussen L.B., Givskov A., Andersen M.B., Godbole A.A., Harmsen C., Nørskov-Lauritsen N., Thomsen J., Pedersen E.S., Wang Y., Shi D., Wejse C., Pødenphant L., Nagaraja V., Bertl J., Stougaard M., Ho Y.-P., Hede M.S., Labouriau R., Knudsen B.R. // *Nanoscale*. 2019. V. 11. P. 587–597. <https://doi.org/10.1039/c8nr07850e>
126. Xu L., Dai Q., Shi Z., Liu X., Gao L., Wang Z., Zhu X., Li Z. // *J. Microbiol. Methods*. 2020. V. 173. P. 105917. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105917>
127. Voidaleski M.F., Gomes R.R., de Azevedo C.M.P.S., de Souza Lima B.J.F., de Fátima Costa F., Bombassaro A., Fornari G., da Silva I.C.L., Andrade L.V., Lusosa B.P.R., Najafzadeh M.J., de Hoog G.S., Vicente V.A. // *J. Fungi*. 2020. V. 6. P. 29. <https://doi.org/10.3390/jof6040290>
128. Qin Y., Zhang C., Liu F., Chen Q., Yang Y., Wang Y., Chen G. // *Harmful Algae*. 2020. V. 97. P. 101857. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101857>
129. Saidur M.R., Abdul Aziz A.R., Basirn W.J. // *Biosens. Bioelectron*. 2017. V. 90. P. 125–139. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.039>
130. Oliveira V., Polónia A.R.M., Clary D.F.R., Huang Y.M., de Voogd N.J., da Rocha U.N., Gomes N.C.M. // *Mol. Ecol. Resour*. 2021. V. 21. P. 110–121. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13248>
131. Yao Y., Nishimura M., Murayama K., Karanobu N., Tojo S., Beppu M., Ishige T., Itoga S., Tsuchida S., Mori M., Takayanagi M., Yokoyama M., Yamataga K., Kishita Y., Okazaki Y., Nomura F., Matsushita K., Tanaka T. // *Sci. Rep*. 2019. V. 9. P. 17411. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53449-y>
132. Sohrab S.S. // *Saudi J. Biol. Sci*. 2020. V. 27. P. 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.08.015>
133. Song S., Wang X., Xu K., Li Q., Ning L., Yang X. // *Anal. Chim. Acta*. 2019. V. 1052. P. 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.11.047>
134. Jeon H., Han S., Kim H., Lee J.B. // *J. Ind. Eng. Chem*. 2019. V. 70. P. 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.10.013>
135. Jeon H., Nam H., Lee J.B. // *Pharmaceutics*. 2019. V. 11. P. 387. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080387>
136. Sun W., Ji W., Hall J.M., Hu Q., Wang C., Beisel C.L., Gu Z. // *Angew. Chem. Int*. 2015. V. 54. P. 12029–12033. <https://doi.org/10.1002/anie.201506030>
137. Оскорбин И.П., Швелёв Г.Ю., Проняева К.А., Степанов А.А., Пышный Д.В., Филипенко М.Л. // *Вопросы биол. мед. фарм. химии*. 2020. Т. 23. С. 3–10. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-12-01>
138. Макарова Ю.А., Фомичева К.А., Осипьянц А.И., Шкурников М.Ю., Покрыщенко А.А., Тоневцкий Е.А., Вечорко В.И. // *Биотехнология*. 2020. Т. 36. № 5. С. 6–12. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-5-6-12>
139. Хафизов К.Ф., Петров В.В., Красовитов К.В., Золкина М.В., Акимкин В.Г. // *Вопросы вирусологии*. 2021. Т. 66. № 1. С. 17–28. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-42>

Rolling Circle Amplification as a Universal Method for Analysis of a Wide Range of Biological Targets

R. R. Garafutdinov*, #, A. R. Sakhabutdinova*, A. R. Gilvanov*, and A. V. Chemeris*

#Phone: +7 (347) 235-60-88; e-mail: garafutdinovr@gmail.com

*Institute of Biochemistry and Genetics, UFRS RAS, prosp. Octyabrya 71, Ufa, 450054 Russia

Detection and quantification of biological targets is an important task that solved using a wide range of analytical methods. Recently, methods based on isothermal amplification of nucleic acids (NA) have been developed. Among them, rolling circle amplification (RCA), which is used for the detection of specific NA and the analysis of other biomolecules, has gained more attention and become a universal platform for the elaboration of highly sensitive techniques and portable diagnostic devices. This review discloses a number of methodological points of RCA-based analysis. It provides data on key molecular agents, describes ways to increase the efficiency and productivity of RCA and briefly characterizes the types of used reporters. The differences in the RCA-based analysis of some biological targets are shown. The examples of the use of various RCA-techniques for solving specific diagnostic problems are given.

Keywords: isothermal amplification, rolling circle amplification, C-probe, circular target, polymerase, analyte, nucleic acids, microRNA, proteins



УДК 576.1+551.7

О ПРОИСХОЖДЕНИИ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОГО СИНТЕЗА БЕЛКОВ

© 2021 г. С. П. Коваленко[#]

Институт микробиологии НАН Беларуси, Беларусь, 220141 Минск, ул. акад. В.Ф. Купревича, 2

Поступила в редакцию 14.12.2020 г.

После доработки 28.12.2020 г.

Принята к публикации 30.12.2020 г.

Каким образом в живых организмах синтезируются белки, имеющие определенную аминокислотную последовательность, перестало быть тайной после расшифровки генетического кода шесть десятилетий назад. Однако происхождение системы генетически кодируемого синтеза белков до сих пор остается предметом гипотез, экспериментально обоснованных лишь частично. На основе обзора работ преимущественно последнего десятилетия автор сформулировал гипотезу, в значительной степени конкретизирующую отдельные этапы формирования системы трансляции и генетического кода. Гипотеза базируется на концепции эволюционной редукции неоднозначности первоначального кода. Отличительные положения гипотезы: 1) появление аптамеров, обогащающих протоклетку редкими каталитически активными аминокислотами, и эволюционное превращение их в АРСазо-подобные рибозимы, что привело к возникновению операционного кода; 2) участие в формировании его и генетического кода сразу большого числа аминокислот (в том числе неканонических); 3) распознавание антикодонной петлей прото-тРНК *всего* кодона мРНК с самого начала кодируемого синтеза белков; 4) коэволюция операционного и генетического кодов, устранившая их первоначальную неоднозначность.

Ключевые слова: белки, пептиды, аминокислоты, аминоацилирование, генетический код, операционный код, РНК, тРНК, мРНК, АРСазы, ПТЦ, рибозимы

DOI: 10.31857/S0132342321060129

ВВЕДЕНИЕ

Белки – основной компонент живой клетки, составляющий около половины ее сухой массы. Их роль в жизнедеятельности разнообразна: белки катализируют биохимические процессы, образуют различные структуры, выполняют двигательную функцию, переносят кислород и молекулы других полезных для организма веществ, защищают его от инфекций, выступают рецепторами и физиологическими регуляторами. Для выполнения каждой из этих функций необходимо, чтобы молекула соответствующего белка имела специфическую для нее последовательность аминокислот. Но копировать свои молекулы белки неспособны.

Ровно 60 лет назад благодаря работам М. Ниренберга [1] и С. Очоа [2] по расшифровке генетического кода стало ясно, как живые организмы синтезируют белки с определенной последовательностью составляющих их аминокислот. Син-

тез белковых молекул по своей сути – раскодирование генетической информации, заключенной в ДНК. Этот процесс называется трансляцией, т.е. переводом информации с нуклеотидного языка на язык аминокислотной последовательности в молекулах белков. Он происходит на рибосомах с помощью небольших молекул тРНК способных нести определенную аминокислоту и узнавать определенную тройку нуклеотидов (кодон) в молекулах мРНК, переносящих информацию с ДНК. Но чтобы нести присущую ей аминокислоту, молекула тРНК должна быть узнана особым ферментом – аминоацил-тРНК-синтетазой (АРСазой), – который и присоединит к ней эту аминокислоту (см., например, работу Х. Хартмана и Т. Смита [3]).

Опознав нужную аминокислоту, АРСаза активирует ее с помощью предварительно захваченной молекулы АТФ, синтезируя аминоациладенилат. На втором этапе АРСаза узнает определенную разновидность тРНК по структуре ее акцепторного стебля (двуспирального концевой участка – “черешка” этой трилистниковой молекулы) и присоединяет аминокислоту к ее 3'-концу сложноэфирной связью (рис. 1а). В редких случаях

Сокращения: АРСаза – аминоацил-тРНК-синтаза; рАРСаза – рибозим, предшественник АРСазы; ПТЦ – пептидилтрансферазный центр.

[#] Автор для связи: (эл. почта: spkovalenko2008@mail.ru).

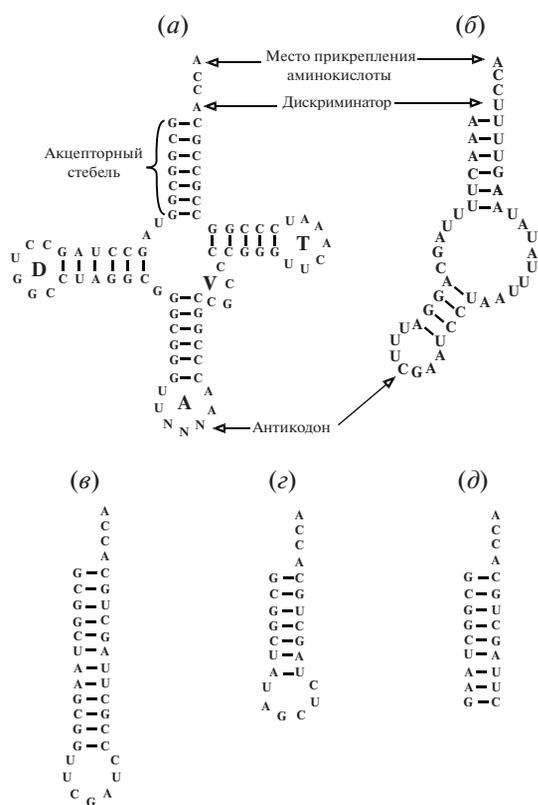


Рис. 1. Вторичные структуры молекул тРНК и их заменителей: (а) – гипотетическая тРНК^{Phe}; (б) – митохондриальная тРНК^{Arg} нематоды *R. culicivora*; (в) – шпилькообразная миниспираль, содержащая акцепторный стебель тРНК^{Ala} и петлю Т; (г) – микроспираль с акцепторным стеблем тРНК^{Ala}; (д) – дуплекс, содержащий акцепторный стебель тРНК^{Ala}. Буквы внутри петель обозначают их названия.

форма молекулы тРНК бывает иной (рис. 1б), но место присоединения аминокислоты остается тем же.

Так действуют АРСазы класса II [3], самые древние. АРСазам класса I недостаточно лишь узнавания акцепторного стебля, они проверяют еще и антикодонную петлю тРНК. Они имеют более сложную структуру и возникли, по-видимому, на более поздней стадии эволюции [3].

“Заряженная” аминокислотой молекула тРНК отправляется на рибосому и находит там свое место на молекуле мРНК за счет комплементарного спаривания своего антикодона с кодоном. Со следующим кодоном молекулы мРНК спаривается другая тРНК, несущая другую аминокислоту. Затем эти аминокислоты в пептидилтрансферазном центре (ПТЦ) рибосомы “сшиваются” именно в том порядке, в каком молекулы их тРНК последовательно (по мере перемещения мРНК внутри рибосомы) располагались на молекуле мРНК. Так генетическая программа, записанная

последовательностью нуклеотидов ДНК, определяет последовательности аминокислот во всех белках, а значит, их структуру и функцию.

В процессе раскодирования генетической информации можно выделить четыре ключевых участника: АРСазы, тРНК, мРНК и ПТЦ. У современных организмов их гораздо больше. Это компоненты рибосомы (три молекулы РНК и 70 белков), ~40 разновидностей молекул тРНК, 20 типов АРСаз (по числу аминокислот) и около десятка вспомогательных белков. Таким образом, для раскодирования генетической информации требуется очень сложная система (система трансляции), состоящая из многих компонентов, причем отсутствие любого из них нарушает ее функционирование. Поэтому ее назвали “неупрощаемой сложностью”.

Многочисленные попытки научного объяснения происхождения генетического кодирования синтеза белков предпринимались, начиная с довольно умозрительной, но поистине пророческой статьи Ф. Крика [4]. Однако только десятилетия усилий многих лабораторий обеспечили базу для создания гипотез ([3, 5–9] и др.), в той или иной степени экспериментально обоснованных.

Генетически кодируемый синтез белков мог возникнуть лишь в довольно развитой самовоспроизводящейся системе. Такой системой считают “мир РНК” в связи с тем, что молекулы РНК способны как к хранению и передаче наследственной информации, так и к выполнению каталитических функций. Формирование генетического кода происходило постепенно. Появление в предбиологической системе каждого нового компонента из перечисленных выше участников кодируемого синтеза белков должно было приносить ей какое-либо селективное преимущество. Иначе этот компонент не мог бы закрепиться эволюцией. Иногда для дальнейшего прогресса появления лишь одного нового компонента бывает недостаточно (а появление сразу двух – маловероятно). В таких случаях помогает экзаптация – привлечение элементов, эволюционно сложившихся для выполнения других функций, не связанных с трансляцией, обычно менее сложных [5, 6]. Например, рибозим, выполняющий какую-то каталитическую функцию, может продолжать свою работу, но часть его копий отвлекается для содействия вновь появившемуся компоненту системы. А при небольшом изменении этой копии в результате мутации бывший рибозим становится более полезным помощником новичку, порой даже утрачивая свою первоначальную функцию. Он становится участником другого процесса, экзаптируется в него. Происходит “переквалификация” биополимеров, этапы которой Ю. Вольф и Е. Куинин [6] назвали дубликацией и субфункционализацией.

В нашем предыдущем обзоре [10] описана сеть физико-химических процессов, приводящая к возникновению протоклеток, которые были только пассивным вместилищем генетического материала (РНК). Он активно эволюционировал, но практически не оказывал влияния на синтез компонентов мембран. Поэтому такие протоклетки еще нельзя было считать организмами, даже примитивными. Был сделан вывод, что превращение их в протоорганизмы, в которых генотип полностью осуществляет формирование фенотипа, могло произойти лишь после возникновения генетически кодируемого синтеза белков – более универсальных катализаторов и основных материалов клеточных структур. Настоящая статья – логическое продолжение предыдущего обзора.

ФОРМИРОВАНИЕ БЕЛОК-СИНТЕЗИРУЮЩЕГО АППАРАТА ПРОТОКЛЕТОК

Исследования абиотических физико-химических процессов обеспечили довольно ясное представление об ассортименте органических веществ на молодой Земле, среди них – формальдегид и муравьиная кислота, жирные кислоты с небольшой длиной молекул (в пределах 8–10 атомов углерода), аминокислоты и гидроксикислоты, все четыре основания РНК и низкомолекулярные сахара. Доказана высокая вероятность абиотического образования нуклеотидов [11–13], гомохиральных олигонуклеотидов [14], полиэфиров, пептидов и депсипептидов [15–17], а также полимолекулярных комплексов – жирнокислотных мицелл и пузырьков [18], пузырьков и трубочек, образуемых липидоподобными пептидами [19, 20].

Популяция олигонуклеотидов состояла из молекул различной длины. Постоянное воздействие гидролиза и УФ-лучей расщепляло их цепочки. Наиболее устойчивыми к этим факторам, а потому доминирующими, были дуплексы, возникающие в процессе репликации, и шпилькообразные молекулы, состоящие из двуспиральных стеблей и соединяющих обе спирали петель из неспаренных нуклеотидов (рис. 1а, 1б). Такие шпильки дали начало многим видам РНК: рибозимам, аптамерам, тРНК, рибосомным РНК (в том числе ПТЦ).

Среди олигонуклеотидов, даже иногда довольно коротких, находились рибозимы, катализирующие разнообразные реакции: аминокислотирование [21, 22], лигирование [23] и фосфорилирование олигонуклеотидов [24], их матричную репликацию [25, 26], синтез пептидов [21, 22], образование гликозидной связи между основаниями РНК и рибозой [27, 28] и др. В зависимости от размеров и особенностей структуры молекул рибозимы могут ускорять спонтанные реакции в разной степени. Например, самый маленький из рибозимов 5'-GUGGC-3', выделенный в лабора-

тории М. Яруса [21], ускоряет спонтанную реакцию аминокислотирования в 25 раз, а 90-мерный рибозим Х. Суги – в 1.6×10^5 раз [29], превосходя даже белковые ферменты. Но большинство рибозимов уступают соответствующим ферментам по активности примерно на 3 порядка [30].

Рибозимный мир не мог бы успешно эволюционировать, если бы не была решена проблема гомохиральности нуклеотидов. Короткие гомохиральные олигонуклеотиды, обладающие рибозимной активностью, могли возникнуть благодаря стереохимически избирательному воздействию монтмориллонита [14] и последующему удлинению. Однако этого было недостаточно для образования более сложной метаболической сети.

Поэтому одним из первых рибозимов (после лигаз и примитивных полимераз, обеспечивающих тиражирование относительно коротких олигонуклеотидов) должен был возникнуть D-рибозим, способный узнавать D-рибозу (скорее всего – в активированной форме) и присоединять ее к основаниям РНК. К сожалению, такой рибозим пока не получен. Но, с одной стороны, получены рибозимы, катализирующие реакцию 5-фосфо-D-рибозо-1-пирофосфата (pRpp) с основаниями РНК [27, 28] *in cis*, т.е. субстрат был присоединен к молекуле рибозима, и ему не требовалось узнавать pRpp среди множества других реагентов. Он узнавал только основания РНК. С другой стороны, в живых организмах существуют олигонуклеотиды (рибосвитчи), узнающие pRpp [31]. Объединение этих двух способностей в одном рибозиме дало бы желаемый результат, что, видимо, и осуществила Природа.

Первым следствием этого кардинального решения проблемы гомохиральности было вытеснение из абиотической среды не только L-нуклеотидов, но также заодно всех ксенонуклеотидов и их полимеров. Ведь катализируемый синтез гораздо эффективнее спонтанного абиотического, производящего все перечисленные формы нуклеотидов. Вторым следствием формирования мира РНК, основанного на D-рибозе, по мнению К. Тамуры [32], могла стать селекция L-аминокислот посредством аминокислотирования тРНК. В его экспериментах D-аминокислоты присоединялись D-рибозимами к молекулам тРНК в 4 раза медленнее, чем L-аминокислоты. Как выяснилось путем стереометрических измерений [33], затруднения были вызваны пространственной ориентацией D-аминокислот в активном центре рибозима. Так, аминокислоты D-рибозимы (далее ААР) при формировании белок-синтезирующего аппарата решили проблему гомохиральности белковых молекул.

Из перечисленных выше четырех ключевых компонентов системы трансляции центральную роль в формировании кодируемого синтеза белков

многие исследователи приписывают тРНК. Ее считают наиболее древней разновидностью РНК.

Современные молекулы тРНК имеют вторичную структуру, похожую на клеверный лист, где “черешок” — акцепторный стебель, а средний “листочек” — антикодонная петля (рис. 1а). Остальные два “листочка” (петли D и T) сближаются, взаимодействуют и образуют “локоть”, место сгиба, поэтому молекула приобретает L-образную форму. Однако и в экспериментах, и даже в природе вполне успешно действуют и более простые молекулы РНК. Например, в митохондриях многих многоклеточных обнаружены тРНК разной формы. Рис. 1б показывает вторичную структуру аргининовой тРНК митохондрий нематоды *Romanomermis culicivorax*. У нее есть акцепторный стебель и стебель с антикодонной петлей, а стебли с петлями D и T отсутствуют. Она имеет форму бумеранга и состоит всего из 44 нт. Причем у того же организма тРНК других аминокислот отличаются от нее. Сериновая тРНК утратила только D-петлю, а лейциновая — T-петлю [34]. И это вовсе не единичный случай.

Еще интереснее опыты П. Шиммеля. Синтезировав более десятка шпилькообразных мини- и микроспиралей из разных тРНК, содержащих акцепторный стебель и петлю T, он продемонстрировал их аминоацилирование соответствующими АРСазами класса II из *Escherichia coli*. Например, установлено, что АРСазе Ala достаточно узнать пару G ~ U акцепторного стебля аланиновой тРНК, чтобы присоединить к ней Ala [35]. Даже часть молекулы тРНК^{Ala} (рис. 1в–1д), содержащая ее акцепторный стебель, безошибочно ацилировалась этой АРСазой [36]. Кроме того, в опытах без использования малой рибосомной субъединицы выяснилось, что такие аминоацилированные шпильки взаимодействуют с ПТЦ большой субъединицы не хуже, чем тРНК [37]. На основании своих работ П. Шиммель сделал выводы, что в акцепторном стебле тРНК существует код, узнаваемый АРСазами (названный операционным кодом), и что синтез белков в прото-ПТЦ сначала был некодируемым (не нуждался в мРНК и малой рибосомной субъединице).

Перечисленные факты заставляют усомниться в том, что клеверообразная форма тРНК была обязательно необходима при формировании системы трансляции, и достаточно было более простых, а значит — более абиотически доступных форм, вроде показанных на рис. 1в и 1г. По крайней мере, так считают многие исследователи [3, 7, 9, 38–40]. Это возможно при некодируемом синтезе белков. Но при кодируемом синтезе, как доказала И. Агмон [41], 3'-концы шпилек, связанных с соседними кодонами мРНК, слишком далеко расходятся друг от друга. Видимо, для кодируемого

синтеза были пригодны лишь изогнутые молекулы шпилек (например, как на рис. 1б).

Происхождение L-образной структуры из первичных шпилек трактуется по-разному. Одни исследователи считают современную форму тРНК продуктом димеризации шпильки ([38, 39, 42, 43] и ссылки в них), другие [9, 40, 44–47] развивают гипотезу слияния трех шпилек из 31 нт с последующими двумя симметричными делециями. Обе группы авторов обосновывают свою точку зрения данными исследований структур тРНК в филогенетическом плане. Вторая группа даже вычислила последовательность первичной тРНК, тРНК^{Pri}, которая на 84% совпала с глициновой тРНК архей [45] (ее вторичная структура представлена на рис. 1а). Авторы заключили, что все остальные тРНК произошли от нее, а первой аминокислотой, включенной в генетический код, был Gly. Но обе стороны все-таки едины во мнении, что в формировании системы трансляции участвовали шпильки, а не L-образные молекулы.

Без участия рибозимов короткие пептиды могли синтезироваться спонтанно через промежуточную стадию депсипептидов [16, 17]. В этих пептидах доминировали Gly и Ala, самые распространенные. Содержание остальных аминокислот уступало им на 1–2 порядка величины. Такие пептиды не могли выполнять других функций, кроме структурных. Если в их состав попадала одна из полярных аминокислот, ее остаток играл роль “головы”, остальная часть цепочки была неполярным “хвостом”. Эти липидоподобные пептиды, как указывалось в предыдущем обзоре [10], служили довольно прочным остовом мембран протоклеток. Их комплексы с жирными кислотами имели большие преимущества над чисто жирнокислотными мембранами. Но абиотический синтез пептидов медленный: он требует нескольких циклов увлажнения/высушивания для превращения депсипептидов в чисто аминокислотные олигомеры. Скорость его намного уступает каталитическому синтезу.

Уже 5-звенный ААР М. Яруса катализирует образование пептидных связей [21]. Он сначала аминоацилирует 3'-конец тетрауклеотида 5'-GCCU-3', частично комплементарного самому себе. Аминокислота (в опытах — Phe) присоединяется к 2'-ОН рибозы. Далее она может мигрировать на 3'-ОН той же рибозы. Рибозим продолжает аминоацилировать ставший свободным 2'-ОН, затем новые молекулы Phe присоединяются уже к NH₂-группам аминокислот, занявших оба гидроксильных рибозы. Так возникают пептидные связи. В опытах обнаружено возникновение пентапептидов.

Однако при действии этого рибозима не происходит перемещение пептидной цепочки на другую молекулу (рис. 2, слева). Синтезируемый пептид удлиняется на аминном конце молекулы,

в то время как пептидилтрансферазная реакция удлиняет карбоксильный конец. Подобные рибозимы вряд ли могли обеспечить строгий порядок присоединения разных аминокислот. Для демонстрации невозможности синтеза длинных пептидов с определенной последовательностью аминокислот с помощью таких ААР мы изобразили на рис. 2 (слева) гипотетическую ситуацию, если бы в рибосоме каталитический центр содержал упомянутый 5-нт (или ему подобный) рибозим.

Допустим, что в проторибосому поступали активированные аминокислоты не в виде свободного аминоксиладенилата, как в опытах М. Яруса и соавт. [21], а в виде входящего в состав прототРНК на ее 3'-конце. Несмотря на постоянное движение молекулы мРНК, обеспечивающее смену в сайте А молекул протот-тРНК, растущая молекула пептида остается неподвижной и прочно связанной с рибозимом. Смещается только место присоединения к ней новой аминокислоты. Оно все больше отдаляется от активного центра рибозима (что, по-видимому, сначала замедляет дальнейший прирост цепи, а позже делает его невозможным). Но при пептидилтрансферазной реакции прирост пептидной цепочки происходит в одном и том же месте, не удаляясь от активного центра (рис. 2, справа).

В современной трансляции молекула тРНК с присоединенной к ней аминокислотой входит в сайт А ПТЦ. На NH_2 -группу ее аминокислоты в результате пептидилтрансферазной реакции перебрасывается пептид с находящейся в сайте Р другой тРНК. Затем это смещение пептидной цепочки компенсируется возвратом ее снова в сайт Р вместе с тРНК и связанным с ней водородными связями кодоном мРНК, а из сайта Р удаляется дезацилированная тРНК. Перемещение тРНК, несущей удлинившийся пептид, из сайта А в сайт Р называется транслокацией. Она может осуществляться при отсутствии малой субъединицы и факторов элонгации [48, 49], что, вероятно, происходило на этапе некодируемого синтеза белков.

В случае с 5-нт ААР (или подобным) невозможна такая же слаженность перемещения мРНК и тРНК (если бы таковые участвовали в этом процессе) с постепенным нарастанием пептидной цепи. Причина, по-видимому, заключается в том, что этот пептид нарастает со своего *N*-конца, в то время как *C*-конец прочно связан с неподвижным рибозимом. В пептидилтрансферазной реакции пептид нарастает с *C*-конца, который постоянно движется. То он переносится на аминокислоту вновь прибывшей в сайт А молекулы тРНК, то возвращается вместе с нею на прежнее место в сайт Р. И эти перемещения согласованы с движением молекулы мРНК.

Механизм пептидилтрансферазной реакции, получивший название “протонный челнок”,

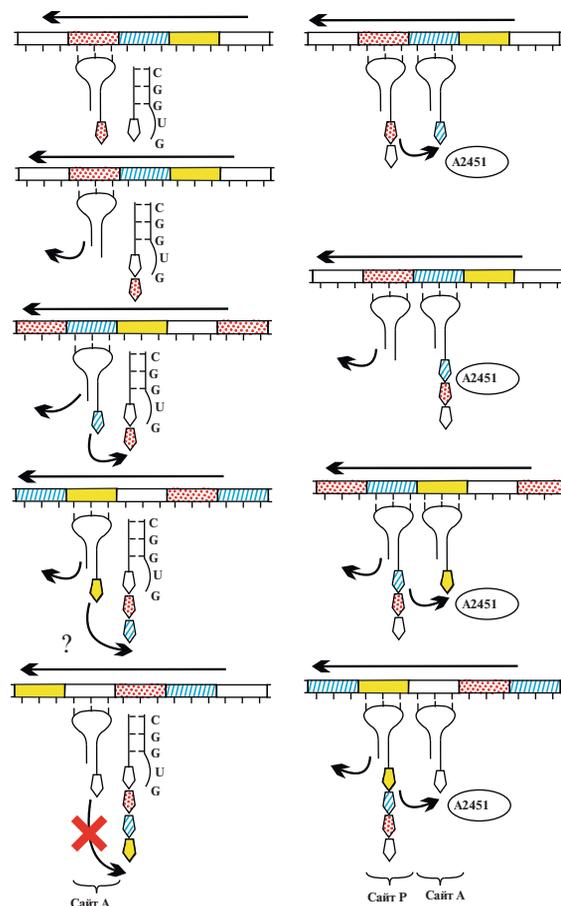


Рис. 2. Схемы удлинения молекул пептида при катализе 5-нт ААР (слева) и ПТЦ рибосомы (справа). Многоцветная лента, движущаяся влево (направление указано длинной стрелкой), обозначает молекулу мРНК, шпильки – молекулы тРНК, цветные пятиугольники – аминокислоты. Расцветка каждой аминокислоты соответствует расцветке соответствующего ей кодона на молекуле мРНК. Активные центры слева представлены нуклеотидами G и U, справа – нуклеотидом A2451. Слева при каждом акте присоединения новой аминокислоты к пептиду его конец все более отдаляется от активного центра. Его вхождение в активный центр возможно лишь при изгибе цепочки. Это происходит все реже по мере ее удлинения. Вопросительный знак означает проблематичность реакции, красный крест – ее невозможность. Схема демонстрирует невозможность кодирования синтеза длинных пептидов рибозимами, подобными 5-нт рибозиму М. Яруса, даже при встраивании их в белок-синтезирующий аппарат протоклеток.

описан в работах [50–52]. Он еще не вполне изучен, но основные участники каталитического процесса выявлены. Главную роль в нем играет аденозин в позиции 2451 большой рибосомной субъединицы. Особенно важна его группа 2'-ОН, отсутствие или блокирование которой ингибирует образование пептидной связи. Считается, что протон атакующей NH_2 -группы аминоксил-тРНК, находящейся в сайте А, через несколько проме-

жуточных участников (в их числе – 2'-ОН A2451) переходит на 3'-О концевое аденозина тРНК в сайте Р. В результате пептидилный остаток отрывается от тРНК сайта Р и присоединяется к лишней протона аминокислоте аминокислоты в сайте А.

Факт активного участия группы 2'-ОН A2451 – убедительный аргумент, почему Природа выбрала именно РНК, а не другие нуклеиновые кислоты для катализа этой важнейшей реакции. Трео-НК и пиранозил-РНК вообще не имеют свободной группы 2'-ОН, т.к. она участвует в фосфатных мостиках, а у арабино-НК 2'-гидроксил повернут в противоположную сторону от активного центра. Так что наиболее вероятные кандидаты на роль заместителя РНК непригодны для катализа пептидилтрансферазной реакции.

A2451 сохраняется на протяжении всей эволюции в ПТЦ всех трех царств, как показало исследование их нуклеотидных последовательностей С. Фариаса с соавт. [53]. Это доказывает ключевую роль A2451 в биосинтезе белков.

Рибозимы с пептидилтрансферазной активностью были получены методом искусственной эволюции, причем их структура оказалась похожей на структуру природного ПТЦ [54]. Позже была синтезирована рибосомная РНК длиной 615 нт [55] – в 5 раз меньше, чем в большой субъединице бактериальных рибосом. Она совмещала способности к взаимодействию с тРНК и к проведению пептидилтрансферазной реакции.

Исследовав большую группу олигонуклеотидов, А. Йонат с соавт. [56] обнаружили, что некоторые из них, близкие по структуре рибонуклеиновым участкам ПТЦ, склонны к спонтанной димеризации. Эти олигонуклеотиды характеризуются локтеобразной вторичной структурой, встречающейся довольно часто у функциональных молекул, в том числе у тРНК. В результате димеризации образуется структура, как бы опоясывающая значительное пустое пространство – “карманы”, служащие для связывания и последующего перемещения ацилированных тРНК. Авторы считают, что прото-ПТЦ образовался именно таким путем.

С. Фариас с соавт. ([53, 57, 58] и ссылки в них) обнаружили, что последовательности некоторых участков молекул тРНК, сложенные в определенном порядке, гомологичны последовательности ПТЦ бактерии *Thermus thermophilus* на 50.53%. В последней из серии их работ [53] установлено, что этот ПТЦ составлен из олигонуклеотидных последовательностей (18–50 нт), которые принадлежали, согласно их расчетам, молекулам глициновой, пролиновой, фенилаланиновой, тирозиновой и глутаминовой прото-тРНК. Авторы заключили, что части молекул этих пяти

предшественниц соответствующих тРНК могли дать начало первичному ПТЦ.

Существование разных тРНК, когда еще не было ни ПТЦ, ни синтеза белков, можно объяснить тем, что они (точнее – их предшественники, прото-тРНК) выполняли другие полезные функции, например, рибозимов или аптамеров. Так считают многие ученые (например, [59, 60] и ссылки в них). Показано [60], что в бескислородной среде РНК (в том числе тРНК) катализируют реакции переноса электронов, служащие предпосылкой для метаболической активности в пребиотических средах.

Позже прото-тРНК были экзапированы в систему трансляции и вместе с прото-ПТЦ и ААР, неспецифически “заряжающими” прото-тРНК (вместо АРСаз) аминокислотами, образовали белок-синтезирующий аппарат протоклеток. Аминоацилированные прото-тРНК, хаотически входя одна за другой в прото-ПТЦ, обеспечили некодируемый синтез пептидов.

ОПЕРАЦИОННЫЙ КОД – ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ ЭТАП

Экспериментально установлено, что рибозимная активность может быть усилена аминокислотами и пептидами, действующими как кофакторы [5, 61, 62]. Молекулы РНК не столь богаты функциональными группами, как аминокислоты. А. Кун и А. Радвани ([63] и ссылки в ней) выбрали из Атласа каталитических сайтов данные об активных центрах разнообразных ферментов (гидролаз, трансфераз, оксидоредуктаз, лиаз, лигаз, изомераз), сосредоточившись на тех случаях, когда каталитическое действие производит одна аминокислота, без помощи других. Они установили, что чаще всего к таким аминокислотам (в убывающем порядке) относятся Glu, Asp, Lys, His, Arg, Tyr и Ser. У них в боковых радикалах содержатся следующие группы: карбоксильная, гидроксильная (ароматическая или алифатическая), аминогруппа и имидазольный цикл. Авторы предполагают, что эти аминокислоты и в составе олигонуклеотида, выполняющего вместо полипептида функции связывания субстрата и его позиционирования, могут катализировать реакцию как кофакторы. Подтверждением их предположения явились работы ([64] и ссылки в ней), показавшие резкое усиление каталитической активности дезоксирибозимов при включении в их структуру химическими методами имидазольных циклов, гуанидо- и аминогрупп.

Еще ранее установлено, что гистидин, по-видимому, за счет своего имидазольного кольца, усиливает активность дезоксирибозима, расщепляющего РНК. Другие аминокислоты никакого действия не оказывали [61]. Многие пептиды, име-

ющие в своем составе Lys и Arg, также повышают активность рибозимов ([62] и ссылки в ней). Каталитической активностью обладают даже короткие пептиды (Val-Asp, Ala-Asp [65], Ala-His [66], Ser-His [67] и His-Phe-Phe [68]), содержащие перечисленные аминокислоты. Для протоклеток особенно высокую ценность представляли именно они. Однако их тогда было на 1–2 порядка величины меньше по сравнению с Gly и Ala, если судить по аминокислотному составу метеоритов [69] и данным экспериментов, моделирующих абиотические условия [70].

Как протоклеткам, так и бесклеточным самореплицирующимся ансамблям рибозимов, изолированным в минеральных порах, для обретения селективного преимущества было необходимо захватывать и удерживать редкие каталитические аминокислоты, не позволяя им быстро покидать свой компартмент вследствие диффузии. Важность захвата и накопления редких аминокислот подчеркивается во многих гипотезах [5–8, 63].

Первым этапом на этом пути могло стать появление олигонуклеотидов, способных специфически захватывать каталитически активные аминокислоты. Такие захватчики, аптамеры, для восьми аминокислот действительно получены (см. работу [71] и ссылки в ней).

Простое депонирование ценных аминокислот большими молекулами РНК, даже обладающими несколькими центрами связывания, довольно дорого обходилось ансамблю, хотя и предоставляло селективное преимущество над другими. Большой выигрыш для него дала эволюция аптамеров в специфические ААР, присоединяющие узнаваемые аминокислоты ковалентной связью к своей (*in cis*) или другой (*in trans*) молекуле. Это можно рассматривать в качестве второго этапа формирования операционного кода. Такое соединение прочнее, а главное – при этом возникают случаи присоединения каталитической аминокислоты именно к тому олигонуклеотиду, рибозимная активность которого данной аминокислотой будет усилена. Этот этап тоже мог принести пользу ансамблю за счет ускорения полезной реакции. Но ценная аминокислота затрачивалась и на ацилирование посторонних молекул.

Третий этап – дальнейшая эволюция каждого из бывших аптамеров в направлении узнавания *только* того рибозима, который нуждается именно в данной аминокислоте. Это резко повысило конкурентоспособность ансамбля. Узнавание, скорее всего, происходило по концевому участку шпильки, куда присоединялась аминокислота [63] (аналогу акцепторного стебля современной тРНК). Был ли этот участок полностью двуспиральным или содержал неспаренные нуклеотиды (вроде теперешних ССА) – вопрос второстепенный. Главное – появилось соответствие между струк-

турой акцепторного стебля и присоединяемой к нему аминокислотой, которое и стало впоследствии операционным кодом. Бывшие аптамеры стали предшественниками АРСаз (рАРСазами), а усиливаемые аминокислотами рибозимы превратились в прото-тРНК благодаря постепенному эволюционному преобразованию.

Здесь важно подчеркнуть, что из-за несовершенства первичных структур, еще не прошедших эволюционную подгонку, могли быть нарушения процесса трансляции. Во-первых, существовали неспецифические ААР, которые могли ацилировать прото-тРНК не свойственной для нее аминокислотой. Это – ошибка белок-синтезирующего аппарата. Во-вторых, могло существовать несколько разновидностей прото-тРНК, имеющих одинаковые акцепторные стебли, но разные петли. Это создает вырожденность только генетического кода. В-третьих, рАРСазы могли узнавать похожие по структуре или физико-химическим свойствам аминокислоты одинаково и присоединять их к одной и той же разновидности прото-тРНК. Результат этого случая – неоднозначность обоих кодов. Анализируя первые результаты расшифровки генетического кода, классики молекулярной биологии, особенно К. Вёзе [72], считали, что первичный генетический код был неоднозначным, а аппарат кодируемого синтеза белков допускал много ошибок. Последующая эволюция должна была постепенно редуцировать эту неоднозначность и уменьшить вред от ошибок трансляции. Однако внимание ученых сосредоточилось лишь на второй части вопроса (“минимизации ошибок” при трансляции и в результате мутационных замен нуклеотидов). Проблему редукции неоднозначности кода лишь недавно осветил М. Барбьери (см. работу [73] и ссылки в ней), развивая эту концепцию в отношении и других биологических кодов (нейронного и языкового). К сожалению, достаточной степени конкретизации концепция все же не получила. Попытка ее развития в этом направлении изложена ниже.

Предшественники тРНК (шпильки) эволюционировали в направлении эффективного встраивания в “карманы” прото-ПТЦ, что ускоряло синтез пептидов. Этот синтез был неcodируемым, но в то время важна была не столько последовательность аминокислот в пептидах, сколько их аминокислотный состав. Пептиды, обогащенные каталитическими аминокислотами, давали преимущество ансамблю или протоклетке.

На этом этапе стало возможным массовое образование протоклеток на основе прежних самореплицирующихся ансамблей РНК, компартиментализованных в порах минералов. Ранее абиогенно синтезируемые пептиды были довольно однообразны по аминокислотному составу. По-

лярных аминокислот было мало, чтобы обеспечить достаточное количество материала для синтеза липидоподобных пептидов, образующих прочные мембраны (об их роли см. наш предыдущий обзор [10]). Обогащение отдельных ансамблей редкими аминокислотами резко изменило ситуацию к лучшему.

Имеются экспериментальные доказательства описанных процессов. Например, описаны рибозимы, способные активировать аминокислоты для аминоацилирования. 114-Мерный рибозим КК13, полученный в лаборатории М. Яруса [74], активирует свободные аминокислоты своей 5'-концевой трифосфатной группой, отщепляя пирогосфат и присоединяя их к оставшемуся фосфату. Как показала С. Мюллер [75], активированную аминокислоту с 5'-конца КК13 другой рибозим может затем перенести на свой 3'-концевой нуклеотид. Тем самым он освобождает КК13, предоставляя ему возможность вновь зарядить 5'-концевой фосфат энергией. Однако КК13 не способен узнавать АТР подобно АРСазам. Зато таким свойством обладают аптамеры, вроде описанного Дж. Шостаком [76] 40-мерного олигонуклеотида. При эволюции могла бы возникнуть гибридная форма, обеспечивающая селективное преимущество. КК13 мог так же фосфорилироваться, например, при реакции с диамидофосфатом [77]. К сожалению, КК13 не обладает специфичностью, активируя любые аминокислоты. Но во многих опытах обнаружена способность ААР узнавать определенные аминокислоты, хотя и не свободные, а активированные. 90-Мерный рибозим 77 М. Яруса узнает Phe-аденилат [78], рибозимы Х. Суги — цианометилловые эфиры Phe [29] или Gln [79].

Х. Суга с соавт. [29] получили 90-мерный рибозим (позже укороченный до 57 нт без потери функций), очень похожий на Phe-АРСаза. Он обладает следующими чертами АРСаз: узнает в качестве субстрата L-Phe; узнает молекулу тРНК по ее дискриминатору и двум цитозинам на 3'-конце; аминоацилирует исключительно 3'-гидроксил концевого аденозина тРНК; способен аминоацилировать не только молекулу тРНК, но и ее часть — миниспираль, содержащую только акцепторный стебель и петлю Т (как в опытах П. Шиммеля).

Специфичность узнавания L-Phe рибозимом достаточно высока: D-Phe узнавался в 5 раз хуже, остальные аминокислоты не узнавались, кроме родственного L-Тур. Отличие этого рибозима от АРСаз состоит только в неспособности активировать аминокислоту.

Х. Суга исследовал расположение в молекуле этого рибозима сайтов узнавания тРНК и Phe. Они оказались буквально рядом: связывающий Phe триплет UUA и триплет GGU, комплементарный дискриминатору и двум неспаренным цито-

зинам. Еще один триплет UUA находится пятью нуклеотидами раньше. Таким образом, концевой аденозин тРНК и активированная аминокислота оказываются в непосредственной близости друг от друга и реагируют.

Все ранее выделенные селекцией *in vitro* АРСазо-подобные рибозимы узнают на 3'-конце тРНК только нуклеотид-дискриминатор и два соседних неспаренных цитозинового нуклеотида, что роднит их с АРСазами класса II. Однако в недавней работе Х. Суги [80] получен рибозим из природного рибосвитча, узнающего определенную тРНК по *антикодону* и петле D. К нему была добавлена рандомическая последовательность, и рибозим селективировали *in vitro* на способность узнавать и присоединять активированный Phe к той же тРНК. Полученный рибозим уже больше похож на АРСазы класса I.

Таким образом, экспериментально доказано, что любая функция АРСаз может быть выполнена рибозимами и аптамерами. Но совместить эти функции в одном рибозиме за два десятилетия исследователям не удалось. Однако у Природы был в распоряжении неизмеримо больший срок для создания рАРСаз, которое положило начало операционному коду.

Современный операционный код очень сложен. Многие авторы лишь для упрощения утверждали, что он определяется только тремя первыми парами нуклеотидов в акцепторном стебле тРНК и что он не вырожден. В реальности на специфичность взаимодействия тРНК с соответствующей ей АРСазой могут влиять любые из семи пар нуклеотидов акцепторного стебля, неспаренный нуклеотид (дискриминатор), а также нуклеотиды, находящиеся вне акцепторного стебля, вроде аденина в позиции 20 (в D-петле). Возможных комбинаций лишь нуклеотидов акцепторного стебля почти на 3 порядка больше числа кодонов в генетическом коде. За миллиарды лет этот потенциал разнообразия реализовался, хотя только частично.

Д. Граур с соавт. [81] исследовали ~5000 тРНК из 21 вида архей и 102 видов бактерий и построили деревья детерминант, содержащихся в этих молекулах и соответствующих каждой аминокислоте, присоединяемой к их акцепторному стеблю. Они показали, что только для немногих аминокислот комплект нуклеотидных детерминант прост у всех изученных видов архей. Остальные аминокислоты в клетках разных видов архей, а тем более бактерий, определяются сложными и разнообразными наборами детерминант.

Высокая вырожденность операционного кода не позволяет разработать такую же четкую таблицу, как для генетического кода. Табл. 1 представляет собой попытку наглядно изобразить операционный код для изученных архей по данным

Таблица 1. Детерминанты операционного кода тРНК архей, узнаваемые АРСазами класса I и класса II

№	Амино-кислота	Узнаваемые нуклеотиды акцепторного стебля тРНК							
		73	72/1	71/2	70/3	69/4	68/5	67/6	66/7
1	His	C							
2	Cys	U					Py/A		
3	Thr	U					Pu/Py		
4	Arg	G			G или U/N				
5	Arg	G			C/N		N/не C		
6	Arg	G	N/A		C/N		N/C		
7	Arg	G	N/G		C/N	G/N	N/C	C/N	N/U
8	Asn	G				N/Pu		N/не G	
9	Asn	G		N/Py		N/Py	N/не A	N/C	
10	Asn	G				N/Pu	N/не C	N/G	He W-C
11	Asp	G		N/Py		N/Py	N/не A	N/G	
12	Lys	G		N/G		N/Py			
13	Lys	G	G/N		C/N	A/N	N/C		
14	Lys	G	G/N		C/N	G/N	N/C	C/N	N/G
15	Ser	G				N/Pu	N/C	N/G	
16	Ser	G				N/Pu	N/не C	N/G	W-C
17	Ser	G		N/Py		N/Py	A/N		
18	Ala	A		U/G					
19	Arg	A	N/G	Py/N		N/Py	N/G или C	C/C	
20	Arg	A	N/G	Py/N		N/Py	N/G	He C/N	
21	Arg	A	N/G	Py/N	W-C	N/Py	N/C	He C/N	
22	Arg	A	N/G	Py/N	U/не A	N/Py	N/C	He C/N	
23	Arg	A	N/G	G/N	N/C		N/Pu	N/A	
24	Arg	A	N/G	G/N	N/C	N/C	N/Py	N/C	
25	Gln	A	N/A или C	Py/N		Pu/N			
26	Gln	A	N/A	Py/N		C/N	N/C	N/C	
27	Glu	A	N/G	G/N	N/U		N/Pu		
28	Glu	A	N/G	G/N	N/Py		N/Py	N/Pu	
29	Glu	A	N/G	G/N	N/U	N/C	N/Py	N/C	
30	Gly	A		N/C	N/Pu				
31	Ile	A	N/A или C	Py/N		C/N	N/C	N/Pu	
32	Ile	A	N/G	Py/N		N/Pu	N/U	A или C/N	
33	Ile	A	N/G	Py/Pu	W-C	N/Py	N/C	He C/A	
34	Ile	A	N/G	Py/Pu	W-C	N/Py	N/C	He C/C	N/C
35	Leu	A	N/G	G/N	N/Pu				
36	Leu	A	N/G	Py/N	N/A	N/Pu	N/G или C	A или C/N	
37	f-Met	A	N/A или C	Py/N		C/N	N/Pu		
38	Met	A	N/G	Py/N		N/Pu	N/A	A или C/N	
39	Met	A	N/G	Py/N	G/не C	N/Py	N/C	He C/N	
40	Met	A	N/G	Py/Pu	C/G	N/Py	N/C	He C/N	
41	Met	A	N/G	G/N	N/C		N/Pu	N/G	
42	Met	A	N/G	G/N	N/Py	N/G	N/Py	N/C	
43	Phe	A		N/C	G /C				
44	Phe	A		N/G	W-C	N/G		C/N	

Таблица 1. Окончание

№	Аминокислота	Узнаваемые нуклеотиды акцепторного стебля тРНК							
		73	72/1	71/2	70/3	69/4	68/5	67/6	66/7
45	<i>Pro</i>	A		N/G	W-C			G/N	
46	<i>Pro</i>	A		N/G	W-C	N/C		C/N	
47	<i>Trp</i>	A	N/G	Py/N		N/Pu		G/N	
48	<i>Trp</i>	A	N/G	Py/N	N/G	N/Pu	N/G или C	A или C	
49	<i>Tyr</i>	A	N/C	G/N					
50	<i>Tyr</i>	A	N/C	Py/N		C/N	N/C	N/C	
51	<i>Val</i>	A	N/G	Py/N		N/Py	N/U		
52	<i>Val</i>	A	N/G	Py/N		N/Py	N/G или C	C/G	
53	<i>Val</i>	A	N/G	Py/Pu	U/A	N/Py	N/C	He C/N	

Примечание: курсивом выделены названия аминокислот, распознаваемых АРСазами класса I; N – любой нуклеотид, Pu – пурин, Py – пиримидин, W-C – комплементарная пара по Уотсону–Крику. Незаполненные ячейки – пары, не принимающие участия в узнавании тРНК АРСазами.

упомянутых авторов [81]. В нее ради упрощения не включены тРНК, встречающиеся лишь у немногих видов, а также такие, которые у разных видов ацилируются разными аминокислотами.

Хотя современный операционный код сложен для большинства аминокислот, наличие нескольких аминокислот с простым набором детерминант подсказывает, что его первоначальный вариант был гораздо проще. Поскольку археи – древнейшая из сохранившихся форм жизни, о первичном операционном коде целесообразно судить именно по ним. Впоследствии он усложнился в процессе эволюции благодаря возникновению новых рАРСаз и узнаваемых ими прото-тРНК, т.е. при редукции неоднозначности. В разделе “Козволюция операционного и генетического кодов” обсуждена роль операционного кода в формировании генетического кода и их совместная эволюция.

ПЕРЕХОД ОТ НЕКОДИРУЕМОГО К КОДИРУЕМОМУ СИНТЕЗУ БЕЛКОВ

Для воссоздания картины появления и эволюции генетически кодируемого синтеза белков прежде всего следует установить, какие аминокислоты были доступны на древней Земле. На основании опытов С. Миллера и его последователей, а также изучения химического состава метеоритов сложилось мнение об ограниченности ассортимента абиотически синтезированных аминокислот. Однако некоторые ученые (работа [82] и ссылки в ней) предостерегали от поспешных выводов, считая, что упомянутые опыты не должны приниматься как неоспоримый критерий абиотичности аминокислот, поскольку не вполне адекватно отражают условия на древней Земле. Кроме того, возможные пути абиотического синтеза аминокислот

еще не полностью изучены. И действительно появляется все больше экспериментальных доказательств, что и другие аминокислоты могли образоваться в условиях, отличающихся от таковых в упомянутых опытах, но не противоречащих возможным на заре жизни. В работах лаборатории Дж. Сазерленда [83] исследованы пути абиотического синтеза 12 аминокислот, входящих в состав белков (кроме Ile, Lys, серосодержащих и ароматических). Видимо, аминокислоты, не содержащиеся в белках, авторов не интересовали. Поэтому они не обратили внимания, что вещество 38, полученное в их экспериментах, в результате реакции Штрекера превращается в 2,4-диаминомасляную кислоту [10]. А она в абиотических условиях могла играть важную роль, входя в состав положительно заряженных пептидов и, возможно, заменяя канонические аминокислоты [3].

В опытах, подобных экспериментам С. Миллера, но с добавлением сероводорода [70], обнаружено 10 белковых аминокислот, в том числе Ile и Met, отсутствующие в продуктах Дж. Сазерленда. His получен из эритрозы [84], хотя и с невысоким выходом. А в опытах, моделирующих условия Космоса [85, 86], использующих в качестве источников углерода полиароматические углеводороды, выявлено 13 аминокислот, включая His, Phe, Trp, Arg и Ile. Поскольку в реакционную смесь не добавляли источников серы, нельзя исключить также возможность образования серосодержащих аминокислот в условиях Космоса. В метеоритах различных классов найдены 15 аминокислот, т.е. все белковые, кроме амидов, Cys, Trp и Arg [69]. Обнаружены также 2,3-диаминопропионовая и 2,4-диаминомасляная кислоты [87].

В свете приведенных данных деление аминокислот на “ранние” и “поздние” выглядит неубедительно. К “поздним” аминокислотам, напри-

мер, еще недавно относили Cys. Но группе М. Поунера [88] удалось найти пребиотически вероятный путь синтеза этой аминокислоты. Поэтому делить аминокислоты целесообразно лишь на более и менее распространенные. Однако благодаря аптамерам, накапливающим концентрацию последних в прото клетках, и это различие в значительной мере стирается. Принять участие в начале кодируемого синтеза пептидов могла любая аминокислота, даже неканоническая. Эту же точку зрения обосновывают А. Нестеров-Мюллер с соавт. [89] в недавней оригинальной, но слишком уж умозрительной гипотезе “слияния четырех независимо сосуществовавших протокодов”. Даже они сами признают, что им неясно, как могли возникнуть эти протокоды.

К моменту начала формирования системы трансляции прото клетки имели мембраны из липидообразных пептидов и жирных кислот. Пептиды синтезировались абиогенно из наиболее распространенных аминокислот с включением иногда более редких. Прочность таких мембран была выше, чем из одних только жирных кислот, но не очень высокой.

П. Шиммель [90] предположил, что первые синтезы пептидов, осуществляемые примитивным ПТЦ, были не кодируемыми. Еще до появления рАРСаз существовали неспецифические ААР. Они присоединяли любую аминокислоту (даже неканоническую) к любому олигонуклеотиду, в том числе к прото-тРНК. Состав синтезируемых пептидов отражал статистику распространенности аминокислот. Появление рАРСаз обеспечило синтез пептидов с более высоким содержанием редких аминокислот. Последовательность их была случайной, но это не мешало лучшему выполнению функций. Поскольку в их состав чаще входили положительно и отрицательно заряженные аминокислоты, сцепление между пептидами было сильнее, и мембраны стали прочнее. Кроме того, эти пептиды могли быть в качестве кофакторов рибозимов эффективнее, чем отдельные аминокислоты. Например, пептиды, в составе которых имеются два остатка Asp или Glu, могли бы усилить активность рибозимов-РНК-полимераз за счет координирования иона магния [6]. Это ускорило бы репликацию олигонуклеотидов в прото клетках, синтезирующих такие пептиды.

В период не кодируемого синтеза, вероятно, интенсивно шла эволюция белок-синтезирующего аппарата прото клеток. Примитивный ПТЦ и шпилькоподобные носители аминокислот подгонялись относительно друг друга. В результате скорость встраивания двух шпилек в карманы ПТЦ и сближения их 3'-концов возрастала, ускоряя синтез. Значит, длина цепочек увеличивалась, их уже можно было называть полипептидами, воз-

можно, даже белками. Поскольку в синтез вовлекались и шпильки, ацилированные неспецифическими ААР, в молекулах полипептидов чередовались неполярные и каталитические полярные аминокислоты. Это позволило полипептидам образовывать складки и спиральные структуры, что могло обеспечить ферментативную активность. М. Хехт [91, 92] показал, что значительная часть рандомических полипептидов проявляет ее и даже способна заменять утраченные ферменты у ауксотрофных мутантов бактерий. Следовательно, не кодируемый белковый синтез приносил хотя бы небольшую пользу прото клеткам и способствовал вытеснению ими других форм, не способных к такому синтезу.

Для начала кодируемого синтеза необходимо было возникновение молекул мРНК. Этот вопрос наиболее подробно рассмотрен в гипотезе Х. Бернарда и У. Тэйта [7]. Авторы взяли на вооружение полузабытые работы прошлого века, однако не утратившие своей актуальности [93, 94]. В дальнейшем изложении будут описаны эти работы вместе с дополнительными аргументами.

В прото клетках реплицировались функциональные молекулы РНК – рибозимы (ПТЦ в их числе), аптамеры и прото-тРНК. Все они сразу же после репликации и разъединения дуплекса образовывали частично двуспиральные структуры, что предотвращало их быстрый гидролиз, в отличие от молекул со случайными нуклеотидными последовательностями, возникающих при синтезе *de novo*. Молекулы мРНК для своего функционирования, наоборот, не должны были обладать сильно выраженной тенденцией к сворачиванию в двуспиральные участки. Значит, они были бы уязвимы для гидролиза и нуждались в более надежном убежище, чем примитивные мембраны, образованные случайно возникающими пептидами и жирными кислотами. Но после формирования системы не кодируемого синтеза пептидов с разнообразным составом аминокислот условия внутри прото клеток стали благоприятными и для несвернутых РНК. Можно предположить также, что молекулы мРНК имели тенденцию к спариванию с одноцепочечными участками (петлями) шпилек, в том числе прото-тРНК. Так оба партнера взаимно защищались от гидролиза и УФ-лучей. Это свойство и определило первую функцию, которую стали выполнять несвернутые цепочки мРНК. Возможно, это было просто комплементарное взаимодействие ее с антикодонными петлями прото-тРНК, облегчающее встраивание последней в прото-ПТЦ. Видимо, мРНК выполняла сначала лишь роль стабилизатора [7], удерживая две молекулы прото-тРНК вместе до образования пептидной связи. Это и подтвердили упомянутые эксперименты. И. Йонак и И. Рыхлик [93] показали, что молекула поли(А) помогает укрепиться в сайте Р ПТЦ молекуле ли-

зиновой тРНК (имеющей антикодон UUU), в то время как поли(C) и поли(U,C) влияния не оказывали. А. Гнирке и К. Нирхаус [94] обнаружили аналогичное действие поли(U) на тРНК^{Phe} (с антикодоном AAA), причем поли(A) в этом случае была неэффективна.

Удачно встроенные в прото-ПТЦ с помощью мРНК шпильки, заряженные аминокислотами, создали условия для первого кодируемого образования пептидной связи. Поскольку при некодируемом синтезе процесс транслокации уже был отлажен, начавшийся кодируемый синтез был продолжен, если со следующим кодоном мРНК успела связаться новая шпилька. И если синтезируемые пептиды были в какой-то степени полезны протоклетке, она получала селективное преимущество перед другими, а молекула мРНК закреплялась эволюцией.

В недавней работе лаборатории З. Бертона [9] описан вероятный сценарий начала кодируемого синтеза белка. По их мнению, существовал большой набор миниспиралей длиной 31 нт. Среди них одна была шпилькой с петлей D, вторая – с петлей T. Первая узнавала кодон с центральным нуклеотидом С благодаря его спариванию с нуклеотидом G, находящимся в ее петле. Вторая узнавала кодон UUU, комплементарный триплету AAA ее петли. Другие миниспиралы, участвующие в процессе, обеспечивали узнавание остальных кодонов первичных мРНК. Но дальнейшее изложение авторами процесса трансляции вызывает вопросы. Во-первых, по их мнению, все миниспиралы были ацилированы только одной аминокислотой – Gly. Причина такой избирательности аминоацилирования авторами не указана. Во-вторых, не объяснены причины последующего вымирания всех миниспиралей, кроме первых двух. Именно из этих выживших миниспиралей (две шпильки с петлей T и одна с петлей D), как считают авторы, сформировалась L-образная молекула тРНК.

Описанный З. Бертоном процесс начала кодируемого синтеза пептидов в целом вполне вероятен. Он совпадает с изложенным выше и в разделе “Операционный код – промежуточный этап”, которое уточняет, что в качестве миниспиралей в нем могли участвовать специфически ацилированные рАРСазами рибозимы, т.е. они были экзапированы в процесс трансляции. Это уточнение отвечает на вопрос о специфичности ацилирования миниспиралей. Только они были ацилированы не глицином, а *разными* аминокислотами, среди которых преобладали хотя и более редкие, зато более ценные аминокислоты. Кроме специфично аминоацилирующих рАРСаз, в ацилировании миниспиралей продолжали также участвовать и неспецифические ААР. А вымирания миниспиралей не требовалось, они эволюци-

онировали вместе с неспецифическими ААР в сторону специфического узнавания друг друга и превращению тем самым в новые прото-тРНК.

Таким образом, практически общепринятая точка зрения, что глицин был первой аминокислотой, вовлеченной в генетически кодируемый синтез пептидов, может быть неверной, как об этом прямо заявил В. Ма [8]. Он считает, что первыми были не простейшие, а именно сложные аминокислоты, которые могли служить кофакторами рибозимов. Похожие взгляды высказывались и другими исследователями [5, 63, 95].

В первых кодируемых синтезах полипептидов могли участвовать все аминокислоты, присоединяемые рАРСазами или даже неспецифичными ААР к шпилькам, *способным встраиваться* в прото-ПТЦ. Участие в них неспецифичных ААР создавало помехи, которые были позже преодолены. Но, с другой стороны, оно было полезным для синтеза длинных полипептидов, о чем будет подробно сказано ниже.

КОЭВОЛЮЦИЯ ОПЕРАЦИОННОГО И ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОДОВ

Итак, рАРСазы создали пул специфически ацилированных аминокислотами шпилек, которые благодаря содействию мРНК стали удобно встраиваться в прото-ПТЦ. Там происходила пептидилтрансферазная реакция, “нанизывающая” аминокислоты одна на другую в том порядке, в котором различные прото-тРНК входили в прото-ПТЦ. А этот порядок определялся образованием комплементарных связей с кодонами молекулы мРНК, т.е. он был генетически кодируемым. Участвовала ли в этом процессе какая-либо молекула РНК, предшественница малой рибосомной субъединицы, – неизвестно. На первом этапе ее участия могло и не потребоваться. Попробуем разобраться, какие шпильки и аминокислоты могли быть первыми участницами этого процесса.

Для конкретности изложения используем тРНКом археи *Pyrococcus furiosus* [81], считающейся видом, наиболее близким к первоначальным формам жизни [44, 45]. Табл. 2 показывает структуру акцепторных стеблей всех ее тРНК. Заметим, что нуклеотидный состав их очень однообразен: содержание пар G : C превышает 95.9%. Всегда ли он был таким или его так сформировала эволюция – не ясно. Скорее всего, он изменился за 4 млрд лет. Поэтому будем отслеживать эту эволюцию пошагово, при замене одного нуклеотида в молекуле на каждом этапе описываемых событий, предположительно происходивших в то далекое время. Рис. 3 отражает эту последовательность эволюционных изменений акцепторных стеблей и антикодонов тРНК различных аминокислот. Таким образом, формирование генетиче-

Таблица 2. Операционный код у археи *Pyrococcus furiosus* (по данным Д. Граура с соавт. [81])

№	Аминокислота	Антикодон(ы)	Нуклеотиды акцепторного стебля тРНК							
			73	72/1	71/2	70/3	69/4	68/5	67/6	66/7
1	His	GUG	C	C/G	G/C	G/C	C/G	C/G	C/G	C/G
2	Cys	GCA	U	C/G	G/C	G/C	C/G	C/G	C/G	U/A
3	Thr	GGU, UGU	U	C/G	G/C	G/C	G/C	G/C	C/G	C/G
4	Thr	CGU	U	C/G	G/C	G/C	C/G	C/G	C/G	U/A
5	Arg	CCU	G	C/G	C/G	U/A	G/C	G/C	C/G	C/G
6	Arg	GCG	G	C/G	G/C	G/C	G/C	G/C	C/G	C/G
7	Arg	CCG, UCG	G	C/G	C/G	C/G	G/C	G/C	C/G	C/G
8	Arg	UCU	G	C/G	C/G	C/G	G/C	G/C	G/C	C/G
9	Asn	GUU	G	C/G	G/C	G/C	C/G	G/C	G/C	C/G
10	Asp	GUC	G	C/G	G/C	G/C	G/C	C/G	C/G	C/G
11	Lys	UUU, CUU	G	C/G	C/G	C/G	G/C	G/C	C/G	C/G
12	Ser	UGA	G	C/G	G/C	G/C	C/G	C/G	C/G	U/A
13	Ser	GCU	G	C/G	G/C	G/C	C/G	G/C	C/G	C/G
14	Ser	CGA, GGA	G	C/G	G/C	G/C	C/G	C/G	C/G	C/G
15	Ala	GGC, CGC, UGC	A	C/G	C/G	U/G	G/C	G/C	C/G	C/G
16	Gln	CUG, UUG	A	U/A	C/G	G/C	G/C	G/C	G/C	C/G
17	Glu	UUC, CUC	A	C/G	G/C	G/C	G/C	G/C	C/G	C/G
18	Gly	UCC, CCC, GCC	A	C/G	G/C	C/G	C/G	A/U	C/G	C/G
19	Ile	GAU	A	C/G	C/G	C/G	G/C	G/C	G/C	C/G
20	Leu	CAA, CAG, GAG, UAA, UAG	A	C/G	G/C	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G
21	<i>f</i> -Met	CAU	A	U/A	C/G	G/C	C/G	C/G	C/G	G/G
22	Met1	CAU	A	C/G	C/G	C/G	G/C	G/C	G/C	C/G
23	Met2	CAU	A	C/G	G/C	G/C	C/G	C/G	C/G	C/G
24	Phe	GAA	A	C/G	C/G	C/G	C/G	G/C	C/G	C/G
25	Pro	CGG, UGG, GGG	A	C/G	C/G	C/G	C/G	G/C	G/C	C/G
26	Trp	CCA	A	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	G/C	C/G
27	Tyr	GUA	A	G/C	G/C	G/C	C/G	G/C	C/G	C/G
28	Val	CAC, UAC, GAC	A	C/G	C/G	C/G	G/C	G/C	G/C	C/G

Примечание: курсивом выделены названия аминокислот, узнаваемых APCазами класса I.

ского кода можно будет увидеть в тесном взаимодействии с эволюцией операционного кода.

Хотя в табл. 2 представлены данные по всем существующим сейчас аминокислотам, необходимо внести небольшие коррективы, учитывая условия ранней Земли. Вероятно, Asn и Gln отсутствовали из-за полного гидролиза цианогрупп их предшественников до Asp и Glu. Вряд ли существовали *f*Met и Trp, абиотический синтез которых не доказан. Так что можно не учитывать их в дальнейшем изложении. Могли существовать и включаться в пептиды также неканонические аминокислоты, о которых сейчас ничего не известно.

Логично предположить, что первичный операционный код был основан на простых наборах де-

терминант. Вполне возможно, что первые рAPCазы узнавали лишь нуклеотид-дискриминатор прототРНК (или, вероятнее, триплет из дискриминатора и двух нуклеотидов С, как APCазо-подобный рибозим X. Суги [29]). Некоторые могли различать, например, еще 2–3 нуклеотидные пары в акцепторном стебле. В то же время, как и рибозим X. Суги, узнающий не только Phe, но и родственный ему Tyr, первые рAPCазы могли не делать различий между родственными аминокислотами (в том числе и теми, которые сейчас отсутствуют в белках). Действительно, в табл. 2 видно, что участки из первых трех пар нуклеотидов в основном сходны у родственных аминокислот: Asp и Glu, Ser и Thr, Lys и Arg, а также почти всех гидрофобных аминокислот.

Аминокислота	Анти-кодон(ы)	Акцепторный стебель				
		73	72/1	71/2	70/3	69/4
His	NUG	C	C/G	G/C	G/C	C/G
Cys	NGU	U	C/G	G/C	G/C	C/G
Ser		U	C/G	G/C	G/C	C/G
Thr		U	C/G	G/C	G/C	C/G
Arg	NCG	G	C/G	C/G	C/G	G/C
Lys		G	C/G	C/G	C/G	G/C
Asp	NUC	A	C/G	G/C	G/C	G/C
Glu		A	C/G	G/C	G/C	G/C
Ala	Не определены					
Gly						
Pro						
Остальные						

Аминокислота	Анти-кодон(ы)	Акцепторный стебель				
		73	72/1	71/2	70/3	69/4
His	NUG	C	C/G	G/C	G/C	C/G
Cys	NGU	U	C/G	G/C	G/C	C/G
Ser		U	C/G	G/C	G/C	C/G
Thr		U	C/G	G/C	G/C	C/G
Arg		G	C/G	C/G	C/G	G/C
Lys	NCG, PyCU	G	C/G	C/G	C/G	G/C
Asp		A	C/G	G/C	G/C	G/C
Glu	NUC	A	C/G	G/C	G/C	G/C
Ala		A	C/G	C/G	C/G	C/G
Gly		A	C/G	C/G	C/G	C/G
Pro	NGC	A	C/G	C/G	C/G	C/G
Остальные		A	C/G	C/G	C/G	C/G

Аминокислота	Анти-кодон(ы)	Акцепторный стебель				
		73	72/1	71/2	70/3	69/4
His	NUG	C	C/G	G/C	G/C	C/G
Cys	NGU	U	C/G	G/C	G/C	C/G
Ser		U	C/G	G/C	G/C	C/G
Thr		U	C/G	G/C	G/C	C/G
Arg	PyCU, NCG	G	C/G	C/G	C/G	G/C
Lys		PyUU	G	C/G	C/G	C/G
Asp	NUC	A	C/G	G/C	G/C	G/C
Glu		A	C/G	G/C	G/C	G/C
Ala	NGC	A	C/G	C/G	C/G	C/G
Gly		A	C/G	C/G	C/G	C/G
Pro		A	C/G	C/G	C/G	C/G
Остальные	NAN	A	C/G	C/G	C/G	G/C

Аминокислота	Анти-кодон(ы)	Акцепторный стебель				
		73	72/1	71/2	70/3	69/4
His	NUG	C	C/G	G/C	G/C	C/G
Cys	NGA, PuCU	U	C/G	G/C	G/C	C/G
Ser		U	C/G	G/C	G/C	C/G
Thr	NGU	U	C/G	G/C	G/C	C/G
Arg	PyCU, NCG	G	C/G	C/G	C/G	G/C
Lys		PyUU	G	C/G	C/G	C/G
Asp	NUC	A	C/G	G/C	G/C	G/C
Glu		A	C/G	G/C	G/C	G/C
Ala	NGC	A	C/G	C/G	C/G	C/G
Gly		NCC	A	C/G	G/C	C/G
Pro	NGG	A	C/G	C/G	C/G	C/G
Остальные	NAN	A	C/G	C/G	C/G	G/C

Аминокислота	Анти-кодон(ы)	Акцепторный стебель				
		73	72/1	71/2	70/3	69/4
His	NUG	C	C/G	G/C	G/C	C/G
Cys	NCA	U	C/G	G/C	G/C	C/G
Ser		NGA, PuCU	G	C/G	G/C	G/C
Thr	NGU	U	C/G	G/C	G/C	C/G
Arg	PyCU, NCG	G	C/G	C/G	C/G	G/C
Lys		PyUU	G	C/G	C/G	C/G
Asp	NUC	A	C/G	G/C	G/C	G/C
Glu		A	C/G	G/C	G/C	G/C
Ala	NGC	A	C/G	C/G	C/G	G/C
Gly	NCC	A	C/G	G/C	C/G	C/G
Pro	NGG	A	C/G	C/G	C/G	C/G
Остальные	NAN	A	C/G	C/G	C/G	G/C

Аминокислота	Анти-кодон(ы)	Акцепторный стебель				
		73	72/1	71/2	70/3	69/4
His	NUG	C	C/G	G/C	G/C	C/G
Cys	NCA	U	C/G	G/C	G/C	C/G
Ser		NGA, PuCU	G	C/G	G/C	G/C
Thr	NGU	U	C/G	G/C	G/C	C/G
Arg	PyCU, NCG	G	C/G	C/G	C/G	G/C
Lys		PyUU	G	C/G	C/G	C/G
Asp	NUC	A	C/G	G/C	G/C	G/C
Glu		A	C/G	G/C	G/C	G/C
Ala	NGC	A	C/G	C/G	U/G	G/C
Gly	NCC	A	C/G	G/C	C/G	C/G
Pro	NGG	A	C/G	C/G	C/G	C/G
Остальные	NAN	A	C/G	C/G	C/G	G/C

Рис. 3. Последовательные этапы коэволюции операционного и генетического кодов. Примечание: курсивом выделены названия аминокислот, распознаваемых АРСазами класса I; N – любой нуклеотид, Pu – пурин, Py – пиримидин. Объяснения – в тексте.

кислот. Подытоживая сказанное, можно предложить следующую гипотезу.

Наибольшей ценностью для протоцитов обладали каталитически активные аминокислоты – полярные. Поэтому эволюционно закрепились рАРСазы, специфически ацилирующие такими аминокислотами рибозимы, ставшие впоследствии прото-тРНК. А поскольку каждому виду рибозимов для усиления каталитической активности необходим был определенный тип аминокислоты, быстро произошло разделение полярных аминокислот на группы по типу каталитической активности. Таких групп аминокислот было

четыре: 1) циклическая положительно заряженная (His), 2) нециклические положительно заряженные (Arg и Lys), 3) отрицательно заряженные (Asp и Glu), 4) незаряженные полярные (Ser, Thr, Cys).

Тогда число специфически присоединяемых к прото-тРНК групп аминокислот было бы равно четырем, хотя число самих аминокислот – восемь. Следовательно, операционный код был неоднозначным. His присоединялся к прото-тРНК с дискриминатором C. Ser, Thr и Cys, составив одну группу, получили дискриминатор U, Arg и Lys – G, а Asp и Glu – A. Такое распределение, вероятно,

было случайным: просто потому, что рибозимы, усилимые соответствующими аминокислотами, обладали именно данными дискриминаторами. Антикодоны в петлях этих рибозимов тоже могли быть иными, чем на рис. 3а. В гипотезе использованы антикодоны из табл. 2 (для аминокислот His, Thr, Arg, Asp и Glu), т.е. реально существующие. Если Ser, Thr и Cys узнавались рАРСазой и присоединялись к одной прото-тРНК, то и антикодон для всех был одинаков. То же самое справедливо для Arg и Lys.

Рассматривая табл. 2, заметим, что у архей *P. furiosus* все сказанное почти точно так и выполняется. Отклонений от гипотезы два: у Ser дискриминатор G, а не U, у Asp – G, а не A, хотя все остальные детерминанты (три пары акцепторного стебля) идентичны у родственных аминокислот. Однако логично предположить, что замена дискриминатора могла произойти на более позднем этапе, как это наблюдается в ряде случаев у современных архей. Например, *Methanopyrus kandleri* и *Haloferax volcanii* присоединяют Arg и Lys к тРНК, обладающим дискриминатором A вместо G, у большинства бактерий тРНК^{Gly} имеют дискриминатор U (вместо A), а тРНК^{Gln} – G (вместо A) [81].

Возможен альтернативный вариант для Asp и Glu: они могли узнаваться рАРСазой, которая бы различала, кроме дискриминатора G, вторую и третью нуклеотидные пары. Эти пары у тРНК обеих аминокислот одинаковы, но отличаются от пар тРНК Arg и Lys, имеющих тот же дискриминатор. Тогда шпильки с дискриминатором A были бы вообще не заняты.

Остальные аминокислоты первоначально (при неcodируемом синтезе, возможно – и на первых этапах кодируемого синтеза) присоединялись только неспецифическими ААР к любым шпилькам РНК, в том числе к шпилькам, обычно специфически ацилируемым полярными аминокислотами. При неcodируемом синтезе больших проблем не возникало, просто синтезируемые пептиды разбавлялись неполярными аминокислотами. Как отмечалось выше, могла быть даже польза от чередования в длинных полипептидах полярных и неполярных аминокислот. Да и при кодируемом синтезе, хотя бы в начальный период, неспецифичность ацилирования шпилек была полезной: благодаря ей не прерывался синтез полипептидной цепочки до полного считывания информации с мРНК, т.к. шпильки заполняли все кодоны мРНК. Ведь пока еще немногочисленные шпильки, ацилируемые рАРСазами, не покрывали всю протяженность мРНК своими антикодонами (для этого требовалось с учетом вобблинга как минимум 16 вариантов специфически аминокислоты ацилируемых прото-тРНК). Длинные полипептиды все же полезнее, чем короткие

обрывки, состоящие только из каталитических аминокислот.

Но если синтезируемый полипептид обладал какой-то полезной активностью, замена нужной аминокислоты на присоединенную неспецифическим ААР (обычно неродственную) приводила к утрате его функции. Если специфическое аминокислотное ацилирование преобладало, и “испорченных” белковых молекул в протоклетке было немного, все равно такая протоклетка проигрывала тем, которые избавились от вмешательства неспецифических ААР. Поэтому эволюция способствовала превращению неспецифических ААР в рАРСазы, специфически узнающие некаталитические аминокислоты (сначала – в виде группы) и акцепторные стебли шпилек, ранее не имевшие рАРСаз. Следовательно, шпильки, специфично ацилируемые рАРСазами, становилось все больше, и они захватывали новые кодоны.

Необходимость распознавать *отдельные* некаталитические аминокислоты, особенно Gly и Pro, которые сильно влияли на конфигурацию пептидной цепочки, появилась рано. Специфические для них (и, возможно, для Ala) рАРСазы, по видимому, отличали эти небольшие молекулы от более крупных с объемными боковыми гидрофобными радикалами. Если Ala, Gly и Pro узнавались одной рАРСазой, то и антикодон был на всех один. То же самое произошло и для аминокислот с объемными гидрофобными боковыми радикалами. Так, специфически аминокислоты ацилируемые прото-тРНК захватили шесть секторов (из 16) таблицы генетического кода, который был неоднозначным, как и операционный. На рис. 3 показана последовательность его формирования и постепенного захвата всех кодонов.

Исходная ситуация представлена на рис. 3а. Полярные аминокислоты образовали четыре группы, каждая из которых специфически присоединяется своей рАРСазой к тому рибозиму, чью каталитическую активность она усиливает. Остальные присоединяются неспецифическими ААР к любым шпилькам.

Рис. 3б показывает изменения в группе диаминокислот. При репликации прото-тРНК возникла мутантная копия с заменой G на U в антикодоне. Обе копии ацилируются той же рАРСазой. За счет мутации произошел первый захват новых кодонов мРНК, но не одной аминокислотой, а группой родственных аминокислот. Другой захват совершен группой из трех аминокислот в результате появления рАРСазы, узнающей Ala, Gly, Pro и одну из существовавших шпилек с дискриминатором A и антикодоном NGC.

На рис. 3в изображено разделение Arg и Lys или аминокислот, заменявших их в абиотический период. В антикодоне копии прото-тРНК, возникшей на предыдущем этапе, C был заменен на U.

Мутация произошла (возможно, не одна и значительно позже) и в рАРСаза, в результате чего один ее потомок стал узнавать только Arg и обе его прото-тРНК, а другой – только Lys и мутантную форму прото-тРНК. Так произошел первый акт редукции неоднозначности кода и заодно захват лизином нового сектора таблицы генетического кода.

Появилась рАРСаза для аминокислот с объемными радикалами. Она присоединяла всю их группу к прото-тРНК с дискриминатором А, что ознаменовало полный переход от неспецифического к специфическому аминоацилированию. Хотя предстоял еще длительный период преобразования неспецифических ААР в специфические рАРСазы, которое обеспечило постепенную редукцию неоднозначности обоих кодов.

Следующий этап был богат изменениями (рис. 3е). Ser и Cys отделились от Thr. Одна за другой произошли две мутации в антикодоне. Обе мутантные прото-тРНК (одна с заменой G на C, другая с заменой U на A) достались Ser и Cys, захватившим сразу два новых сектора. Но один из них был поделен с Arg. Thr сохранил прежний сектор. Акцепторный стебель прото-тРНК^{Thr} мутировал: 4-я пара стала G/C. Значит, потом рАРСаза образовала две различающиеся копии. Одна из них перестала узнавать Thr, но узнавала прежний акцепторный стебель, другая перестала узнавать Ser и Cys, но начала узнавать измененный акцепторный стебель.

Не менее драматичные события произошли в группе Ala, Gly и Pro: они полностью размежевались. В антикодоне несущих их прото-тРНК произошли одна за другой две замены: в одной мутантной форме G был заменен на C, в другой – наоборот, соседний C заменен на G. У первой мутантной прото-тРНК вторая пара акцепторного стебля стала G/C, и ее стал узнавать измененный вариант рАРСазы, продолжающий присоединять к ней Gly. Вторую мутантную по антикодону форму стала узнавать рАРСаза Pro. Прото-тРНК с прежним антикодоном ацилировалась только Ala. Но в ее акцепторном стебле изменилась четвертая пара (нестандартная пара G ~ U, вероятно, возникла позже). Так что рАРСаза тоже должна была измениться и образовать три мутантных копии, чтобы различать эти изменения и более специфично узнавать ранее не различаемые аминокислоты.

Пятый этап привел к обособлению Cys. Замена G на C в антикодоне прото-тРНК позволила Cys захватить правый верхний угол таблицы генетического кода. На рис. 3д указан захват четырех кодонов, хотя в действительности могло быть иначе (лишь два верхних, занимаемых в настоящее время). Но не исключен и изображенный вариант. Позже Cys мог уступить нижние кодоны

своему селеновому аналогу или возникшему биосинтетическим путем триптофану. Cys мог также потерять кодон четвертого столбца, общий с Ser.

Наконец, мутация в антикодоне позволила разделиться Asp и Glu (рис. 3е). Мутантная форма прото-тРНК претерпела еще и мутацию дискриминатора. К ней стала присоединяться только Asp, а за Glu сохранились прежние рАРСаза и прото-тРНК. Это размежевание могло произойти уже после установления кодируемого синтеза белковых АРСаз и с их помощью, тем более что данные аминокислоты сейчас обслуживаются АРСазами разных классов.

Разделяться на классы рАРСазы тоже могли, как АРСазо-подобные рибозимы Х. Суги [29, 80], но, с точки зрения данной гипотезы, это не обязательно.

В результате описанных процессов большинство аминокислот захватили кодоны, занимаемые ими в настоящее время. Не описаны только распределение кодонов между крупными аминокислотами и захват верхнего квадранта третьего столбца таблицы генетического кода. Однако если существовал рибозим, усиливаемый тирозином, то первых специфических рАРСаз могло возникнуть не четыре, а пять, и этот квадрант был бы захвачен сразу.

Вполне вероятно, что мутации в антикодонах прото-тРНК намного опережали изменения рАРСаз, т.е. захват всех кодонов таблицы генетического кода произошел очень быстро. Более того, эти мутации (если они не нарушали рибозимную активность шпильки) могли произойти даже до появления соответствующих рАРСаз, которые с самого начала аминоацилировали 2–3 шпильки с одинаковыми акцепторными стеблями, но разными петлями (об этом говорилось выше). В таком случае сразу же после появления рАРСаз для всех некаталитических аминокислот специфически аминоацилируемыми прото-тРНК могли быть захвачены не шесть, а все 16 секторов таблицы генетического кода.

Размежевание родственных аминокислот шло медленнее, т.к. нужное изменение рАРСаз происходило, вероятно, в результате нескольких мутаций. В тексте и на рис. 3 эти события объединены в один этап лишь для краткости изложения. Поэтому родственные аминокислоты могли длительное время кодироваться в виде единых групп (может быть, даже до появления белковых АРСаз, которые лучше могли различать нюансы структуры родственных аминокислот).

Но и в состоянии еще не полной однозначности операционный и генетический коды обеспечивали синтез белков, обладающих структурой, достаточно успешно сохраняющей выполняемую ими функцию. Из-за включения в каждую позицию белковой молекулы то одной, то другой род-

ственной аминокислоты активности отдельных молекул с одинаковой функцией различались, но в допустимых пределах. Их функция не утрачивалась. А эта вариабельность активности была мотивом, стимулирующим редукцию неоднозначности.

Дальнейшая эволюция кодируемого синтеза белков происходила уже при активном участии белковых ферментов. Они обеспечили и размежевание крупных (или даже *всех?*) аминокислот, и добавление амидов с частичным вытеснением His и Lys, и решение проблем инициации и терминации белкового синтеза, и превращение шпилек в L-образные тРНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленная в данном обзоре гипотеза происхождения системы трансляции базируется на концепции эволюционной редукции неоднозначности первоначального кода. В ней использованы некоторые положения ранее высказанных гипотез [3–9]. Однако они значительно конкретизированы и дополнены.

Эволюционное превращение аптамеров, обогащающих протоклетки и бесклеточные ансамбли каталитическими аминокислотами, в рАРСады положило начало операционному коду. Он был неоднозначным из-за несовершенства узнавания рАРСадами отдельных аминокислот, что обусловило присоединение целой группы родственных аминокислот к одной и той же разновидности прото-тРНК. Выбор этой разновидности определялся ее каталитическими свойствами, усиливаемыми присоединяемыми к ней аминокислотами. Следовательно, причина выбора не связана ни с распространенностью аминокислот, ни с их взаимодействием с петлями шпилек. Значит, операционный код возник как случайность. А поскольку петли этих специфически аминоацилируемых прото-тРНК впоследствии стали антикодонными, то случайностью стал и первичный генетический код, т.е. прав Ф. Крик [4], характеризовавший его как “замороженную случайность”.

С другой стороны, последующее размежевание родственных аминокислот (т.е. редукция неоднозначности обоих кодов) происходило путем замен единичных нуклеотидов в антикодонах прото-тРНК. Хотя сами мутационные замены нуклеотидов носили случайный характер, кодоны родственных аминокислот располагались в таблице генетического кода не произвольно, а упорядоченно, занимая места в соседних секторах или даже в том же секторе, как Asp и Glu, Ile и Met, Leu и Phe. Следовательно, такая упорядоченность, вопреки мнению А. Куна и А. Радвани [63], не противоречит теории “замороженной случайности”, а сосуществует с ней. В то же время

именно эта упорядоченность обусловила явления “минимизации ошибок трансляции” и “минимизации вреда, наносимого мутациями”, лежащие в основе гипотезы [96]. Их следует рассматривать как побочный результат *редукции неоднозначности* обоих кодов.

Последовательность описанных выше этапов условна, многие события могли происходить в другом порядке. Например, не исключено, что крупные неполярные аминокислоты могли раньше начать специфически присоединяться к определенной шпильке. Ведь обогащение ими синтезируемых белков могло давать селективные преимущества протоклеткам благодаря лучшей связи таких белков с липидной частью мембран, что увеличило бы их прочность. Главное – описанная эволюция постепенно редуцировала неоднозначность обоих кодов параллельно и взаимосвязано.

Принципиальное отличие гипотезы от ранее опубликованных состоит в том, что она не нуждается в разделении аминокислот на ранние и поздние и не оставляет ни одну из них в стороне от процесса формирования кодируемого синтеза белков. При наличии неспецифических ААР больше десятка аминокислот, существовавших на заре жизни, не могли ждать своей очереди (согласно чьей-то гипотезе) для включения в кодируемый синтез белков. Любая из них (*и не одна!*) могла быть в числе первых участниц этого процесса.

Второе отличие – гипотеза предусматривает взаимодействие *всего* антикодона прото-тРНК со *всем* кодоном молекулы мРНК (с учетом вобблинга), начиная с самого раннего этапа формирования кода. Она не нуждается в предположениях, что первоначально прото-тРНК узнавали почему-то только второй нуклеотид кодона, а потом, якобы с повышением точности узнавания, “научились” узнавать первый и т.д. (гипотеза “2-1-3” [97]). Во-первых, неясно, что мешало взаимодействию с антикодоном не только второго, но и соседних нуклеотидов кодона. Во-вторых, сомнительно, что комплементарное взаимодействие только между двумя нуклеотидами достаточно прочно, чтобы удерживать тРНК, пока она встроится в карман ПТЦ и дождется там завершения пептидилтрансферазной реакции. Ведь эти процессы не мгновенны, поэтому приход в сайт А аминоацилированной тРНК с некомплементарным антикодоном не приводит сразу же к пептидилтрансферазной реакции. Такая тРНК успеет покинуть сайт до ее начала. Задерживается только тРНК, образующая *несколько* водородных связей с кодоном мРНК.

Избыток связей (при взаимодействии тетраплетов) замедлил бы белковый синтез, поэтому эволюция выбрала триплеты.

Если бы гипотетические рибозимы, усиливаемые полярными аминокислотами, имели другие дискриминаторы и петли, все равно сформировался бы генетически кодируемый синтез белков. Но таблица генетического кода выглядела бы иначе. Описанная здесь схема возникновения и эволюции кода привела к *существующей* таблице. Однако возможны и другие схемы, дающие тот же результат.

В связи с затруднениями, которые испытывает гипотеза мира РНК (проблематичность ее самокопирования и легкая гидролизуемость) в новых работах ([98–101] и ссылки в них) приводятся все более убедительные аргументы, что миру РНК могли предшествовать миры на основе других информационных полимеров. Возможно, скоро будет экспериментально доказано, что некоторые из них легче, чем РНК, без участия ферментов образуются и самовоспроизводятся. Они также могут сочетать генетические и каталитические способности (быть ксенозимами) и обеспечивать не только достаточно точную репликацию своих молекул и, вероятно, транскрипцию с них молекул РНК, но и аминокислотирование и создание пептидной связи, как рибозимы М. Яруса. Но по причинам, указанным в разделе “Формирование белок-синтезирующего аппарата протоклеток”, способность осуществлять пептидилтрансферазную реакцию у них вряд ли будет обнаружена. Не исключено также, что их молекулы (подобно трео-НК и пиранозил-РНК) обладают меньшей гибкостью, чем РНК, и не пригодны для адапторной функции. Эти недостатки и обусловили в ходе эволюции их замену миром РНК, т.к. лишь на ее основе стало возможным формирование генетически кодируемого синтеза белков.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nirenberg M.W., Matthaei J.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1961. V. 47. P. 1588–1602. <https://doi.org/10.1073/pnas.47.10.1588>
2. Lengyel P., Speyer J.F., Ochoa S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1961. V. 47. P. 1936–1942. <https://doi.org/10.1073/pnas.47.12.1936>
3. Hartman H., Smith T.F. // Life (Basel). 2014. V. 4. P. 227–249. <https://doi.org/10.3390/life4020227>
4. Crick F.H.C. // J. Mol. Biol. 1968. V. 38. P. 367–369. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(68\)90392-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(68)90392-6)
5. Szathmáry E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 9916–9920. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.21.9916>
6. Wolf Y.I., Koonin E.V. // Biol. Direct. 2007. V. 2. 14. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-2-14>
7. Bernhardt H.S., Tate W.P. // Biol. Direct. 2010. V. 5. 16. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-5-16>
8. Ma W. // Biol. Direct. 2010. V. 5. 65. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-5-65>
9. Lei L., Burton Z.F. // Life (Basel). 2020. V. 10. 21. <https://doi.org/10.3390/life10030021>
10. Коваленко С.П. // Биоорг. химия. 2020. Т. 46. С. 486–504. [Kovalenko S.P. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 675–691.] <https://doi.org/10.1134/S1068162020040093>
11. Powner M.W., Gerland B., Sutherland J.D. // Nature. 2009. V. 459. P. 239–242. <https://doi.org/10.1038/nature08013>
12. Roberts S.J., Szabla R., Todd Z.R., Stairs S., Bučar D.-K., Šponer J., Sasselov D.D., Powner M.W. // Nat. Commun. 2018. V. 9. 4073. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06374-z>
13. Becker S., Thoma I., Deutsch A., Gehrke T., Mayer P., Zipse H., Carell T. // Science. 2016. V. 352. P. 833–836. <https://doi.org/10.1126/science.aad2808>
14. Jheeta S., Joshi P.C. // Life (Basel). 2014. V. 4. P. 318–330. <https://doi.org/10.3390/life4030318>
15. Chandru K., Mamajanov I., Cleaves H.J., Jia T.Z. // Life (Basel). 2020. V. 10. 6. <https://doi.org/10.3390/life10010006>
16. Forsythe J.G., Petrov A.S., Millar W.C., Yu S.-S., Krishnamurthy R., Grover M.A., Hud N.V., Fernández F.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 114. P. E7652–E7659. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711631114>
17. Frenkel-Pinter M., Haynes J.W., Martin C., Petrov A.S., Burcar B.T., Krishnamurthy R., Hud N.V., Leman L.J., Williams L.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2019. V. 116. P. 16338–16346. <https://doi.org/10.1073/pnas.1904849116>
18. Black R.A., Blosser M.C. // Life (Basel). 2016. V. 6. 33. <https://doi.org/10.3390/life6030033>
19. Vauthey S., Santoso S., Gong H.Y., Watson N., Zhang S.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 5355–5360. <https://doi.org/10.1073/pnas.072089599>
20. Childers W.S., Ni R., Mehta A.K., Lynn D.G. // Curr. Opin. Chem. Biol. 2009. V. 13. P. 652–659. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.09.027>
21. Turk R.M., Chumachenko N.V., Yarus M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 4585–4589. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912895107>
22. Yarus M. // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2011. V. 366. P. 2902–2909. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0139>

23. *Vlassov A.V., Kazakov S.A., Johnston B.H., Landweber L.F.* // *J. Mol. Evol.* 2005. V. 61. P. 264–273. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0362-7>
24. *Moretti J.E., Müller U.F.* // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. P. 4767–4778. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1405>
25. *Wochner A., Attwater J., Coulson A., Holliger P.* // *Science.* 2011. V. 332. P. 209–212. <https://doi.org/10.1126/science.1200752>
26. *Horning D.P., Joyce G.F.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. P. 9786–9791. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610103113>
27. *Lau M.W.L., Unrau P.J.* // *Chem. Biol.* 2009. V. 16. P. 815–825. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.07.005>
28. *Martin L.L., Unrau P.J., Müller U.F.* // *Life (Basel).* 2015. V. 5. P. 247–268. <https://doi.org/10.3390/life5010247>
29. *Saito H., Watanabe K., Suga H.* // *RNA.* 2001. V. 7. P. 1867–1878. <https://doi.org/10.1017/S1355838201013164>
30. *Janzen E., Blanco C., Peng H., Kenchel J., Chen I.A.* // *Chem. Rev.* 2020. V. 120. P. 4879–4897. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00620>
31. *Knappenberger A.J., Reiss C.W., Strobel S.A.* // *eLife.* 2018. V. 7. e36381. <https://doi.org/10.7554/eLife.36381>
32. *Tamura K.* // *J. Mol. Evol.* 2019. V. 87. P. 143–146. <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09897-1>
33. *Ando T., Takahashi S., Tamura K.* // *Nucleic Acids Res.* 2018. V. 46. P. 11144–11152. <https://doi.org/10.1093/nar/gky909>
34. *Jühling T., Duchardt-Ferner E., Bonin S., Wöhnert J., Pütz J., Florentz C., Betat H., Sauter C., Mörl M.* // *Nucl. Acids Res.* 2018. V. 46. P. 9170–9180. <https://doi.org/10.1093/nar/gky593>
35. *Hou Y.M., Schimmel P.* // *Nature.* 1988. V. 333. P. 140–145. <https://doi.org/10.1038/333140a0>
36. *Francklyn C., Schimmel P.* // *Nature.* 1989. V. 337. P. 478–481. <https://doi.org/10.1038/337478a0>
37. *Sardesai N.Y., Green R., Schimmel P.* // *Biochemistry.* 1999. V. 38. P. 12080–12088. <https://doi.org/10.1021/bi991126f>
38. *Di Giulio M.* // *J. Theor. Biol.* 2019. V. 480. P. 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2019.07.020>
39. *Di Giulio M.* // *J. Mol. Evol.* 2020. V. 88. P. 228–233. <https://doi.org/10.1007/s00239-020-09927-3>
40. *Root-Bernstein R., Kim Y., Sanjay A., Burton Z.F.* // *Transcription.* 2016. V. 7. P. 153–163. <https://doi.org/10.1080/21541264.2016.1235527>
41. *Agmon I.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. 4021. <https://doi.org/10.3390/ijms19124021>
42. *Tanaka T., Kikuchi Y.* // *Viva Orig.* 2001. V. 29. P. 134–142.
43. *Tamura K.* // *Life (Basel).* 2015. V. 5. P. 1687–1699. <https://doi.org/10.3390/life5041687>
44. *Pak D., Root-Bernstein R., Burton Z.F.* // *Transcription.* 2017. V. 8. P. 205–219. <https://doi.org/10.1080/21541264.2017.1318811>
45. *Pak D., Du N., Kim Y., Sun Y., Burton Z.F.* // *Transcription.* 2018. V. 9. P. 137–151. <https://doi.org/10.1080/21541264.2018.1429837>
46. *Kim Y., Opron K., Burton Z.F.* // *Life (Basel).* 2019. V. 9. 37. <https://doi.org/10.3390/life9020037>
47. *Burton Z.F.* // *J. Mol. Evol.* 2020. V. 88. P. 234–242. <https://doi.org/10.1007/s00239-020-09928-2>
48. *Monro R.E.* // *Nature.* 1969. V. 223. P. 903–905. <https://doi.org/10.1038/223903a0>
49. *Pestka S.* // *J. Biol. Chem.* 1969. V. 244. P. 1533–1539. <https://doi.org/10.1073/pnas.64.2.709>
50. *Tamura K.* // *J. Biosci.* 2011. V. 36. P. 921–928. <https://doi.org/10.1007/s12038-011-9158-2>
51. *Świderek K., Marti S., Tuñón I., Moliner V., Bertran J.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2015. V. 137. P. 12024–12034. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b05916>
52. *Zhang X., Jiang Y., Mao Q., Tan H., Li X., Chen G., Jia Z.* // *Molecules.* 2017. V. 22. 571. <https://doi.org/10.3390/molecules22040571>
53. *Prosdocimi F., Zamudio G.S., Palacios-Pérez M., Farias S.T., José M.V.* // *Life (Basel).* 2020. V. 10. 134. <https://doi.org/10.3390/life10080134>
54. *Zhang B., Cech T.R.* // *Chem. Biol.* 1998. V. 5. P. 539–553. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(98\)90113-2](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(98)90113-2)
55. *Hsiao C., Lenz T.K., Peters J.K., Fang P.-Y., Schneider D.M., Anderson E.J., Preeprem T., Bowman J.C., O'Neill E.B., Lie L., Athavale S.S., Gossett J.J., Trippe C., Murray J., Petrov A.S., Wartell R.M., Harvey S.C., Hud N.V., Williams L.D.* // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. P. 3373–3385. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt023>
56. *Davidovich C., Belousoff M., Bashan A., Yonath A.* // *Res. Microbiol.* 2009. V. 160. P. 487–492. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.07.004>
57. *Farias S.T., Rego T.G., Jose M.V.* // *FEBS Open Bio.* 2014. V. 4. P. 175–178. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2014.01.010>
58. *Farias S.T., Jose M.V.* // *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 2020. V. 153. 28e34. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2020.02.006>
59. *Bhattacharyya S., Varshney U.* // *RNA Biol.* 2016. V. 13. P. 810–819. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1195943>
60. *Hsiao C., Chou I.C., Okafor C.D., Bowman J.C., O'Neill E.B., Athavale S.S., Petrov A.S., Hud N.V., Wartell R.M., Harvey S.C., Williams L.D.* // *Nat. Chem.* 2013. V. 5. P. 525–528. <https://doi.org/10.1038/nchem.1649>
61. *Roth A., Breaker R.R.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 6027–6031. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6027>
62. *Robertson M.P., Knudsen S.M., Ellington A.D.* // *RNA.* 2004. V. 10. P. 114–127. <https://doi.org/10.1261/rna.5900204>
63. *Kun Á., Radványi A.* // *BioSystems.* 2018. V. 164. P. 217–225. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2017.10.006>

64. Wang Y., Liu E., Lam C.H., Perrin D.M. // *Chem. Sci.* 2018. V. 9. P. 1813–1821.
<https://doi.org/10.1039/c7sc04491g>
65. Shimizu M. // *J. Biochem.* 1995. V. 117. P. 23–26.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124715>
66. Shimizu M. // *J. Biochem.* 1996. V. 119. P. 832–834.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021318>
67. Wieczorek R., Adamala K., Gasperi T., Politelli F., Stano P. // *Life (Basel)*. 2017. V. 7. 19.
<https://doi.org/10.3390/life7020019>
68. Kurbasic M., Garcia A.M., Viada S., Marchesan S. // *Molecules*. 2021. V. 26. 173.
<https://doi.org/10.3390/molecules26010173>
69. Cobb A.K., Pudritz R.E. // *Astrophys. J.* 2014. V. 783. 140.
<https://doi.org/10.1088/0004-637X/783/2/140>
70. Parker E.T., Cleaves H.J., Dworkin J.P., Glavin D.P., Callahan M., Aubrey A., Lazcano A., Bada J.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. P. 5526–5531.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1019191108>
71. Yarus M., Widmann J.J., Knight R. // *J. Mol. Evol.* 2009. V. 69. P. 406–429.
<https://doi.org/10.1007/s00239-009-9270-1>
72. Woese C.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1965. V. 54. P. 71–75.
<https://doi.org/10.1073/pnas.54.6.1546>
73. Barbieri M. // *BioSystems*. 2019. V. 185. 104024.
<https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2019.104024>
74. Kumar R.K., Yarus M. // *Biochemistry*. 2001. V. 40. P. 6998–7004.
<https://doi.org/doi:10.1021/bi010710x>
75. Xu J., Appel B., Balke D., Wichert C., Müller S. // *ChemBioChem*. 2014. V. 15. P. 1200–1209.
<https://doi.org/10.1002/cbic.201300741>
76. Huang Z., Szostak J. // *RNA*. 2003. V. 9. P. 1456–1463.
<https://doi.org/10.1261/rna.5990203>
77. Gibard C., Bhowmik S., Karki M., Kim E.-K., Krishnamurthy R. // *Nat. Chem.* 2018. V. 10. P. 212–217.
<https://doi.org/10.1038/NCHEM.2878>
78. Illangasekare M., Yarus M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. P. 5470–5475.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5470>
79. Lee N., Suga H. // *RNA*. 2001. V. 7. P. 1043–1051.
<https://doi.org/10.1017/S1355838201010457>
80. Ishida S., Terasaka N., Katoh T., Suga H. // *Nat. Chem. Biol.* 2020. V. 16. P. 702–709.
<https://doi.org/10.1038/s41589-020-0500-6>
81. Shaul S., Berel D., Benjamini Y., Graur D. // *RNA*. 2010. V. 16. P. 141–153.
<https://doi.org/10.1261/rna.1745910>
82. Rodin A.S., Szathmáry E., Rodin S.N. // *Biol. Direct*. 2009. V. 4. 4.
<https://doi.org/10.1186/1745-6150-4-4>
83. Patel B.H., Percivalle C., Ritson D.J., Duffy C.D., Sutherland J.D. // *Nat. Chem.* 2015. V. 7. P. 301–307.
<https://doi.org/10.1038/NCHEM.2202>
84. Shen C., Yang L., Miller S.L., Oro J. // *J. Mol. Evol.* 1990. V. 31. P. 167–174.
<https://doi.org/10.1007/BF02109492>
85. Sandford S.A., Nuevo M., Bera P.P., Lee T.J. // *Chem. Rev.* 2020. V. 120. P. 4616–4659.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00560>
86. Chen Y.-J., Nuevo M., Yih T.-S., Ip W.-H., Fung H.-S., Cheng C.-Y., Tsai H.-R., Wu C.-Y.R. // *Mon. Not. R. Astron. Soc.* 2008. V. 384. P. 605–610.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2966.2007.12687.x>
87. Meierhenrich U.J., Muñoz Caro G.M., Bredehöft J.H., Jessberger E.K., Thiemann W.H.-P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. P. 9182–9186.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0403043101>
88. Foden C.S., Islam S., Fernández-García C., Maugeri L., Sheppard T.D., Powner M.W. // *Science*. 2020. V. 370. P. 865–869.
<https://doi.org/10.1126/science.abd5680>
89. Nesterov-Mueller A., Popov R., Seligmann H. // *Life (Basel)*. 2021. V. 11. 4.
<https://doi.org/10.3390/life11010004>
90. Schimmel P., Henderson B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91. P. 11283–11286.
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.24.11283>
91. Patel S.C., Bradley L.H., Jinadasa S.P., Hecht M.H. // *Protein Sci.* 2009. V. 18. P. 1388–1400.
<https://doi.org/10.1002/pro.147>
92. Fisher M.A., McKinley K.L., Bradley L.H., Viola S.R., Hecht M.H. // *PLoS One*. 2011. V. 6. e15364.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015364>
93. Jonák J., Rychlík I. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1970. V. 199. P. 421–424.
[https://doi.org/10.1016/0005-2787\(70\)90084-5](https://doi.org/10.1016/0005-2787(70)90084-5)
94. Gnirke A., Nierhaus K.H. // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. P. 14506–14514.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)66898-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)66898-X)
95. Belousoff M.J., Davidovich C., Zimmerman E., Caspi Y., Wekselman I., Rozenszajn L., Shapira T., Sade-Falk O., Taha L., Bashan A., Weiss M.S., Yonath A. // *Biochem. Soc. Trans.* 2010. V. 38. P. 422–427.
<https://doi.org/10.1042/bst0380422>
96. Massey S.E. // *J. Mol. Evol.* 2006. V. 62. P. 809–810.
<https://doi.org/10.3390/life5021301>
97. Freeland S.J., Wu T., Keulmann N. // *Orig. Life Evol. Biosph.* 2003. V. 33. P. 457–477.
<https://doi.org/10.1023/A:1025771327614>
98. Schuster G.B., Cafferty B.J., Karunakaran S.C., Hud N.V. // *J. Am. Chem. Soc.* 2021. V. 143. P. 9279–9296.
<https://doi.org/10.1021/jacs.0c13081>
99. Anderson B.A., Fauché K., Karunakaran S.C., Yera-bolu J.R., Hud N.V., Krishnamurthy R. // *Chem. Eur. J.* 2021. V. 27. P. 4033–4042.
<https://doi.org/10.1002/chem.202004397>
100. Fialho D.M., Karunakaran S.C., Greeson K.W., Martinez I., Schuster G.B., Krishnamurthy R., Hud N.V. // *J. Amer. Chem. Soc.* 2021. V. 143. P. 13525–13537.
<https://doi.org/10.1021/jacs.1c02287>
101. Wang Y., Wang Y., Song D., Sun X., Zhang Z., Li X., Li Z., Yu H. // *J. Am. Chem. Soc.* 2021. V. 143. P. 8154–8163.
<https://doi.org/10.1021/jacs.1c02895>

On the Origin of Genetically Coded Protein Synthesis

S. P. Kovalenko[#]

[#]*E-mail: spkovalenko2008@mail.ru*

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, ul. Surganova 52, Minsk, 220040 Republic of Belarus

How proteins with a specific amino acid sequence synthesized in living organisms is no longer a mystery after the deciphering of the genetic code six decades ago. However, the origin of the system of genetically coded protein synthesis is still the subject of hypotheses, experimentally justified only partially. Based on the review of works mainly of the last decade, the author formulated a hypothesis that largely concretizes certain stages of the formation of the translation system and the genetic code. The hypothesis based on the concept of evolutionary reduction of the ambiguity of the primordial code. The distinctive positions of the hypothesis: (i) the emergence of aptamers, enriching the protocell by the rare catalytically active amino acids, and their evolutionary transformation in aaRS-like ribozymes which resulted in the operational code, (ii) the participation at once of large number of amino acids (including non-canonical) in the formation of operational and genetic codes, (iii) the recognition of the whole codon of mRNA by the anticodon loop of proto-tRNA from the very beginning of encoded protein synthesis, (iv) the co-evolution of the operational and genetic codes that eliminated their initial ambiguity.

Keywords: proteins, peptides, amino acids, aminoacylation, genetic code, operational code, RNA, tRNA, mRNA, aaRSs, PTC, ribozymes



УДК 577.112.083.3

ПОИСК ПЕПТИДОВ, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩИХСЯ С КОРЕГУЛЯТОРНОЙ МИШЕНЬЮ V7-2

© 2021 г. Е. А. Колосова*, **, #, О. Е. Викторина*, А. И. Шаповал**, Д. Н. Щербаков*. **

*ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора, Россия, 630559 Новосибирская обл., р.п. Кольцово

**ФГБОУ ВО “Алтайский государственный университет”, Российско-американский противораковый центр, Россия, 656049 Барнаул, просп. Ленина, 61

Поступила в редакцию 02.02.2021 г.

После доработки 20.02.2021 г.

Принята к публикации 21.02.2021 г.

Взаимодействие лигандов V7-1/V7-2 с рецепторами CD28/CTLA-4 играет ключевую роль в регуляции иммунного ответа. Целью настоящего исследования был поиск и изучение пептидов, взаимодействующих с корегуляторной молекулой V7-2 человека. В ходе работы проведены три цикла аффинной селекции и отобраны индивидуальные фаговые клоны, в состав которых входят пептиды с разной степенью взаимодействия с белком V7-2. В результате секвенирования ДНК выбранных фагов получены нуклеотидные последовательности, кодирующие пептиды, специфически связывающиеся с V7-2. Выявленные пептиды могут быть использованы в качестве основы для разработки иммунотерапевтических препаратов для регуляции иммунного ответа при лечении онкологических заболеваний.

Ключевые слова: фаговый дисплей, семейство V7, CD86, онкологические заболевания, иммунотерапия

DOI: 10.31857/S0132342321060117

ВВЕДЕНИЕ

V7 – важная корегуляторная молекула, которая экспрессируется на поверхности антиген-презентирующих клеток (АПК) человека, представлена двумя формами: V7-1 и V7-2. Рецепторы лигандов V7 на поверхности Т-клеток – молекулы CD28/CTLA-4. Взаимодействие V7-1 или V7-2 с CD28 способствует активации Т-клеток, пролиферации и секреции цитокинов. Взаимодействие V7-1 или V7-2 с CTLA-4 снижает активацию и пролиферацию Т-лимфоцитов [1]. Блокада ко-стимуляторных путей регуляции иммунного ответа может обеспечить эффективную терапию аутоиммунных заболеваний и предотвратить отторжение трансплантатов. Роль блокаторов могут выполнять пептиды, характеризующиеся высокой специфичностью взаимодействия с мишенью и низкой молекулярной массой, что может снижать количество побочных эффектов [2].

Фаговые пептидные библиотеки – один из источников поиска пептидов, способных избирательно взаимодействовать с белками, липидами и углеводами [3]. Для получения пептидов, специ-

фически взаимодействующих с молекулярной мишенью, проводится несколько циклов аффинной селекции бактериофагов из фаговых пептидных библиотек с последующим секвенированием участка ДНК, кодирующего чужеродный пептид.

Цель работы – поиск и изучение пептидов, специфически взаимодействующих с корегуляторной молекулой V7-2, с использованием фаговых пептидных библиотек.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Отбор бактериофагов, взаимодействующих с корегуляторной молекулой V7-2. Аффинная селекция подразумевает отбор из фаговой пептидной библиотеки бактериофагов, несущих на своей поверхности чужеродные пептиды, специфически взаимодействующие с мишенью – корегуляторной молекулой V7-2, содержащей Fc-участок IgG1 человека. Селекция осуществляется за счет образования комплекса бактериофага, белка V7-2 и магнитной частицы, на поверхности которой находится белок G, специфически взаимодействующий с Fc-участком IgG1 человека. Элюированную гетерогенную смесь бактериофагов амплифицируют в бактериальной культуре и используют для следующего цикла селекции.

Сокращения: МЧ – магнитные частицы, оцДНК – одноцепочечная ДНК.

Автор для связи: (тел.: +7 (3852) 298-142; эл. почта: kurchanovaea@gmail.com).

Таблица 1. Титры образцов фаговых суспензий после различных циклов аффинной селекции против рекомбинантного белка В7-2

Образец	Титр, БОЕ/мл		
	1-й цикл	2-й цикл	3-й цикл
Элюат	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁵
Амплификат	10 ¹⁰	10 ¹¹	10 ⁹

Таблица 2. Выявленные последовательности и встречаемость пептидов, взаимодействующих с рекомбинантным белком В7-2

Номер фагового клона	Аминокислотная последовательность	Встречаемость, %
1	CLARCLGRC	66.7
2	CPSASSQLTC	11.1
6	АНIEVVSP	11.1
8	QMPALMQQ	11.1

В работе использовали фаговую пептидную библиотеку GerLab на основе нитчатого бактериофага fd. Для отбора бактериофагов, взаимодействующих с рекомбинантным белком В7-2 человека (SinoBiological, КНР), были проведены три цикла аффинной селекции. Для отслеживания обогащения популяции фагов после каждого цикла определяли биологический титр бактериофагов, элюированных с магнитных частиц, и после их амплификации в бактериальной культуре по методу Грация [4]. После 2-го цикла наблюдалось увеличение титра бактериофагов в элюате. После 3-го цикла увеличения титра не происходило, что, возможно, свидетельствует о достижении предела насыщения популяции фагов. Изменение титра бактериофагов на протяжении трех циклов аффинной селекции, в результате которых были получены бактериофаги, обладающие наибольшим сродством к мишени В7-2, отражено в табл. 1.

С чашек Петри, содержащих единичные бляшки фагового элюата 3-го цикла, отобрали девять клонов для выделения ДНК и последующего секвенирования участка ДНК, кодирующего чужеродный пептид.

Идентификация аминокислотных последовательностей пептидов. Секвенированные участки ДНК, кодирующие чужеродные пептиды девяти клонов, анализировали с помощью программы BioEdit 7.2 и далее переводили их в аминокислотные последовательности. Аминокислотная последовательность CLAACLGAC представлена в 66.7% анализированных фаговых клонов, в то время как последовательности CPSASSGLTC,

QMPALMQQ и АНIGVVSP – в 11.1% клонов (табл. 2).

В дальнейшей работе использовали клоны фагов № 1, 2, 6 и 8, которые несут на своей поверхности четыре уникальных чужеродных пептида, взаимодействующих с белком В7-2.

Иммунохимические свойства отобранных пептидов. Иммунохимические свойства пептидов четырех фаговых клонов анализировали методами иммуоблоттинга и иммуоферментного анализа.

Результаты иммуоблоттинга представлены на рис. 1. Наибольшее значение оптической плотности, равное 50, наблюдалось у клона № 1 (пептид CLARCLGRC). У клонов № 6 (пептид АНIEVVSP) и № 8 (пептид QMPALMQQ) оптическая плотность была ниже и составила 44 и 23 соответственно, что свидетельствует о меньшей аффинности этих пептидов к рекомбинантному белку В7-2. У клона № 2 (пептид CPSASSQLTC) оптическая плотность составила –10, следовательно, данный пептид не связывается с рекомбинантным белком В7-2. Значения оптической плотности у положительного и отрицательного контролей составили 173 и 0 соответственно.

Результаты ИФА представлены на рис. 2. Наибольшие значения оптической плотности наблюдались у клонов № 1 (пептид CLARCLGRC) и № 6 (пептид АНIEVVSP): 0.83 ± 0.02 и 0.86 ± 0.03 соответственно, что подтверждает высокое сродство данных пептидов к рекомбинантному белку В7-2. ИФА с клонами № 2 и 4 показал низкое специфическое взаимодействие с мишенью В7-2 (0.06 ± 0.00 и 0.09 ± 0.01 соответственно).

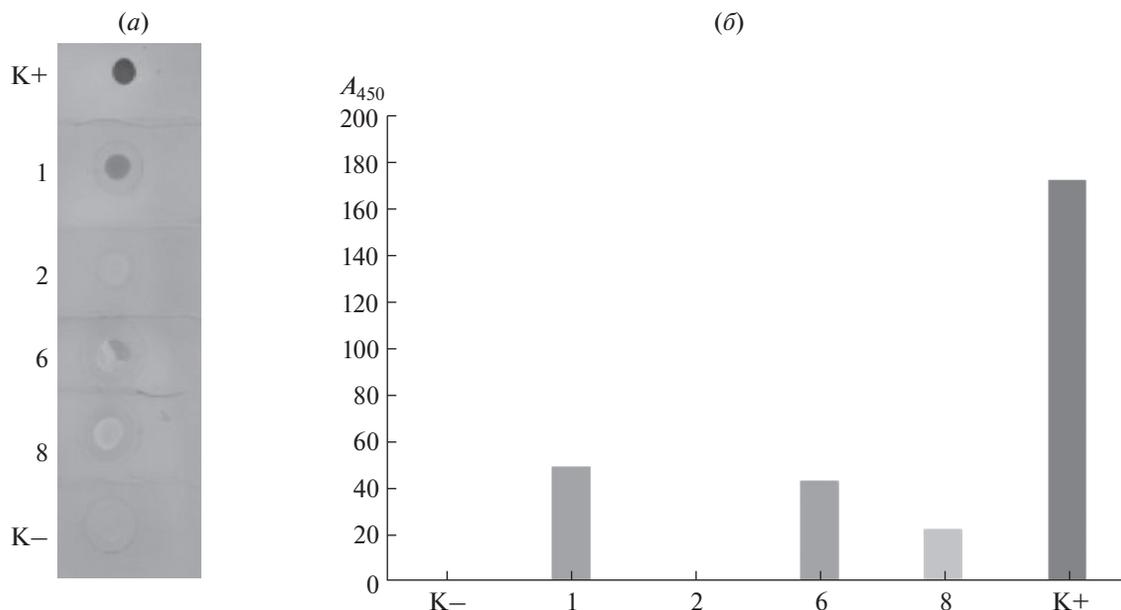


Рис. 1. Иммуноблот-гибридизация исследуемых фаговых клонов № 1, 2, 6 и 8 с рекомбинантным белком В7-2. (а) – Мембрана дот-блота; (б) – гистограмма значений оптической плотности. Положительный контроль (К+) – рекомбинантный белок В7-2, отрицательный контроль (К-) – бактериофаг fd, не содержащий чужеродную вставку.

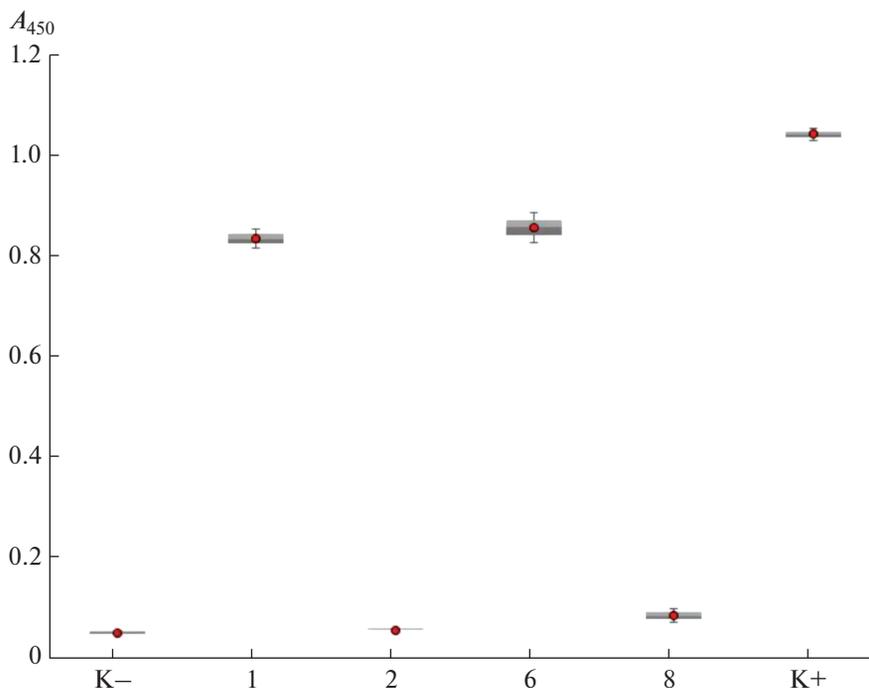


Рис. 2. Иммуноферментный анализ фаговых клонов № 1, 2, 6 и 8 с рекомбинантным белком В7-2. Положительный контроль (К+) – рекомбинантный белок В7-2, отрицательный контроль (К-) – бактериофаг fd, не содержащий чужеродную вставку.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Рекомбинантный белок В7-2. В работе использовали коммерческий рекомбинантный белок, состоящий из внеклеточного домена (Met1-His239) белка В7-2 человека и Fc-участка IgG1 че-

ловека (Pro100-Lys330) с 6His-меткой на C-конце (Sino Biological, КНР).

Фаговая пептидная библиотека. Использованная в данной работе фаговая пептидная библиотека GerLab на основе нитчатого бактериофага fd

была получена из лаборатории профессора Дж.М. Гершони [5]. Она состояла из смеси восьми фаговых пептидных библиотек, изготовленных на основе фагмидного вектора типа р88 и экспонирующих в составе главного поверхностного белка рVIII чужеродные рандомизированные пептиды длиной 6, 8, 10, 12 а.о., а также пептиды, замкнутые в петлю.

Аффинная селекция пептидов из фаговой пептидной библиотеки. Аффинную селекцию фаговой библиотеки против рекомбинантного белка В7-2, включающую три цикла, проводили с помощью магнитных частиц (МЧ) Dynabeads™ Protein G (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США), представляющих собой однородные суперпарамагнитные шарики размером 2.8 мкм.

Селекцию начинали с промывки МЧ промывочным раствором (0.1%-ный полисорбат 20 в Трис-буферном растворе). Затем добавляли 1 мл блокирующего раствора (5%-ный бычий сывороточный альбумин (БСА) в Трис-буферном растворе) и оставляли на 1 ч при 4°C. В это время смешивали фаговую библиотеку и рекомбинантный белок В7-2 в промывочном растворе и инкубировали 20 мин при комнатной температуре. Полученную смесь добавляли к промытым МЧ, инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Образованный комплекс МЧ–фаг–мишень отмывали от несвязавшихся бактериофагов, связавшиеся же фаги элюировали. Далее удаляли МЧ и добавляли нейтрализующий раствор (1 М Трис-НСl). Полученный элюат (50 мкл) инокулировали в 5 мл культуры, измеряли оптическую плотность на спектрофотометре Nano-Photometer N50 (Implen, Германия) при длине волны 600 нм (она составляла 0.6) и инкубировали в течение ночи при 37°C.

Титрование бактериофагов, амплификацию элюата и наработку индивидуальных фаговых клонов проводили в соответствии с руководством производителя (Ph.D.™ Phage Display Libraries Instruction Manual; NEB, США) [6] с использованием штамма *E. coli* DH5αF'⁺ (NEB, США).

Выделение одноцепочечной ДНК бактериофагов библиотеки. В 500 мкл суспензии бактериофага добавляли 100 мкл иодидного буферного раствора и 250 мкл 96%-ного этилового спирта, ресуспендировали осадок, инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Далее осаждали оцДНК центрифугированием в течение 10 мин при 13000 g и 4°C. Супернатант удаляли, осадок промывали 500 мкл 70%-ного этилового спирта. Снова осаждали оцДНК центрифугированием в течение 10 мин при 13000 g и 4°C. Далее высушивали осадок оцДНК в вакууме и растворяли в 30 мкл дистиллированной воды [7].

Контроль выделения оцДНК проводили разделением нуклеиновых кислот в 1%-ном агарозном геле.

Секвенирование. Секвенирование нуклеотидных последовательностей, кодирующих чужеродные пептиды, специфически взаимодействующие с В7-2, проводили в ЦКП “Геномика” (Новосибирский Академгородок) на капиллярном секвенаторе ABI 3130XL (Genetic Analyser, Applied Biosystems, США) с помощью секвенирующего праймера -96gIII (5'-НО-СССТСАТАГТТАГCG-ТААСG-3') в концентрации 1 пМ.

Иммуноблоттинг (дот-блот). На нитроцеллюлозную мембрану однократно наносили фаговые клоны (1 мкл, 10⁸ вирионов) и высушивали на воздухе. В качестве отрицательного контроля (К–) использовали бактериофаг fd (1 мкл, 10⁸ вирионов), не содержащий чужеродной вставки; в качестве положительного контроля (К+) – рекомбинантный белок В7-2 (Sino Biological, КНР; 1 мкл, 2.5 мкг/мл). Целлюлозу инкубировали с блокирующим Трис-буферным раствором (15 мл), содержащим 1% БСА и 0.1% полисорбата 20, для предотвращения неспецифического взаимодействия [8].

После трехкратной промывки Трис-буферным раствором с 0.1% полисорбата 20 наносили 1.5 мл рекомбинантного белка В7-2 (2.5 мкг/мл) в блокирующем растворе и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин.

После трехкратной промывки промывочным раствором наносили 15 мл раствора антител козы против Fc-участка IgG человека, конъюгированных с щелочной фосфатазой (Invitrogen, США), в рабочем разведении 1 : 5000 в блокирующем растворе и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин.

После трехкратной промывки Трис-буферным раствором с 0.1% полисорбата 20 наносили смесь 5-бром-4-хлор-3-индолил-фосфата (BCIP, 0.21 мг/мл) и нитросинего тетразолия (NBT, 0.42 мг/мл в воде) объемом 15 мл, инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин в темноте.

После трехкратной промывки водой нитроцеллюлозную мембрану высушивали на воздухе в недоступном для света месте. Сигналы на мембране переводили в компьютерное изображение с помощью приложения ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Иммуноферментный анализ (ИФА). Для ИФА использовали среднесорбционные 96-луночные планшеты (Jet Biofil, КНР). В лунки вносили по 100 мкл раствора рекомбинантного белка В7-2 (Sino Biological, КНР) в концентрации 2.5 мкг/мл в Трис-буферном растворе (рН 8.6) и сорбирован-

ли при 4°C в течение ночи. Затем блокировали сайты неспецифического связывания добавлением 200 мкл Трис-буферного раствора (pH 7.0), содержащего 5% БСА, инкубировали в термошейкере для планшетов PST-60HL (BioSan, Латвия) при 37°C и 200 об./мин в течение 2 ч. После удаления блокирующего раствора в лунки вносили бактериофаги (100 мкл в блокирующем растворе, 10⁸ вирионов) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. В качестве отрицательного контроля (К-) использовали бактериофаг fd (100 мкл в блокирующем растворе, 10⁸ вирионов), не содержащий чужеродной вставки; в качестве положительного контроля (К+) – рекомбинантный белок В7-2 (Sino Biological, КНР; 100 мкл, 2.5 мкг/мл). После трехкратной промывки промывочным раствором, содержащим Трис-буферный раствор с 0.5% полисорбата 20, добавляли 100 мкл конъюгата моноклонального антитела против нитчатого бактериофага М13 (GE Healthcare Life Sciences, США), меченого пероксидазой хрена, в выбранном рабочем разведении 1 : 5000 и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После шестикратной промывки промывочным раствором в лунки добавляли субстрат на основе 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ; Sigma-Aldrich, США). Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М серной кислоты в каждую лунку.

Детекцию результатов проводили на планшетном фотометре iMark (Bio-Rad, США) при длине волны 450 нм. Вычисляли средние значения оптической плотности и ошибки средних значений ($M \pm S.E.$), по полученным данным строили диаграммы с указанием величин стандартного отклонения [9].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведения трех циклов аффинной селекции с использованием фаговой пептидной библиотеки GerLab и коммерческого рекомбинантного белка В7-2 были отобраны четыре уникальные последовательности пептидов, взаимодействующих с корегуляторным белком В7-2 человека. С использованием методов иммуноблоттинга и ИФА показано, что фаговые клоны № 1 (пептид CLARCLGRC) и № 6 (пептид АНIEVVSP) обладают наибольшим сродством к рекомбинантному белку В7-2, в то время как у фаговых клонов № 2 (пептид СPSASSQLTC) и № 8 (пептид QMPALMQQ) отсутствует специфическое взаимодействие с мишенью.

Выявленные пептиды с высоким сродством к корегуляторному белку В7-2 человека могут послужить основой для расчета и конструирования искусственных иммуногенов с целью их последу-

ющего использования при разработке иммунотерапевтических средств для лечения онкологических заболеваний.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 19-44-220008, 17-54-33003) и государственного задания Минобрнауки России (№ FZMW-2020-0007).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шаповал А.И., Шаповал С.П., Щербакова Н.С., Щербаков Д.Н. // Биоорг. химия. 2019. Т. 45. С. 348–364. [Chapoval A.I., Chapoval S.P., Shcherbakova N.S., Shcherbakov D.N. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 225–240.] <https://doi.org/10.1134/S0132342319040110>
2. Titov M.I. // Вестник Санкт-Петербургского университета. 2013. № 4. С. 86–102.
3. Урбан И.Г., Мосмайер М.А., Босма Т., Прасслер Й. // Патент RU2702087C2, опублик. 03.10.2019.
4. Боргоякова М.Б., Ильичев А.А. // Бактериофаги. Практикум по молекулярной вирусологии. Учеб.-метод. пособие. Новосибирск: Новосиб. гос. ун-т, 2013. С. 44.
5. Ryvkin A., Ashkenazy H., Weiss-Ottolenghi Y., Piller C., Pupko T., Gershoni J.M. // Nucleic Acids Res. 2018. V. 46. P. 52. <https://doi.org/10.1093/nar/gky077>
6. Ph.D™ Phage Display Libraries. Instructional Manual. New England BioLabs Inc. 44 p.
7. Wilson R.K. // Biotechniques. 1993. V. 15. P. 414–416, 418–420, 422.
8. Reitinger S., Petriv I., Mehr K., Hansen C.L., Withers S.G. // J. Virol. Methods. 2012. V. 185. P. 171–174. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.06.021>
9. Щербакова Н.С., Чикаев А.Н., Карпенко Л.И. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2012. № 1. С. 20–25.

Search for Peptides Specifically Binding with B7-2 Costimulatory Molecule

E. A. Kolosova*, ******, **#**, **O. E. Viktorina***, **A. I. Chapoval****, and **D. N. Shcherbakov***, ******

#Phone: +7(385) 229-81-42; e-mail: kurchanovaea@gmail.com

**State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, r.p. Kol'tsovo, Novosibirskaya obl., 630559 Russia*

***Russian-American Anti-Cancer Center, Altai State University, prosp. Lenina 61, Barnaul, 656049 Russia*

The interaction of B7-1/B7-2 ligands with CD28/CTLA-4 receptors plays a key role in the regulation of the immune response. The aim of this study was to find and study peptides that interact with the human B7-2 molecule. In the course of the work, three rounds of affinity selection were carried out and individual phage clones were selected, which include peptides with varying degrees of interaction with the co-regulatory target B7-2. As a result of DNA sequencing of selected phages, nucleotide sequences encoding peptides that specifically bind to B7-2 were obtained. The identified peptides can be used as a basis for the development of immunotherapeutic drugs for regulating the immune response in the treatment of oncological diseases.

Keywords: phage display, family B7, CD86, oncological diseases, immunotherapy



УДК 001.814.2:543.9

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПАТЕНТНОЙ КЛАССИФИКАЦИИ ДЛЯ ПОИСКА БИМЕДИЦИНСКОЙ ИНФОРМАЦИИ

© 2021 г. Ю. В. Блохина*, А. С. Ильин*, **, #

*Федеральный институт промышленной собственности, Россия, 125993 Москва, Бережковская наб., 30/1

**Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, Россия, 125009 Москва, ул. Моховая, 11/7

Поступила в редакцию 25.12.2020 г.

После доработки 28.12.2020 г.

Принята к публикации 31.12.2020 г.

Патентная литература представляет собой неотъемлемую и значительную часть знаний человечества, пренебрежение которой может негативным образом сказаться на качестве работы исследователя. Поиск по патентным базам помогает как разыскивать подробные технические данные об объектах или процессах, так и оценивать возможности патентования собственных разработок. При этом подобный поиск несколько отличается от использования стандартных интернет-поисковиков или систем научного цитирования. В настоящей работе даются развернутые практические рекомендации по поиску информации в патентных базах данных с использованием патентных классификаторов МПК (Международной патентной классификации) и СПК (Совместной патентной классификации). Дается описание классификаторов и приводится пример проведения поиска патентной информации в области приборов бионаносенсорики.

Ключевые слова: патентный поиск, патентная классификация, МПК, СПК, биосенсор, нанозлектроника

DOI: 10.31857/S0132342321060063

ВВЕДЕНИЕ

Объем научно-технической информации, ежегодно накапливаемой человечеством, за последние 10 лет увеличился почти в 1.5 раза [1]. Согласно оценкам, приведенным в работе Jinha [2], на 2009 г. в мире было опубликовано более 50 млн научных статей в журналах. Если прибавить к ним данные The World Bank [1] и проследить тенденцию, то можно оценить количество опубликованных к концу 2020 г. статей в 75 млн, и каждый год выходят еще 2.5 млн. В помощь исследователям и отраслевым специалистам разработаны многочисленные платформы, облегчающие поиск информации в научных публикациях: системы цитирования Web of Science [3], Scopus [4], РИНЦ [5], Google Scholar [6]; научные социальные сети ResearchGate [7], Academia.edu [8]; программные решения, такие как Mendeley [9], Researcher [10]. Их предназначение – предоставить специалистам возможность ориентироваться в информационном потоке, не пропускать важных исследований, быть в курсе последних событий в той или иной отрасли.

При этом исследователями уделяется гораздо меньшее внимание такому значительному массиву информации, как патентная литература – опубликованным патентам, а также заявкам на патенты. Между тем объем полезной информации, содержащейся в патентной литературе, впечатляет: в 1995 г. количество подаваемых ежегодно заявок превысило 1 млн, в 2011 г. – 2 млн, а в 2016 г. – 3 млн [11]. Базы данных, такие как Google Patents [12] или Espacenet [13], на настоящий момент содержат более 120 млн патентных публикаций из более чем 100 стран. Очевидно, что количество накопленных человечеством знаний в патентной форме как минимум сопоставимо с накопленным в форме научных статей. Однако поиск по базам данных патентной литературы несколько отличается от поиска в системах научного цитирования, и без некоторой подготовки рядовому исследователю будет сложнее проводить патентный поиск.

Цели поиска по патентным базам данных могут быть различными: желание получить патентную защиту на собственные разработки, для чего необходимо четко представлять отличия и преимущества в сравнении с уже известными решениями; поиск нюансов решения какой-либо проблемы, которые, как правило, не раскрываются в научных публикациях – даже в разделах дополни-

Сокращения: МПК – международная патентная классификация; СПК – совместная патентная классификация.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 629-74-32; эл. почта: ailin@hitech.cplire.ru).

тельных материалов. Для прикладных исследований патентные источники представляют особую ценность, поскольку полнота раскрытия информации о разработке в них гораздо выше, нежели в журналах. Следует отметить, что подробности таких разработок в научной литературе появляются позже — это обусловлено тем, что один из критериев патентоспособности — новизна решения [14]. Следовательно, информация о разработке (до подачи заявки на патент) никоим образом не должна быть опубликована — ни в виде статьи в журнале, ни в виде тезисов конференции, ни даже в виде видео-лекции. Исследовательские лаборатории и университеты ведущих стран убедительно просят ученых и инженеров, прежде чем что-либо опубликовать, обращаться в так называемые отделы передачи технологий — для оценки потенциальной патентоспособности разработок [15–18]. Тем не менее, вне зависимости от побудивших причин, умение осуществлять поиск по базам патентной литературы является необходимым навыком для исследователей и разработчиков.

ПАТЕНТНЫЙ ПОИСК И ПАТЕНТНЫЕ КЛАССИФИКАТОРЫ

Отправной точкой для начала патентного поиска является выбор патентной базы. В силу своей открытости, в настоящей статье будет по умолчанию рассматриваться патентная база Google Patents. Как указывалось ранее, данный сервис, наряду с Espacenet, охватывает наибольшее количество патентных документов. При этом представление результатов поиска в нем наглядно отображает содержание патентов и заявок. Отметим также базу данных Patentscope [19], поддерживаемую Всемирной организацией интеллектуальной собственности (World Intellectual Property Organization, WIPO) и содержащую более 92 млн патентных документов. Указанные поисковые сервисы являются открытыми и бесплатными.

Несмотря на значительный объем патентных документов в вышеуказанных базах, наиболее полной по количеству хранящихся заявок, патентов и авторских свидетельств (до 1994 г.) на русском языке является база данных Федерального института промышленной собственности (ФИПС) [20] — подразделение Роспатента, занимающееся экспертизой патентных заявок в России.

Алгоритмы поиска по различным патентным базам данных схожи между собой. Если не принимать во внимание поиск по имени и фамилии автора, заявителю или дате публикации, то в целом можно разделить патентный поиск на две категории: *поиск по ключевым словам* и *поиск по кодам патентной классификации*.

Поиском по ключевым словам все пользуются ежедневно, задавая вопросы в поисковой строке браузера. В то же время категоризация патентов по кодам сходна с библиотечным каталогом. При этом *поиск по кодам патентной классификации* обладает рядом существенных преимуществ перед поиском по ключевым словам: нет необходимости учитывать синонимы, а кроме того, в каждой стране код классификатора обозначает одну и ту же группу изобретений, независимо от языка. Наиболее распространенными схемами классификации являются Международная патентная классификация (МПК) [21, 22] и Совместная патентная классификация (СПК) [23]. МПК, в соответствии со Страсбургским соглашением 1971 г., внедрена по всему миру [24], в то время как применение СПК ограничивается узким кругом стран, в первую очередь США и Европейским союзом. По этой причине не все патентные документы имеют индексы СПК, что необходимо учитывать при проведении патентного поиска. Оба классификатора имеют одинаковую иерархическую структуру, при этом МПК является основой СПК, представляющей собой более подробное развитие первой.

В МПК существуют четыре уровня иерархии: *раздел, класс, подкласс и группа* [25]. Всего в МПК восемь разделов, а в СПК — девять. Каждый раздел обозначен заглавной латинской буквой от А до Н. Название раздела представляет собой наиболее общее обозначение содержимого раздела. Разделы обозначены следующим образом:

А — УДОВЛЕТВОРЕНИЕ ЖИЗНЕННЫХ ПОТРЕБНОСТЕЙ ЧЕЛОВЕКА

В — РАЗЛИЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ; ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

С — ХИМИЯ; МЕТАЛЛУРГИЯ

D — ТЕКСТИЛЬ; БУМАГА

Е — СТРОИТЕЛЬСТВО И ГОРНОЕ ДЕЛО

F — МАШИНОСТРОЕНИЕ; ОСВЕЩЕНИЕ; ОТОПЛЕНИЕ; ОРУЖИЕ И БОЕПРИПАСЫ; ВЗРЫВНЫЕ РАБОТЫ

G — ФИЗИКА

Н — ЭЛЕКТРИЧЕСТВО

СПК, помимо вышеуказанных, включает раздел **Y — ОБЩИЙ ИНДЕКС ДЛЯ НОВЫХ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РАЗРАБОТОК ИЛИ МЕЖПРЕДМЕТНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ, КОТОРЫЕ РАСПРОСТРАНЯЮТСЯ НА НЕСКОЛЬКО РАЗДЕЛОВ МПК.**

Внутри *разделов* можно выделить *подразделы*, которые представляют собой заголовки без классификационных индексов. Например, в *разделе А* можно выделить *подраздел “ЗДОРОВЬЕ; СПАСАТЕЛЬНАЯ СЛУЖБА; РАЗВЛЕЧЕНИЕ”*, в который входят 4 *класса*, — второй уровень иерархии классификатора. Код класса — это символ раздела, за

A61B 5/145	[rss] [поиск]	.измерение характеристик крови в живом организме, например концентрации газа, величины рН (измерение кровяного давления или тока крови 5/02; обнаружение или определение местоположения инородных тел в крови без использования излучения 5/06) [7]
A61B 5/1455	[rss] [поиск]	.с использованием оптических сенсоров, например спектральных фотометрических оксиметров [8]
A61B 5/1459	[rss] [поиск]	...инвазивных, например вводимых в тело с помощью катетера [8]
A61B 5/1464	[rss] [поиск]	...специально предназначенные для фетальной ткани [8]
A61B 5/1468	[rss] [поиск]	...с использованием химических или электрохимических методов, например полиграфических средств [8]
A61B 5/1473	[rss] [поиск]	...инвазивные, например вводимые в тело с помощью катетера [8]
A61B 5/1477	[rss] [поиск]	...неинвазивные [8]
A61B 5/1482	[rss] [поиск]	...специально предназначенные для фетальной ткани [8]
A61B 5/1486	[rss] [поиск]	...с использованием ферментных электродов, например с иммобилизованной оксидазой [8]
A61B 5/1491	[rss] [поиск]	...нагреваемые аппликаторы [8]
A61B 5/1495	[rss] [поиск]	...калибрующие или тестирующие зонды, используемые в живом организме [8]
A61B 5/15	[rss] [поиск]	...устройства для взятия проб крови (шприцы для подкожного введения A 61M 5/178) [7]

Рис. 1. Пример подчиненности подгрупп друг другу [26].

которым следует двузначный номер. Например, класс *A61* – *Медицина и ветеринария; гигиена*. Каждый класс содержит один или несколько *подклассов*, обозначаемых заглавной латинской буквой, следующей за кодом класса. Первым в вышеупомянутом классе *A61* идет *подкласс A61B* – *Диагностика; хирургия; опознание личности*.

В свою очередь, подклассы разбиваются на *группы*, которые представляют собой либо *основные группы* – четвертый уровень классификации, либо *подгруппы*, зависимые от основных групп. Код группы обозначается двумя числами, разделенными косой чертой, идущими после кода подкласса. При этом если речь идет об основной группе, то последнее число кода всегда “00”, как, например, у основной группы *A61B 5/00* – *Измерение для диагностических целей; опознание личности*, в то время как у подгруппы последнее число будет отличным от “00”. Порядок нумерации подгрупп такой же, как если бы номер подгруппы был десятичной дробью числа перед косой чертой [25]. Например, *5/1455* идет после *5/145* и прежде *5/15*. Название подгруппы точно определяет предметную область в рамках ее основной группы, считающейся полезной для целей патентного поиска.

Необходимо обязательно обращать внимание на подчиненность подгрупп друг другу, обозначающуюся в классификаторе точками: группа с большим количеством точек подчиняется вышестоящей группе с меньшим количеством точек. Например, как видно из рис. 1, название группы *5/1459*, с учетом ее подчиненности группе *5/1455*, которая подчинена группе *5/145*, следует читать так: “*измерение характеристик крови в живом организме, например концентрации газа, величины рН, с использованием оптических сенсоров, например спектральных фотометрических оксиметров, инвазивных, например вводимых в тело с помощью катетера*”.

Для того чтобы приступить к патентному поиску, необходимо подобрать код МПК или СПК, наиболее подходящий запросу. Можно выделить

три основных способа подбора кода: 1) метод прямого подбора (спускаясь вниз по иерархической структуре классификатора); 2) поиск в классификаторе по ключевым словам; 3) поиск по патентам-аналогам.

В первом случае исследователь пользуется непосредственно классификатором МПК [21, 22] или СПК [23], ориентируясь последовательно на названия разделов, подразделов, классов, подклассов и групп. Такой подход, хотя и очевиден, но не всегда удобен. Часто более удобным выступает поиск нужной группы по ключевым словам, который возможно производить как в виде поискового запроса (рис. 2), так и по словарю (рис. 3).

Третий способ подбора кода классификации – поиск по патентам-аналогам. Такой поиск можно осуществлять в несколько этапов, каждый раз подбирая более подходящую группу. Методика такого поиска заключается в том, чтобы по нескольким ключевым словам найти патентный документ, в достаточной степени соответствующий предмету поиска, после чего либо на титульной странице найденного документа, либо на странице документа в базе Google Patents можно выделить код МПК и СПК. Взяв полученный код за основу, можно проверить ближайшие группы или подняться вверх по иерархии и найти наиболее подходящую группу. Важно иметь в виду, что если изобретение можно отнести к нескольким разделам науки и техники, например, роботизированной хирургии и использованию нейронных сетей, то оно, скорее всего, будет иметь несколько кодов классификации, принадлежащих разным разделам. Использование в поиске по патентным базам документов одновременно нескольких кодов классификации делает его более эффективным.

ПРИМЕР ПАТЕНТНОГО ПОИСКА

Рассмотрим проведение патентного поиска по выбранной тематике на конкретном примере.

Cooperative Patent Classification

Search for View section | Index | A | B | C | D | E | F | G | H | Y |

« A61N A61N2/00 »

Symbol	Classification and description
★★★★★ <input type="checkbox"/> A61N 1/00	Electrotherapy; Circuits therefor (A61N 2/00 takes precedence; irradiation apparatus A61N 5/00)
★★★★★ <input type="checkbox"/> A61B 5/00	Detecting, measuring or recording for diagnostic purposes (radiation diagnosis A61B 6/00 ; diagnosis by ultrasonic, sonic or infrasonic waves A61B 8/00); Identification of persons
★★★★★ <input type="checkbox"/> G16H 20/00	ICT specially adapted for therapies or health-improving plans, e.g. for handling prescriptions, for steering therapy or for monitoring patient compliance
★★★★★ <input type="checkbox"/> G16H 40/00	ICT specially adapted for the management or administration of healthcare resources or facilities; ICT specially adapted for the management or operation of medical equipment or devices

Рис. 2. Поиск кода СПК по ключевому слову [23].

IPC Publication				
Scheme	RCL	Compilation	Catchwords	Search
-				N
+			NACELLES	- NIPPERS
+			NIPPLES	- NUTMEG
-				O
+			OAKUM	- ORNITHOPTERS
+			ORRERIES	- OXYGEN
+			OXYKETONE	- OZOTYPY

Рис. 3. Подбор кода МПК по словарю [21].

Предположим, необходимо найти релевантные патентные документы по актуальной в настоящее время тематике – диагностике посредством анализа биологических жидкостей человека с использованием нанoeлектронных устройств. Конкретный интерес представляют используемые материалы. Допустим, что чувствительный элемент – полупроводниковый нанопровод или наночешуйка. Для первого этапа поиска составим такой поисковый запрос: *(fluid) (semiconductor) (nanowire) (A61B)* – последний код выберем, потому что известно, что данный подкласс содержит изобретения, касающиеся медицинской диагностики. Поиск по базе Google Patents выдает 512 документов. Выдача результатов в базе позволяет грубо оценить их релевантность сделанному запросу. Выберем похожий патентный документ, например, US8232584B2 (рис. 4) [27].

На рис. 4 представлена вся техническая информация о патенте. В центральной колонке расположено окно с кодами СПК и их расшифровкой. Первый код *A61B5/14546* – *Измерение характеристик крови в живом организме, например концентрации газа, величины рН; Измерение характеристик жидкостей или тканей организма, например интерстициальной жидкости, ткани головного мозга, для анализа измеряемых веществ только предусмотренным образом, например ионов, цитохромов*, не подходит для второго этапа поиска в силу узости своей формулировки. Однако, поднявшись на одну ступень вверх по древу подчиненности, можно увидеть группу *A61B5/145* – *Измерение характеристик крови в живом организме, например концентрации газа, величины рН; Измерение характеристик жидкостей или тканей организма, например интерстициальной жидкости, ткани головного мозга*. Вторая подходящая группа

The screenshot shows a Google Patents search result for the query "(analyte) (semiconductor) (nanowires) (A61B)". The search terms are listed on the left, and the main content is for patent US8232584B2. The title is "Nanoscale sensors". The abstract describes various aspects of the invention relating to nanoscale wire devices and methods for detecting analytes. The classification code A61B/14546 is highlighted, and a tree view shows its broader categories: A - HUMAN NECESSITIES, A61 - MEDICAL OR VETERINARY SCIENCE, HYGIENE, A61B - DIAGNOSIS; SURGERY; IDENTIFICATION, and A61B5/00 - Detecting, measuring or recording for diagnostic purposes, Identification of persons. The right sidebar contains bibliographic data, including the inventor (Charles M. Lieber, Fernando Patolsky, Gengfeng Zheng), the assignee (Harvard College), and a list of application events from 2005 to 2012.

Рис. 4. Пример патентного документа, полученного на первом этапе поиска в базе Google Patents: верхняя строка и левая колонка – поисковый запрос; центральная колонка – название, реферат, изображения, коды классификации; правая колонка – библиографические данные, ссылки, история патента. При наведении курсора на строку классификации появляется название кода патентной классификации и древо его подчиненности.

(a)

8. The microdevice of claim 11, wherein the dielectric nanolayer comprises hexagonal boron nitride or HfO₂.

9. The microdevice of claim 1, wherein the nanosensor further comprises a gate electrode formed from a nanolayer including at least one of ITO, Ti/Pd/Pt, gold, chrome or copper.

10. The microdevice of claim 6, wherein the nanosensor further comprises a source electrode and a drain electrode, and wherein the graphene sheet makes contact to both the source electrode and the drain electrode.

11. The microdevice of claim 10, wherein the source and drain electrodes comprise a nanolayer including at least one of ITO, Ti/Pd/Pt, chromium, gold, or chrome.

12. The microdevice of claim 1, wherein the platform substrate comprises at least one of polyethylene terephthalate (PET), polycarbonate polystyrene, polymethyl methacrylate (PMMA), polylactone, silicones, fluoropolymers, silicone acrylate, fluoro-silicone/acrylate, or poly hydroxyethyl methacrylate.

13. The microdevice of claim 1, wherein the nanosensor is covered with a polymer coating except for the functionalized part of the graphene sheet and wherein the polymer coating comprises at least one of parylene, polyimide, organic polymer, or hydrophobic polymer.

(б)

[0236] In particular, the nanosensor was fabricated on a SiO₂-coated silicon substrate (518, 519). After cleaning by piranha, 5/45 nm Cr/Au was deposited using thermal evaporation (BOC 306 Thermal Evaporator, Edward) (FIG. 9a). Photoresist (S1811, Shipley) was then spin-coated on top of Au at 5000 rpm for 1 min, and baked at 115° C. for 1 min. Photolithography (MA6, Suss MicroTec) was then used to pattern the shape of the gate electrode on the wafer. The wafer was then developed in developer (AZ MIF 300, AZ Electronic Materials) and local wet etched in gold and chrome etchant subsequently (FIG. 9a). The wafer was cleaned with piranha solution followed by oxygen plasma. Next, a 20 nm HfO₂ layer (506) was deposited on top of the gate electrode (507) using atomic layer deposition (ALD, Savannah 200, Cambridge Nano Tech) at 3.6×10⁻¹ torr and the temperature as high as 200° C. (FIG. 9b) (FIG. 9b). Another layer of photoresist (S1811, Shipley) was spin-coated and patterned to define the shape of source and drain electrodes, followed by deposition of 5/45 nm Cr/Au. Lastly, the wafer was immersed in photoresist stripper (AZ MIF 400 Stripper) and acetone sequentially to dissolve the photoresist and shape the drain and source electrodes (FIG. 9c). After the completion of the fabrication process, a single-layer graphene sheet (505) synthesized by chemical vapor deposition (CVD) was subsequently transferred onto the sensor to cover the source (508), drain (509) and gate electrodes (507) (FIG. 9d). A Raman spectrum was taken to confirm the monolayer graphene sheet throughout the conducting channel. A polydimethylsiloxane (PDMS)-based microchamber was used to confine the liquid sample on top of the graphene.

Рис. 5. Пример релевантного патентного документа: (a) – формула изобретения, (б) – описание [28].

СПК есть здесь же: *A61B2562/0285* – *Наноразмерные сенсоры*. Заменяем полученными кодами ключевые слова *fluid* и *nanowire*, уберем уже ненужный слишком общий подкласс *A61B* и составим запрос: (*semiconductor*) (*wire*) (*A61B5/145*) (*A61B2562/0285*). Полученные результаты – 37 документов (патентных семей, в которые объединены 103 заявки и патента). Такое количество вполне подходит для точного ручного рассмотрения исследователем и при этом достаточно полно отражает уровень техники.

На первой странице, например, можно выбрать документ US20170181669A1 – 120-страничную заявку на патент наносенсора, в формуле изобретения и описании которой можно найти возможные варианты реализации конструкции такого сенсора с использованием различных материалов (рис. 5а), а также подробное описание процесса изготовления сенсора (рис. 5б).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенный пример патентного поиска демонстрирует возможность получения данных, полезных для исследователей, обладающих, в силу патентного характера документов, большей полнотой в сравнении с традиционными статьями в научных журналах. Показанный подход – существенное дополнение для проводимых обзоров уровня техники по любому предмету исследований. При этом немаловажные преимущества использования для такого поиска классификаторов МПК и СПК – полнота выдачи релевантных результатов, независимость от языка патентного документа и отсутствие необходимости учета всех возможных синонимов поисковых терминов.

Патентный поиск отличается от традиционного поиска в Google, Яндекс или иных сервисах; не используется повседневно ни обывателями, ни, за редким исключением, специалистами и не выступает в достаточной степени интуитивно-понятным. При этом объем полезной информации, который может быть получен из патентной литературы, делает ее незаменимым источником. Предполагаем, что включение в образовательные программы обучения навыкам проведения патентного поиска – абсолютно необходимо. Представленная методика не требует значительного количества часов для освоения и может быть включена в курс старших классов по предмету “Технология”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Scientific and Technical Journal Articles // The World Bank. <https://data.worldbank.org/indicator/IP.JRN.ARTC.SC>
2. *Jinha A.E.* // Learned Publishing. 2010. V. 23. P. 258–263. <https://doi.org/10.1087/20100308>
3. Web of Science. <https://apps.webofknowledge.com>
4. Scopus Preview. <https://www.scopus.com>
5. Российский индекс научного цитирования (РИНЦ). https://www.elibrary.ru/project_risc.asp
6. Google Академия. <https://scholar.google.com>
7. ResearchGate. <https://www.researchgate.net>
8. Academia.edu. <https://www.academia.edu>
9. Mendeley. <https://www.mendeley.com>
10. Researcher. <https://www.researcher-app.com>
11. World Intellectual Property Indicators // WIPO. 2019. Patents. P. 11–72. https://www.wipo.int/edocs/pubdocs/en/wipo_pub_941_2019-chapter1.pdf
12. Google Patents. <https://patents.google.com>
13. Espacenet Patent Search. <https://worldwide.espacenet.com>
14. Условия патентоспособности изобретения // Гражданский кодекс РФ (часть четвертая) от 18.12.2006 № 230-ФЗ. Глава 72. Патентное право. Статья 1350.
15. Harvard. Office of Technology Development. <https://otd.harvard.edu/faculty-inventors/protecting-intellectual-property>
16. Patenting an Invention // Massachusetts Institute of Technology. Technology Licensing Office. <https://tlo.mit.edu/learn-about-intellectual-property/patenting-invention>
17. Patent // Stanford University. <https://otl.stanford.edu/patent>
18. Intellectual Property Office // Lawrence Berkeley National Laboratory. <https://ipo.lbl.gov>
19. Patentscope // WIPO IP Portal. <https://patentscope.wipo.int>
20. Информационно-поисковая система // Федеральный институт промышленной собственности. <https://www.fips.ru/elektronnye-servisy/informat-sionno-poiskovaya-sistema>
21. International Patent Classification (IPC) Publications // WIPO IP Portal. <https://www.wipo.int/classifications/ipc/ipcpub>
22. Международная патентная классификация // Федеральный институт промышленной собственности. <https://new.fips.ru/publication-web/classification/mpk?view=index>
23. Cooperative Patent Classification // Espacenet. Patent Search. <https://worldwide.espacenet.com/classification>

24. Strasbourg Agreement Concerning the International Patent Classification (as amended on September 28, 1979) // World Intellectual Property Organization (WIPO). 9 p. <https://wipolex.wipo.int/en/text/291784>
25. Guide to the International Patent Classification (Version 2020) // World Intellectual Property Organization (WIPO). 50 p. https://www.wipo.int/edocs/pubdocs/en/wipo_guide_ipc_2020.pdf
26. А61В Диагностика; хирургия; опознание личности // Федеральный институт промышленной собственности. Международная патентная классификация. <https://new.fips.ru/publication-web/classification/mpk?view=detail&edition=2020&symbol=A61B>
27. Lieber C.M., Patolsky F., Zheng G. // Патент США US8232584B2, опублик. 31.07.2012. <https://patents.google.com/patent/US8232584B2/en>
28. Lin Q., Zhu Y., Shang J., Zhang Z., Wang X., Yang J., Wang C. // Заявка на патент США US20170181669A1, опублик. 29.06.2017. <https://patents.google.com/patent/US20170181669A1/en>

Use of Patent Classification for Biomedical Information Search

Yu. V. Blokhina* and A. S. Ilin*, **, #

Phone: +7 (495) 629-74-32; e-mail: ailin@hitech.cplire.ru

*Federal Institute of Industrial Property, Berezhevskaya nab. 30/1, Moscow, 125993 Russia

**Kotelnikov Institute of Radio Engineering and Electronics of RAS, ul. Mokhovaya 11/7, Moscow, 125009 Russia

Patent literature is an integral and significant part of human knowledge, the disrespect for which can negatively affect the quality of a one's work. A search in patent databases helps both to look for detailed technical data on objects or processes, and to evaluate the possibility of patenting your own results. At the same time, such a search is somewhat different from using standard Internet search engines or scientific citation systems. In this work, detailed practical recommendations are given for searching information in patent databases using the IPC (International Patent Classification) and CPC (Cooperative Patent Classification). A description of the classifiers is given and an example of how to search for information on nanoelectronic biosensors is given.

Keywords: patent search, patent classification, IPC, CPC, biosensor, nanoelectronics



УДК 57.017.23

ДЕТЕКЦИЯ БЕЛКА PRAME НА ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНО МЕЧЕНОГО МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА

© 2021 г. К. А. Сапожникова*, А. В. Мисюрин**, Н. Б. Пестов***, ****, Е. Г. Мелешкина*, *****, С. Д. Орешков*, *****, Е. П. Ганжула*, *****, А. С. Михайлова*, *****, В. А. Коршун*, *****, В. А. Мисюрин*****, #, В. А. Брылёв*, #

*ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Макляя, 16/10

**ООО “Генотехнология”, Россия, 117485 Москва, ул. Профсоюзная, 104

***Московский физико-технический институт, Россия, 141701 Долгопрудный, Институтский пер., 9

****Федеральный научный центр исследования и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Россия, 108819 Москва, поселение Московский, пос. Института полиомиелита, домовладение 8, корп. 17

*****Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Россия, 125047 Москва, Миусская площадь, 9

*****ФГБУН “МГУ им. М.В. Ломоносова”, химический факультет, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/3

*****ФГБУН “Российский университет дружбы народов”, Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Макляя, 6

*****НИУ “Высшая школа экономики”, Россия, 117312 Москва, ул. Вавилова, 7

*****Институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Россия, 119021 Москва, ул. Б. Пироговская, 11

*****Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина, Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 23

Поступила в редакцию 15.11.2020 г.

После доработки 12.12.2020 г.

Принята к публикации 13.12.2020 г.

Определение уровня экспрессии белка-онкомаркера PRAME позволяет как прогнозировать течение заболевания, так и контролировать эффективность противоопухолевой терапии. Флуоресцентно меченое моноклональное антитело к белку PRAME получено периодатным окислением гликанов с последующей модификацией бифункциональным азидо-оксиаминовым реагентом и “клик”-реакцией с алкиновым производным сульфированного цианинового красителя Су3. Предложен новый подход к синтезу бифункционального азидо-оксиаминового реагента с использованием этоксиэтилиденной защитной группы для гидроксилламина. Полученное меченое антитело охарактеризовано спектрофотометрически, определена стехиометрия модификации. Продемонстрированы сохранение аффинности флуоресцентных антител и возможность их применения в качестве диагностического инструмента для определения остаточного маркера (белка PRAME) после проведения противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: моноклональное антитело, флуоресцентная метка, “клик”-реакция, оксиамин

DOI: 10.31857/S013234232105033X

ВВЕДЕНИЕ

Раково-тестикулярный белок PRAME (preferentially expressed antigen in melanoma), сверхэксп-

Сокращения: Вос – трет-бутилоксикарбонил; ESI – ионизация распылением в электрическом поле; PRAME – (preferentially expressed antigen in melanoma/предпочтительно экспрессирующийся антиген меланомы); ТНРТА – триис(3-гидрокси-пропилтриазолилметил)амин.

Автор для связи: (тел.: +7 (499) 324-60-37, +7 (499) 724-67-15; эл. почта: vsevolod.misyurin@gmail.com, v.brylev@yandex.ru).

прессирующийся при ряде онкологических заболеваний (меланоме, раке молочной железы, раке легких, раке почки, нейробластоме и др. [1–4]), нарушает передачу сигнала в ядерных рецепторах ретиновой кислоты, выступающих лиганд-регулируемыми транскрипционными факторами, участвующими в процессах развития, гомеостаза и дифференцировки клеток [5]. Белок PRAME служит диагностическим и прогностическим маркером [6–11], в том числе при противоопухо-

левой терапии. Наличие белка PRAME наблюдалось на поверхности лейкозных клеток K562, что дает возможность использовать белок PRAME в качестве мишени для иммунотерапии [1, 9, 12]. Поскольку экспрессия этого белка не ограничивается лейкозами, установление его экспрессии в клетках солидных опухолей позволит разработать новые препараты также и для этих заболеваний.

Моноклональное антитело 6H8 к белку PRAME [13] может быть использовано как для детекции этого белка, так и для разработки терапевтических препаратов. В первую очередь представляла интерес прямая детекция связывания антитела с изучаемым белком, что можно осуществить с помощью проточной цитометрии, если антитела содержат флуоресцентную метку. Поэтому возникла необходимость разработки надежной процедуры флуоресцентного мечения моноклонального антитела 6H8, сохраняющей его аффинность к белку PRAME. В данной статье мы предлагаем использовать периодатное окисление углеводных фрагментов сайта гликозилирования моноклонального антитела 6H8 с последующей модификацией образующихся альдегидных групп бифункциональным азидо-оксиаминовым линкером. Такой метод позволяет вводить в антитела алифатические азидогруппы, по которым можно проводить дальнейшую модификацию антител алкиновыми производными флуоресцентных красителей в условиях Cu(I)-катализируемой “клик”-реакции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общий подход к мечению иммуноглобулина. Для флуоресцентного мечения был выбран подход, связанный с модификацией углеводных фрагментов антител. После окисления углеводной части иммуноглобулина 6H8 периодатом натрия [14] молекулу антитела последовательно модифицировали бифункциональным азидо-оксиаминовым реагентом (I) и алкиновым производным сульфированного цианинового красителя Cu3 (II) в условиях биоортогональной “клик”-реакции (схема 1). Этот подход основан на широко используемых методах – модификации карбонильных соединений *O*-алкилгидроксиламины [15, 16] и Cu(I)-катализируемом циклоприсоединении терминальных алкинов к азидам [17]. Данный способ обладает несколькими преимуществами по сравнению с широко используемыми реакциями модификации amino- и тиольных групп антител. Кроме углеводного сайта другие фрагменты антител не окисляются и не меняют своих функций. Модификация гликана весьма удачна также потому, что сайт гликозилирования находится далеко от антиген-связывающего фрагмента. Таким образом, конъюгация антител с низкомолекулярными соединениями через углеводный участок не должна оказывать значительного влияния на аффинность антител к антигенам.

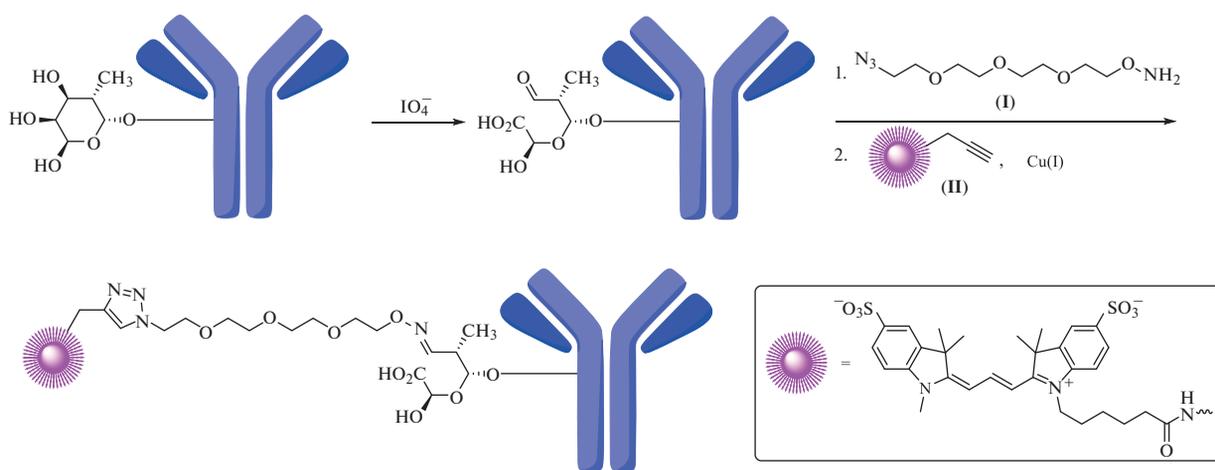


Схема 1. Получение флуоресцентно меченого антитела. Схематически изображено окисление L-фукозы в альдегидокислоту [17].

Усовершенствованный метод синтеза бифункционального реагента (I). Синтез азидо-оксиаминового реагента (I) осуществляли из соответствующего азидоспирта (III) с использованием этоксиэтилиденной защитной группы для гидроксиламина (схема 2). Ранее для превращения вещества (III) в реагент (I) использовали Вос- [18] и фталимидные

[19, 20] защитные группы гидроксиламина. Мы обнаружили, что более удобной защитной группой служит этоксиэтилиденная группа. Алкилирование этил-*N*-гидроксиацетимидата (IV) мезилатами спиртов с последующим легким деблокированием оказалось удобным методом получения соответствующих *O*-алкилгидроксиламинов [21].

Проведение реакции в смеси *трет*-бутанола и изопропанола (1 : 1) позволило получить защищенное производное (V) с общим выходом 80% после двух стадий. При проведении реакции алкилирования в метаноле наблюдалось образова-

ние значительных количеств простого метилового эфира азидоспирта (III). В результате обработки соединения (V) соляной кислотой в метаноле с последующим упариванием получили соединение (I) в виде гидрохлорида с выходом 92%.

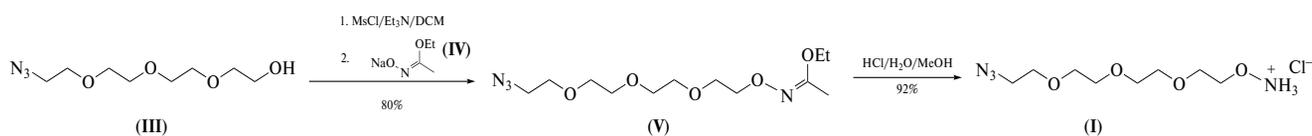


Схема 2. Синтез реагента (I) с использованием этоксиэтилиденовой защитной группы.

Определение уровня экспрессии гена *PRAME*.

В исследуемых клеточных линиях ген *PRAME* был стабильно активен, и уровень его экспрессии находился в диапазоне 6000–7000% в клетках линии K562 и 6000–7500% в клетках линии mel P. Таким образом, данные клеточные линии могут быть использованы для определения уровня экспрессии белка *PRAME*.

Конъюгация моноклонального антитела 6H8 с сульфированным красителем Су3. Окисление углеводного фрагмента антитела 6H8 проходит довольно мягко в слабощелочных условиях (pH 5.0) под действием периодата натрия. Количество образующихся карбонильных групп при окислении углеводных фрагментов антител может контролироваться тремя параметрами – временем, концентрацией периодата и pH реакционной среды. В нашем случае моноклональное антитело 6H8 окислялось 20 мМ раствором периодата натрия в течение 40 мин. Для остановки реакции использовали глицерин, быстро вступающий в реакцию с окислителем. Отделение низкомолекулярных продуктов реакции от окисленного продукта (антитела) удобно проводить с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-50. Очищенное окисленное антитело затем может вступать в реакцию с оксиамином (I) также в слабощелочных условиях (pH 5.0). Реакция соединения (I) с карбонильными группами антитела 6H8 протекает достаточно быстро (1 ч) и приводит к образованию модифицированного антитела, несущего в своем составе азидные группы, связанные ковалентно посредством тетраэтиленгликольного гидрофильного линкера с сайтом гликозилирования. Очищенное гель-фильтрацией азидированное антитело затем вводили в Cu(I)-катализируемую реакцию азид-алкинового циклоприсоединения [16] с алкиновым производным сульфированного красителя Су3 (II). Для снижения неспецифического связывания использовали гидрофильный водорастворимый лиганд ТНРТА, образующий комплекс с Cu(I) и легко отделяющийся с помощью гель-фильтрации. Образующееся Су3-меченое антитело удобно выделять на сефадексе G-50, поскольку

оно окрашено, и протекание хроматографического разделения легко визуализируется.

Дальнейший анализ конъюгата производили спектрофотометрически. Для этого был получен спектр поглощения в УФ- и видимой областях. Поскольку на одну молекулу антитела после конъюгации приходилось несколько остатков красителя, то эти остатки красителя из-за близкого расположения начинали между собой взаимодействовать и образовывать Н-агрегаты [22]. Такие взаимодействия отражались на форме спектра поглощения в области 550 нм. При этом агрегации антител не наблюдалось, и раствор конъюгата оставался длительное время стабильным без видимого выпадения в осадок меченого антитела. Для подавления агрегации остатков красителя и получения неискаженного спектра поглощения (рис. 1) был подобран буферный раствор, содержащий 10% додецилсульфата натрия. Далее по соотношению интенсивности полос поглощения при 280 и 550 нм была определена нагрузка *N* красителя (II) на одну молекулу антитела, которая составила величину 6, т.е. на одну молекулу иммуноглобулина приходилось шесть остатков молекул сульфированного красителя Су3.

Валидация антител, меченных сульфо-Су3. Для определения способности антитела 6H8, меченого красителем сульфо-Су3, распознавать белок *PRAME* использовали клетки линии K562. Антитела обнаруживались в цитоплазме более чем у 98% пермеабелизованных клеток (рис. 2). Эти же антитела использовали для окрашивания цитоплазмы клеток mel P, причем локализация меченого антитела 6H8 в цитоплазме также была зафиксирована более чем у 98% пермеабелизованных клеток (рис. 3). Таким образом, модифицированные антитела сохранили способность связываться с нативным белком *PRAME*, находящимся в цитоплазме клеток. Клетки меланомы мыши не окрашивались.

Окрашивание поверхности клеток линий K562 и mel P. Антитела 6H8, меченные красителем (II), связывались с поверхностью непрмеабелизованных клеток линий K562 и mel P. Интенсивность связывания была очень низкой и практиче-

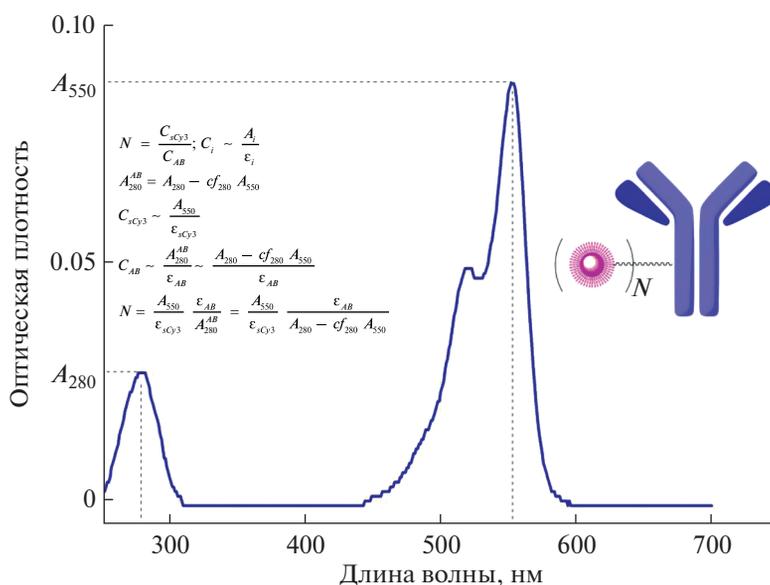


Рис. 1. Спектр поглощения конъюгата антитела с сульфированным красителем Су3 и определение стехиометрии (нагрузки, N) модификации антитела красителем.

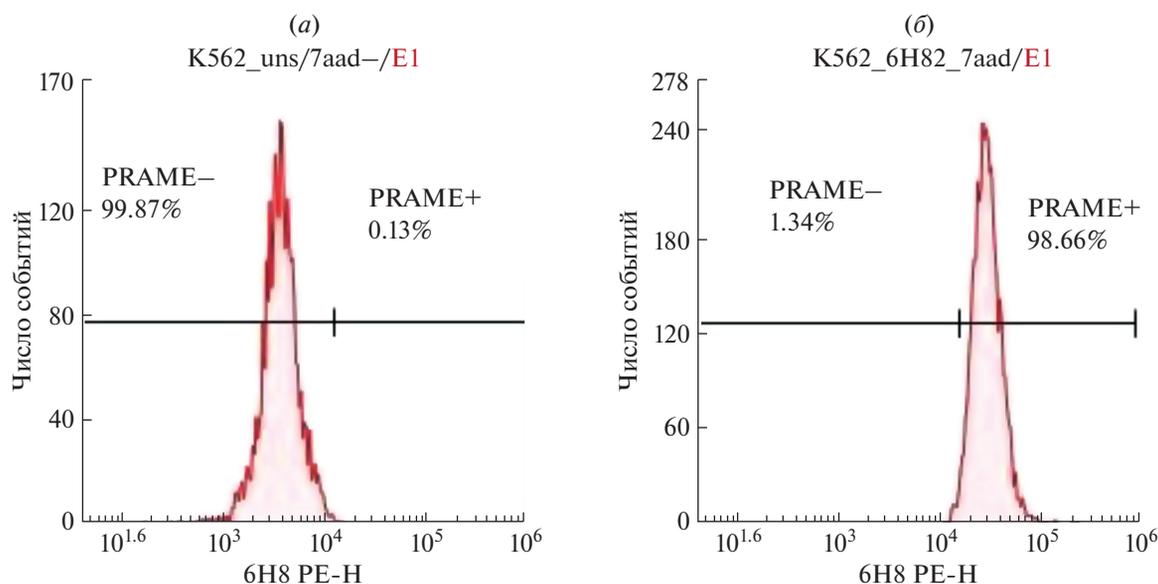


Рис. 2. Пример окрашивания клеток K562 антителом 6H8, меченным сульфо-Су3: (а) – неокрашенные клетки; (б) – окрашенные клетки.

ски не визуализировалась на скейтерограммах, однако связывание было доказано по изменению интенсивности флуоресценции клеток, выраженной в безразмерных единицах (рис. 4).

Интенсивность окрашивания снижалась при разведении антител. Таким образом, антитела связываются с поверхностью PRAME-экспрессирующих непрмеабелизованных клеток линий K562 и mel P, что свидетельствует о наличии белка PRAME на мембране данных клеток.

Далее мы определили интенсивность флуоресценции CD20-экспрессирующих клеток хронического В-клеточного лимфоидного лейкоза, окрашенных модифицированными антителами, распознающими антиген CD20. Аномальность этих клеток была доказана при выявлении на их поверхности экспрессии антигенов CD22, CD19, CD5 и CD23, а также антителами к легкой цепи иммуноглобулина [23]. Интенсивность флуоресценции неокрашенных лейкозных В-клеток со-

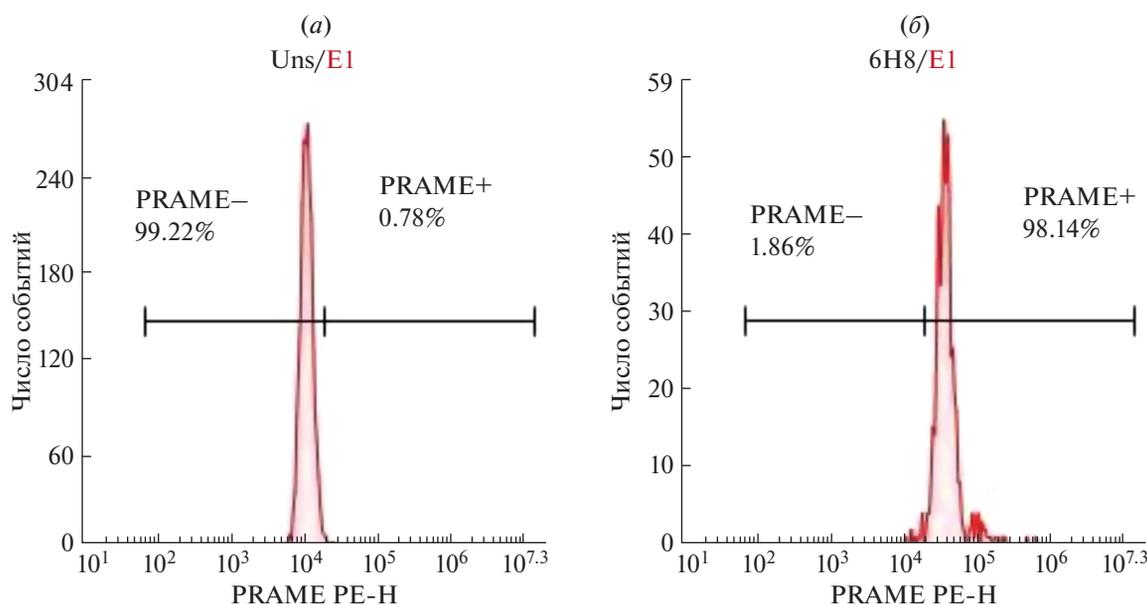


Рис. 3. Пример окрашивания клеток mel P антителом 6H8, меченным сульфо-Су3: (а) – неокрашенные клетки; (б) – окрашенные клетки.

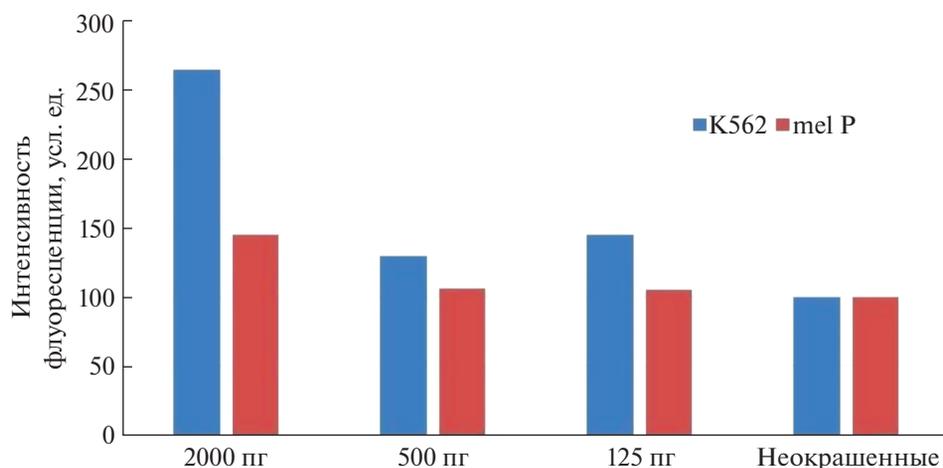


Рис. 4. Интенсивность флуоресценции клеток K562 и mel P, окрашенных сульфо-Су3-меченым антителом 6H8. Антитело добавляли в концентрациях 2000, 500 и 125 пг на пробу.

ставила 183 ед. Окрашенные лимфоциты обладали интенсивностью флуоресценции на уровне 261 ед. Это позволяет сделать вывод, что известный антиген CD20, использующийся в качестве мишени, обладает сопоставимым с белком PRAME уровнем экспрессии на клеточной мембране.

Мы наблюдали еще одну особенность, которую нужно учитывать при определении поверхностной локализации PRAME — возможность принять цитоплазматический белок за мембранный. Это может произойти в случае повреждения мембраны погибших клеток во время центрифугирования при пробоподготовке. В этом случае

цитоплазма, богатая белком PRAME, окрашивается, и такие клетки имеют интенсивный флуоресцентный сигнал (рис. 5).

Избежать подобного можно при использовании ДНК-тропных интеркалирующих красителей. В нашем исследовании применялся краситель 7-аминоактиномицин D (7-aad), у которого пик эмиссии в спектре флуоресценции находится при 647 нм и отличается от пика эмиссии красителя сульфо-Су3 (550 нм). Применение красителя 7-aad показало, что, действительно, все клетки, дающие интенсивный сигнал при окрашивании Су3-меченым антителом 6H8, окрашивались 7-aad, что

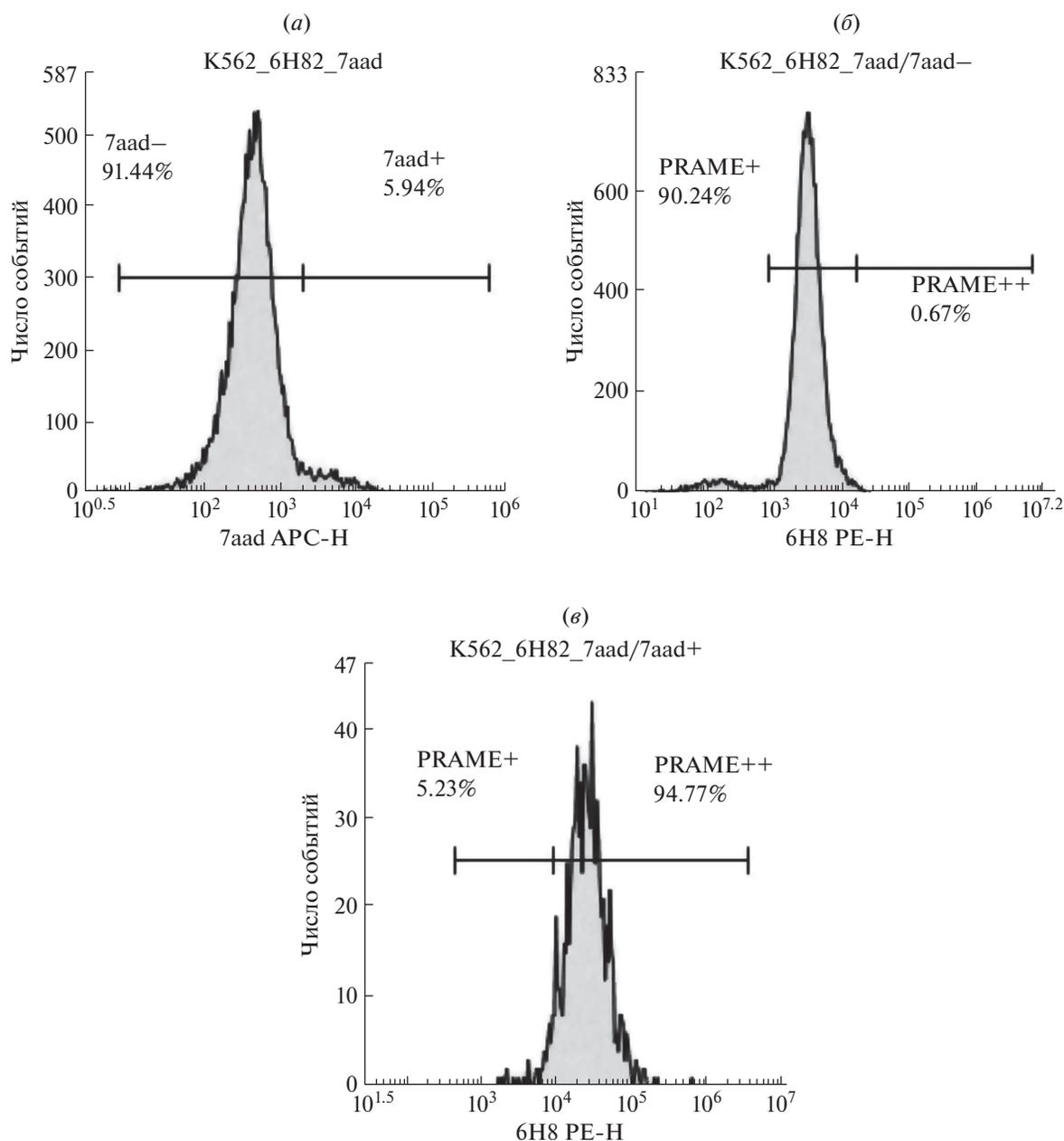


Рис. 5. Пример окрашивания клеток K562 антителом 6H8, меченным сульфо-Су3. (а) – Окрашивание клеток 7aad; (б) – окрашивание 7aad-негативных клеток антителом 6H8; (в) – окрашивание 7aad-позитивных клеток антителом 6H8.

свидетельствует о проницаемости их мембран и опосредованного этим окрашивания цитоплазматического белка PRAME. Таким образом, при оценке активности PRAME на поверхности опухолевых клеток мы рекомендуем всегда использовать интеркалирующий краситель для исключения ложноположительного сигнала.

Проблема может быть также решена посредством создания антител, распознающих только мембранную форму белка PRAME, но не цитоплазматическую. Примером такого решения служит антиген CD3, мембранная экспрессия которо-

го выявляется клоном антител Н1Т3а. При этом клон антител Н1Т3а не связывается с цитоплазматической детерминантой антигена CD3, которая может быть выявлена другим клоном – UCНТ1. На настоящий момент, однако, неизвестно, каким образом лишенный трансмембранного домена белок PRAME удерживается на клеточной мембране, и невозможно определить аминокислотные последовательности белка, к которым можно разработать антитела для выявления мембранной локализации.

Помимо привлечения клеток-эффекторов лекарственные анти-PRAME-антитела могут быть использованы как средства доставки токсинов к опухоли. Данный способ терапии окажется особенно эффективным, если белок PRAME интернализуется после связывания с субстратом. К сожалению, в настоящее время потенциальная возможность использования мембранной формы белка PRAME в качестве мишени при терапии остается неисследованной.

Известно, что количество белков на поверхности клеток может быть различным. Чем больше это количество, тем более эффективным будет использование терапевтических антител. В работе Uckun et al. [24] установлено, что количество антигена CD19 на поверхности В-клеток составляет $\sim 1.9 \times 10^6$ на клетку. Минимальное количество антигена, достаточное для развития иммунного ответа при помощи немодифицированных антител, составляет $\sim 1 \times 10^4$ на клетку, а для коротких антител, связывающих Т-лимфоциты с клетками-мишенями, составляет $\sim 1 \times 10^3$ на клетку. Чтобы показать перспективность использования белка PRAME в качестве мишени, необходимо установить типичное количество данного белка, находящегося на мембране клеток. Согласно нашим наблюдениям, это количество не большое, что может оказаться ограничением для разработки методов PRAME-направленной терапии. С другой стороны, значительное количество белка-мишени на поверхности клетки также может создавать трудности, поскольку каждая клетка будет захватывать очень много антител, и это потребует применения большой концентрации препарата [25].

Обнадёживающим результатом стало определение активности антигена CD20 на поверхности лейкозных клеток больного В-клеточным хроническим лимфоидным лейкозом. Оказалось, что активность белка PRAME и антигена CD20 на опухолевых клетках наблюдается на сопоставимом уровне. Поскольку CD20 — известная мишень для эффективного лекарственного препарата ритуксимаб, а также других, более продвинутых лекарственных препаратов на основе антител, мы предполагаем, что подобного эффекта можно добиться при использовании анти-PRAME-антител.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Общие методы. Для синтеза модифицирующего реагента (I) использованы реактивы: хлористый метилен и триэтиламин (Химмед, Россия), азид натрия и метансульфохлаорид (Fluka, Швейцария), тетраэтиленгликоль (Aldrich, США). Метиленхлорид (DCM) перегоняли над CaH_2 . С остальными растворителями и реагентами работали без

дополнительной очистки. Использовали алкиновое производное красителя Cu_3 (II) (Lumiprobe, Россия). 11-Азидо-3,6,9-триоксаундеканол (III) [20] и натриевую соль этил-*N*-гидроксиацетимидата (IV) [21] получали, как описано в литературе. ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектры регистрировали на ЯМР-спектрометре Inova 300 МГц (Varian, Германия) с отнесением сигналов по пикам остаточных протонов в $\text{DMSO}-d_6$ (2.50 м.д. для ^1H и 39.52 м.д. для ^{13}C). КССВ приведены в герцах (Гц) для соответствующих мультиплетов. Масс-спектры получены на спектрометре Q Exactive HF Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Scientific, США). Тонкослойную хроматографию выполняли на алюминиевых пластинах TLC Silica gel 60 F_{254} (Merck, Германия).

Синтез бифункционального азидо-оксиаминового реагента (I). Этил *N*-(11-Азидо-3,6,9-триоксаундецилокси)-ацетимидат (V). К смеси исходного спирта (III) (200 мг, 0.43 ммоль) и триэтиламина (120 мкл, 0.86 ммоль) в сухом DCM (10 мл) добавляли метансульфонилхлорид (54 мг, 0.47 ммоль). Через 30 мин реакционную массу упаривали, перерастворяли в ТГФ (15 мл) и фильтровали через целлюлозный фильтр. После упаривания растворителя целевое вещество получали в виде желтоватого масла (521 мг, 0.43 ммоль). Его растворяли в смеси изопропилового и *трет*-бутилового спирта (1 : 1, *v/v*, 20 мл), затем к полученной смеси порциями прибавляли натриевую соль этил *N*-гидроксиацетимидата (269 мг, 2.15 ммоль) при постоянном перемешивании. Реакционную массу кипятили 2 ч. Затем осадок мезилата натрия отфильтровывали, растворитель упаривали в вакууме. Целевое вещество выделяли с помощью колоночной хроматографии на силикагеле. Получали бесцветное масло; выход 105 мг (80%). R_f 0.4 (5% MeOH в DCM).

^1H -ЯМР: 4.00–3.93 (м, 4H, N_3CH_2 , $\text{N}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.77–3.57 (м, 12H, OCH_2), 3.43–3.39 (м, 2H, CH_2CH_3), 1.89 (с, 3H, CH_3C), 1.23 (т, J 7.5 Гц, 3H, CH_2CH_3).

^{13}C -ЯМР: 162.17, 72.85, 70.36, 70.34, 70.31, 70.22, 69.73, 68.98, 62.27, 60.53, 14.67, 13.91.

Масс-спектр, m/z ($[M + \text{H}]^+$): рассчитано для $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_5^+$ 305.1819; найдено 305.1816.

***O*-(11-Азидо-3,6,9-триоксаундецилокси)гидроксиламин гидрохлорид (I).** Исходное соединение (V) (500 мг, 1.5 ммоль) растворяли в метаноле (20 мл). При комнатной температуре к раствору добавляли 37%-ный раствор соляной кислоты (350 мкл, 4.1 ммоль). Через 1 ч реакционную смесь упаривали. Получали бесцветное маслообразное вещество (355 мг, 92%). R_f 0.47 (20% MeOH в EtOAc).

^1H -ЯМР: 11.04 (уш. с, 3H, ONH_3), 4.16–4.13 (м, 4H, N_3CH_2 , N_3NOCH_2), 3.65–3.58 (м, 8H, OCH_2), 3.41–3.38 (м, 4H, OCH_2).

^{13}C -ЯМР: 73.99, 70.28, 70.23, 70.20, 70.17, 69.71, 68.19, 50.53.

Масс-спектр, m/z ($[M + \text{H}]^+$): рассчитано для $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_4^+$ 235.1401; найдено 235.139.

Флуоресцентное мечение моноклонального антитела. Использовали ранее разработанные нами антитела 6Н8 [26], распознающие PRAME. Эти антитела были мечены красителем сульфо-Су3 (II). Концентрацию немеченого антитела определяли спектрофотометрически по поглощению на длине волны 280 нм. Раствор антитела 6Н8 (0.50 мл, концентрация 1.7 мг/мл) переводили в ацетатный буфер (20 мМ AcONa, 150 мМ NaCl, pH 5) с помощью гель-фильтрации на колонке NAP-5 (Cytiva, США) по стандартному протоколу производителя. Получили раствор антитела 6Н8 (700 мкл) с концентрацией 0.83 мг/мл. К этому раствору добавляли 100 мкл 160 мМ раствора NaIO_4 . Начальная концентрация периодата натрия в реакционной смеси составляла 20 мМ, начальная концентрация антитела – 0.73 мг/мл. Окисление углеводной части антитела проводили в темноте при комнатной температуре в течение 40 мин. Затем останавливали реакцию добавлением 100 мкл 20%-ного водного раствора глицерина. Полученную реакционную смесь (900 мкл) наносили на гель-фильтрационную колонку NAP-10 (Cytiva, США) и проводили обессоливание по стандартному протоколу в ацетатном буфере (20 мМ AcONa, 150 мМ NaCl, pH 5). Получили раствор окисленного моноклонального антитела (1.1 мл, концентрация 0.47 мг/мл). К аликвоте раствора окисленного антитела (370 мкл) добавляли 70 мМ водный раствор реагента (I) (0.7 мкл). В реакционной смеси начальная концентрация окисленного антитела составляла 3 мкМ, начальная концентрация оксиамиона (I) – 150 мкМ. Реакционную смесь выдерживали 1 ч при комнатной температуре в темноте, наносили на гель-фильтрационную колонку с сефадексом G-50 (Pharmacia, Швеция) и элюировали полученный конъюгат натрий-фосфатным буфером. К полученному раствору азидированного антитела добавляли 50-кратный избыток (40 нмоль) алкинового производного сульфированного красителя Су3 (II). Проводили медь-катализируемую реакцию азид-алкинового циклоприсоединения в присутствии 0.5 мМ эквимольной каталитической смеси CuSO_4 -ТНРТА и 5 мМ аскорбиновой кислоты в течение 3 ч. Реакционную смесь очищали от избытка красителя (II) и низкомолекулярных соединений на сефадексе G-50 в натрий-фосфатном буфере, собирая окрашенную высокомолекулярную фракцию. Концентрацию полученного конъюгата и стехиометрию (нагрузку красителя на одну молекулу антитела) определяли спектрофотометрически по соотношению поглощения при 280 и 550 нм. Спектры поглощения

регистрировали в натрий-фосфатном буферном растворе, содержащем 10% додецилсульфата натрия. Степень мечения антитела составляла величину 6.

Окрашивание клеток мечеными антителами. Для окрашивания цитоплазмы клеток K562 и mel P из коллекции клеточных культур НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России [1, 5, 9] проводили их пермеабиллизацию при помощи раствора для определения уровня экспрессии цитоплазматических белков методом проточной цитометрии (Sony Biotechnology, США) по инструкции, предоставленной разработчиком. В качестве отрицательного контроля использовали клетки линии меланомы мыши B16 из коллекции клеточных культур НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России.

Связывание антител исследовали методом проточной цитометрии на приборе NovoCyte (ACEA Bioscience, США) с конфигурации оптической системы версии (лазеры синий 488 нм и красный 640 нм, детекторы 530/30 FITC, 572/28 PE, 675/30 PerCP/APC и 780/60 PE-Cy7/APC-Cy). Детекцию сигнала от сульфо-Су3 проводили в канале PE. Окрашивание цитоплазмы клеток применялось для валидации работоспособности антител, меченных сульфо-Су3. В качестве контроля использовали немеченые антитела 6Н8 в сопоставимой концентрации, выявляемые вторичными антителами, распознающими иммуноглобулин мыши (SonyBiotechnology, США). Детекцию ДНК-связывающего красителя 7-aad [27] проводили в канале PE-Cy7.

Экспрессию мРНК гена *PRAME* проводили методом количественной ПЦР в реальном времени с использованием специфических праймеров и R6G-меченого зонда на приборе LightCycler (Roche, Швейцария), по методике, применявшейся нами ранее [13].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен новый подход к синтезу бифункционального азидо-оксиаминового реагента с использованием этоксиэтилиденной защитной группы для гидроксилamina. Для получения флуоресцентно меченого моноклонального антитела 6Н8 к белку PRAME проведено периодатное окисление углеводного фрагмента антитела с последующей модификацией бифункциональным азидо-оксиаминовым реагентом и “клик”-реакцией с алкиновым производным сульфированного цианинового красителя Су3. Флуоресцентно меченое антитело охарактеризовано спектрофотометрически, определена стехиометрия модификации.

Впервые получены данные, подтверждающие наличие белка PRAME на поверхности клеток

метастатической меланомы. Мембранная локализация характерна для всех клеток популяции, при этом количество белка PRAME на поверхности каждой из клеток сопоставимо с количеством белка CD20. Подобный уровень экспрессии характерен, например, для антигена CD23 на поверхности активированных В-лимфоцитов [23]. Столь низкий уровень экспрессии белка PRAME объясняет трудности его обнаружения в данном клеточном компартменте, в то время как данных о наличии этого белка в цитоплазме гораздо больше [1, 5, 9].

Мембранная локализация белка PRAME при меланоме также открывает возможность для разработки нового подхода иммунотерапии данного заболевания. Поскольку белок PRAME не представлен в нормальных соматических клетках, но присутствует на клетках меланомы, он может специфически распознаваться лекарственным антителом. Само антитело будет привлекать молекулы системы комплемента либо киллерные клетки, что вызовет лизис клеток меланомы. Для проверки этого предположения необходимо будет разработать гуманизированные антитела к антигену PRAME и провести доклинические исследования.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность студенту биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова Е.А. Кокину за проведение предварительных экспериментов по модификации модельных окисленных поликлональных антител оксиаминовым реагентом (I).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Разработка метода модификации моноклональных антител выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 20-15-00361).

К.А. Сапожникова выражает благодарность за финансовую поддержку Российскому фонду фундаментальных исследований (проект 20-34-90125 “Аспиранты”).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с использованием животных или с участием людей в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wadelin F., Fulton J., McEwan P.A., Spriggs K.A., Emsley J., Heery D.M. // *Mol. Cancer*. 2010. V. 9. P. 226. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-226>
2. Al-Khadairi G., DEcock J. // *Cancers*. 2019. V. 11. P. 984. <https://doi.org/10.3390/cancers11070984>
3. Wei R., Dean D.C., Thanindrataran P., Hornicek F.J., Guo W., Duan Z. // *Cancer Lett*. 2020. V. 479. P. 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.10.024>
4. Xu Y., Zou R., Wang J., Wang Z., Zhu X. // *Cell Proliferat*. 2020. V. 53. P. E12770. <https://doi.org/10.1111/cpr.12770>
5. Epping M.T., Wang L., Edel M.J., Carlée L., Hernandez M., Bernards R. // *Cell*. 2005. V. 122. P. 835–847. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.003>
6. Field M.G., Decatur C.L., Kurtenbach S., Gezgin G., van der Velden P.A., Jager M.J., Kozak K.N., Harbour J.W. // *Clin. Cancer Res*. 2016. V. 22. P. 1234–1242. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2071>
7. Field M.G., Durante M.A., Decatur C.L., Tarlan B., Oelschlager K.M., Stone J.F., Kuznetsov J., Bowcock A.M., Kurtenbach S., Harbour J.W. // *Oncotarget*. 2016. V. 7. P. 59209–59219. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10962>
8. Gerami P., Yao Z., Polsky D., Jansen B., Busam K., Ho J., Martini M., Ferris L.K. // *J. Am. Acad. Dermatol*. 2017. V. 76. P. 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2016.07.038>
9. Pankov D., Sjöström L., Kalidindi T., Lee S.-G., Sjöström K., Gardner R., McDevitt M.R., O'Reilly R., Thorek D.L.J., Larson S.M., Veach D., Ulmert D. // *Oncotarget*. 2017. V. 8. P. 65917–65931. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19579>
10. Ferris L.K., Gerami P., Skelsey M.K., Peck G., Hren C., Gorman C., Frumento T., Siegel D.M. // *Melanoma Res*. 2018. V. 28. P. 478–482. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000478>
11. Wang W.-L., Gokgoz N., Samman B., Andrulis I.L., Wunder J.S., Demicco E.G. // *Modern Pathol*. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41379-020-00687-5>
12. Gerber J.M., Qin L., Kowalski J., Smith B.D., Griffin C.A., Vala M.S., Collector M.I., Perkins B., Zahurak M., Matsui W., Gocke C.D., Sharkis S.J., Levitsky H.I., Jones R.J. // *Am. J. Hematol*. 2011. V. 86. P. 31–37. <https://doi.org/10.1002/ajh.21915>
13. Misyurin V.A., Finashutina Y.P., Turba A.A., Larina M.V., Solopova O.N., Lyzhko N.A., Kesaeva L.A., Kasatkina N.N., Aliev T.K., Misyurin A.V., Kirpichnikov M.P. // *Dokl. Biochem. Biophys*. 2020. V. 492. P. 135–138. <https://doi.org/10.1134/S1607672920030072>
14. Wolfe C.A.C., Hage D.S. // *Anal. Biochem*. 1995. V. 231. P. 123–130. <https://doi.org/10.1006/abio.1995.1511>
15. Kölmel D.K., Kool E.T. // *Chem. Rev*. 2017. V. 117. P. 10358–10376. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00090>
16. Zuberbühler K., Casi G., Bernardes G.J.L., Neri D. // *Chem. Commun*. 2012. V. 48. P. 7100–7102. <https://doi.org/10.1039/C2CC32412A>

17. Meldal M., Tornøe C.W. // *Chem. Rev.* 2008. V. 108. P. 2952–3015.
<https://doi.org/10.1021/cr0783479>
18. Hudak J.E., Barfield R.M., de Hart G.W., Grob P., Nogales E., Bertozzi C.R., Rabuka D. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012. V. 51. P. 4161–4165.
<https://doi.org/10.1002/anie.201108130>
19. Kim C.H., Axup J.Y., Dubrovskaya A., Kazane S.A., Hutchins B.A., Wold E.D., Smider V.V., Schultz P.G. // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. V. 134. P. 9918–9921.
<https://doi.org/10.1021/ja303904e>
20. DeForest C.A., Tirrell D.A. // *Nat. Mater.* 2015. V. 14. P. 523–531.
<https://doi.org/10.1038/nmat4219>
21. Khomutov M.A., Mandal S., Weisell J., Saxena N., Simonian A.R., Vepsäläinen J., Madhubala R., Kochetkov S.N. // *Amino Acids.* 2010. V. 38. P. 509–517.
<https://doi.org/10.1007/s00726-009-0410-0>
22. Hestand N.J., Spano F.C. // *Chem. Rev.* 2018. V. 118. P. 7069–7163.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00581>
23. Barna G., Reiniger L., Tátrai P., Kopper L., Matolcsy A. // *Hematol. Oncol.* 2008. V. 26. P. 167–170.
<https://doi.org/10.1002/hon.855>
24. Uckun F.M., Jaszcz W., Ambrus J.L., Fauci A.S., Gajl-Peczalska K., Song C.W., Wick M.R., Myers D.E., Wad-dick K., Ledbetter J.A. // *Blood.* 1988. V. 71. P. 13–29.
<https://doi.org/10.1182/blood.V71.1.13.13>
25. Powroźnik B., Kubowicz P., Pękala E. // *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2012. V. 66. P. 663–673.
<https://doi.org/10.5604/17322693.1009980>
26. Finashutina Yu.P., Misyurin A.V., Akhlynina T.V., Lyzhko N.A., Krutov A.A., Aksenova E.V., Misyurin V.A., Baryshnikov A.Yu. // *Russ. J. Biother.* 2015. V. 14. P. 29–36.
<https://doi.org/10.17650/1726-9784-2015-14-3-29-36>
27. Chen Chiao Y.C., Gurudath Rao K., Hook J.W., Krugh T.R., Sengupta S.K. // *Biopolymers.* 1979. V. 18. P. 1749–1762.
<https://doi.org/10.1002/bip.1979.360180712>

Detection of PRAME Protein on the Surface of Melanoma Cells Using a Fluorescently Labeled Monoclonal Antibody

K. A. Sapozhnikova*, **A. V. Misyurin****, **N. B. Pestov***, ******, **E. G. Meleshkina*, *******,
S. D. Oreshkov*, *****, **E. P. Ganzhula*, *******, **A. S. Mikhailova*, *******,
V. A. Korshun*, *****, **V. A. Misyurin*******, #, and **V. A. Brylev*, #**

#Phone: +7 (499) 324-60-37, +7 (499) 724-67-15; e-mail: vsevolod.misyurin@gmail.com, v.brylev@yandex.ru

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

**GeneTechnology LLC, ul. Profsoyuznaya 104, Moscow, 117485 Russia

***Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, 141701 Russia

****Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products,
poselok Instituta Poliomyelita 8, poselenie Moskovskij, 108819 Russia

*****Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Miusskaya pl. 9, Moscow, 125047 Russia

*****Moscow State University, Department of Chemistry, Leninskiye Gory 1/3, Moscow, 119991 Russia

*****Peoples' Friendship University of Russia, ul. Miklukho-Maklaya 6, Moscow, 117198 Russia

*****Higher School of Economics, Department of Biology and Biotechnology, ul. Vavilova 7, Moscow, 117312 Russia

*****Gause Institute of New Antibiotics, ul. Bolshaya Pirogovskaya 11, Moscow, 119021 Russia

*****N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Kashirskoye sh. 23, Moscow, 115478 Russia

Determination of the PRAME tumor marker protein expression level is important both for predicting the course of the disease and for monitoring the effectiveness of anticancer therapy. There was obtained fluorescently labeled monoclonal antibody to PRAME by periodate oxidation of glycans followed by modification with a bifunctional azido-oxyamine reagent and a “click” reaction with an alkyne-modified sulfonated cyanine dye Cy3. A new approach to the synthesis of a bifunctional azido-oxyamine reagent using an ethoxyethylidene protecting group for oxyamine is proposed. The labeled antibodies were characterized with UV-Vis absorption spectra and the stoichiometry of the modification was determined. The retention of fluorescent antibodies affinity and the possibility of their use as a diagnostic tool for determining the residual marker after therapy have been demonstrated.

Keywords: monoclonal antibody, fluorescent label, “click” reaction, oxyamine



УДК 577.112.856:577.175.534:543.422

ВЛИЯНИЕ КОРТИЗОЛА И ТЕТРАГИДРОКОРТИЗОЛА НА ВТОРИЧНУЮ СТРУКТУРУ АПОЛИПОПРОТЕИНА А-I ПО ДАННЫМ ИНФРАКРАСНОЙ ФУРЬЕ-СПЕКТРОСКОПИИ

© 2021 г. А. Н. Дударев*, А. Ю. Городецкая*, Т. А. Ткаченко*, И. Ф. Усынин*.*

*Научно-исследовательский институт биохимии, Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Россия, 630117 Новосибирск, ул. Тимакова, 2

Поступила в редакцию 20.11.2020 г.

После доработки 05.12.2020 г.

Принята к публикации 10.12.2020 г.

Изучены особенности взаимодействия стероидного гормона кортизола и его метаболита тетрагидрокортизола (ТГК) с двумя сывороточными белками человека – аполипопротеином А-I (апоА-I) и альбумином (ЧСА). С помощью метода тушения флуоресценции триптофана установлено, что константа связывания гормонов с белками возрастает в ряду комплексов: апоА-I–ТГК < ЧСА–ТГК < апоА-I–кортизол < ЧСА–кортизол. Полученные результаты подтверждают существующие представления о важной роли альбумина и апоА-I в транспорте активных форм стероидных гормонов. Однако использование инфракрасной Фурье-спектроскопии выявило наиболее выраженные и разнонаправленные изменения во вторичной структуре белков под влиянием неактивной формы гормона – ТГК. При инкубации апоА-I в присутствии ТГК наблюдалось дозозависимое снижение содержания α -спиралей и увеличение содержания β -поворотов. В ЧСА под влиянием ТГК, напротив, количество α -спиралей возрастало, а β -поворотов – снижалось. Подобные изменения обнаружены в структуре апоА-I под влиянием кортизола. Вторичная структура ЧСА в присутствии кортизола не изменялась. Предполагается, что конформационные изменения апоА-I под влиянием стероидных гормонов могут приводить к изменению акцепторных и регуляторных свойств данного белка.

Ключевые слова: аполипопротеин А-I, альбумин, кортизол, тетрагидрокортизол, конформация белка, инфракрасная Фурье-спектроскопия

DOI: 10.31857/S0132342321050237

ВВЕДЕНИЕ

Липопротеины высокой плотности (ЛПВП), помимо участия в липидном обмене, оказывают регуляторное влияние на функции клеток различных органов и тканей организма. Так, митогенное действие ЛПВП продемонстрировано на культуре эндотелиальных [1], гладкомышечных [2] и опухолевых клеток [3]. В культуре гладкомышечных клеток ЛПВП усиливают клеточный рост, индуцированный эпидермальным фактором роста, фактором роста тромбоцитов и фактором роста фибробластов [4].

Регуляторные эффекты ЛПВП связывают с наличием на поверхности липопротеиновой частицы белкового компонента – аполипопротеина А-I

(апоА-I) [5]. АпоА-I – высококонсервативный белок, состоящий из амфипатических α -спиралей [6]. Резкое увеличение уровня экспрессии плацентарного лактогена под влиянием апоА-I показано на клетках трофобластов человека [7]. В макрофагах апоА-I стимулирует синтез и секрецию простагландина E2 [8], а в первичной культуре клеток костного мозга активирует пролиферацию прогениторных клеток гранулоцитарного и моноцитарного ростка [9]. Взаимодействие апоА-I с АТФ-зависимым кассетным транспортером (ABCA1) на плазматической мембране фибробластов приводит к активации внутриклеточных сигнальных путей, включая Cdc42 [10].

Ранее нами было обнаружено, что апоА-I, выделенный из плазмы крови человека, стимулирует биосинтез белка в культуре гепатоцитов. Его стимулирующий эффект изменялся при взаимодействии со стероидными гормонами. Прединкубация апоА-I с кортизолом снижала стимулирующий эффект апоА-I, в то время как восстановленная форма кортизола – тетрагидрокортизол (ТГК) – усиливала эффект апоА-I [11]. Механизм

Сокращения: апоА-I – аполипопротеин А-I; ЛПВП – липопротеины высокой плотности; НПВО – нарушенное полное внутреннее отражение; НС – неупорядоченная структура; ТГК – тетрагидрокортизол; ЧСА – сывороточный альбумин человека.

Автор для связи: (тел.: +7 (913) 461-43-78; +7 (383) 335-97-35; эл. почта: ivan.usynin@niibch.ru).

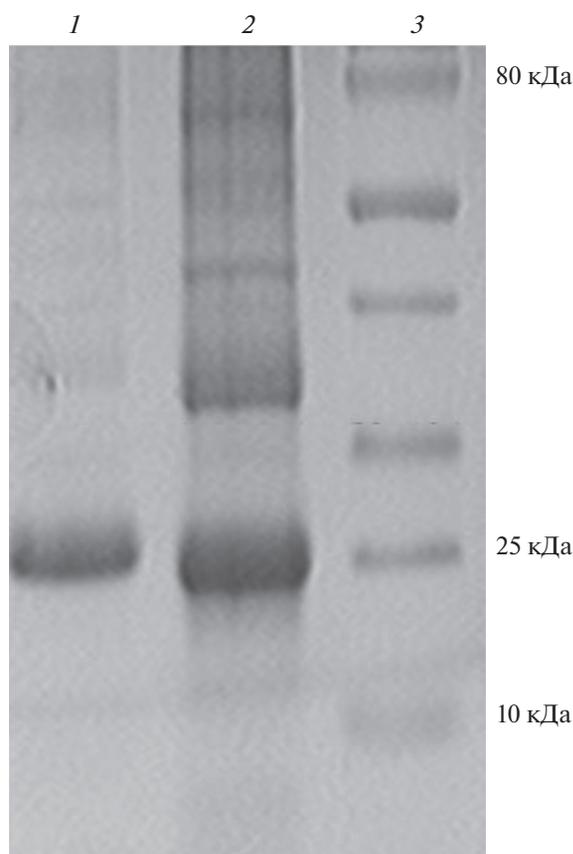


Рис. 1. Электрофоретический анализ в 10%-ном ПААГ очищенного апоА-I и суммарной фракции ЛПВП, выделенных из плазмы крови человека с помощью изоплотного ультрацентрифугирования в растворе КВг. Дорожки: 1 – апоА-I; 2 – ЛПВП; 3 – маркер масс белков (10–250 кДа).

обнаруженного явления остается неясным. Предполагается, что апоА-I выполняет роль переносчика гормонов в ядро клетки, где восстановленная форма гормона усиливает экспрессию генов с последующей активацией биосинтеза белка [12]. Однако не исключено, что взаимодействие апоА-I со стероидными гормонами, отличающимися по своей структуре, может сопровождаться конформационными перестройками, приводящими к изменению регуляторных свойств данного белка.

Цель данной работы – с помощью ИК-Фурье-спектроскопии изучить особенности изменения вторичной структуры апоА-I и сывороточного альбумина человека (ЧСА) под влиянием кортизола и его метаболита ТГК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ собственной флуоресценции белков широко используется для изучения механизмов связывания различных лигандов с белками [13–16]. Из трех флуоресцирующих аминокислот (трипто-

фан, тирозин, фенилаланин) наиболее выраженной флуоресценцией в ультрафиолетовой области спектра обладает триптофан, который обуславливает ~90% всей белковой флуоресценции. Флуоресцентные свойства триптофана крайне чувствительны к изменению его микроокружения. Поэтому комплексообразование с низкомолекулярными лигандами и макромолекулами сопровождается значительными изменениями спектра флуоресценции белков [13, 14].

С использованием метода тушения (снижения) флуоресценции триптофана [13] нами было исследовано взаимодействие стероидного гормона кортизола и его восстановленной формы ТГК с апоА-I. Для сравнения в аналогичных условиях анализировали взаимодействие стероидных гормонов с ЧСА. Как известно, аминокислотная цепь апоА-I (28 кДа) состоит из 234 остатков, включая четыре триптофановых остатка [17]. ЧСА (66.4 кДа) представляет собой глобулярный белок, состоящий из 585 а.о., включая один остаток триптофана (Trp214) [18]. В работе использовали коммерческий препарат ЧСА (Sigma, США). Для выделения нативного апоА-I применяли метод делипидирования свежесыведенных ЛПВП с помощью смеси бутанола и диизопропилового эфира [19]. Данный способ, в отличие от широко распространенного метода делипидирования плазменных липопротеинов с помощью смеси этанола и диэтилового эфира, позволяет избежать денатурации белка и, следовательно, сохранить в большей степени их исходную (нативную) структуру. Как видно из рис. 1, используемый нами метод позволяет получить гомогенный препарат апоА-I, очищенный от остальных белков, содержащихся в исходной фракции ЛПВП.

Анализ спектральных свойств показал, что исходные спектры флуоресценции апоА-I и ЧСА имеют максимумы при 336 и 333 нм соответственно (рис. 2). При регистрации спектров в присутствии возрастающих концентраций гормонов максимум спектра флуоресценции апоА-I не изменялся, в то время как спектр флуоресценции ЧСА сдвигался в коротковолновую область (рис. 2). Наблюдаемое снижение интенсивности флуоресценции белков в ответ на увеличение концентрации гормонов свидетельствует о формировании комплексов гормон–белок, что сопровождается конформационными изменениями белка [20]. В нашем случае наибольшее снижение флуоресценции триптофана обнаружено у обоих белков под влиянием кортизола.

Расчет констант связывания (K_b) гормонов проводили с помощью уравнения Штерна–Фольмера: $F_0/F = 1 - K_b [Q]$. Для определения K_b измеряли интенсивность флуоресценции белка в отсутствие (F_0) и в присутствии (F) различных концентраций $[Q]$ кортизола или ТГК, но при по-

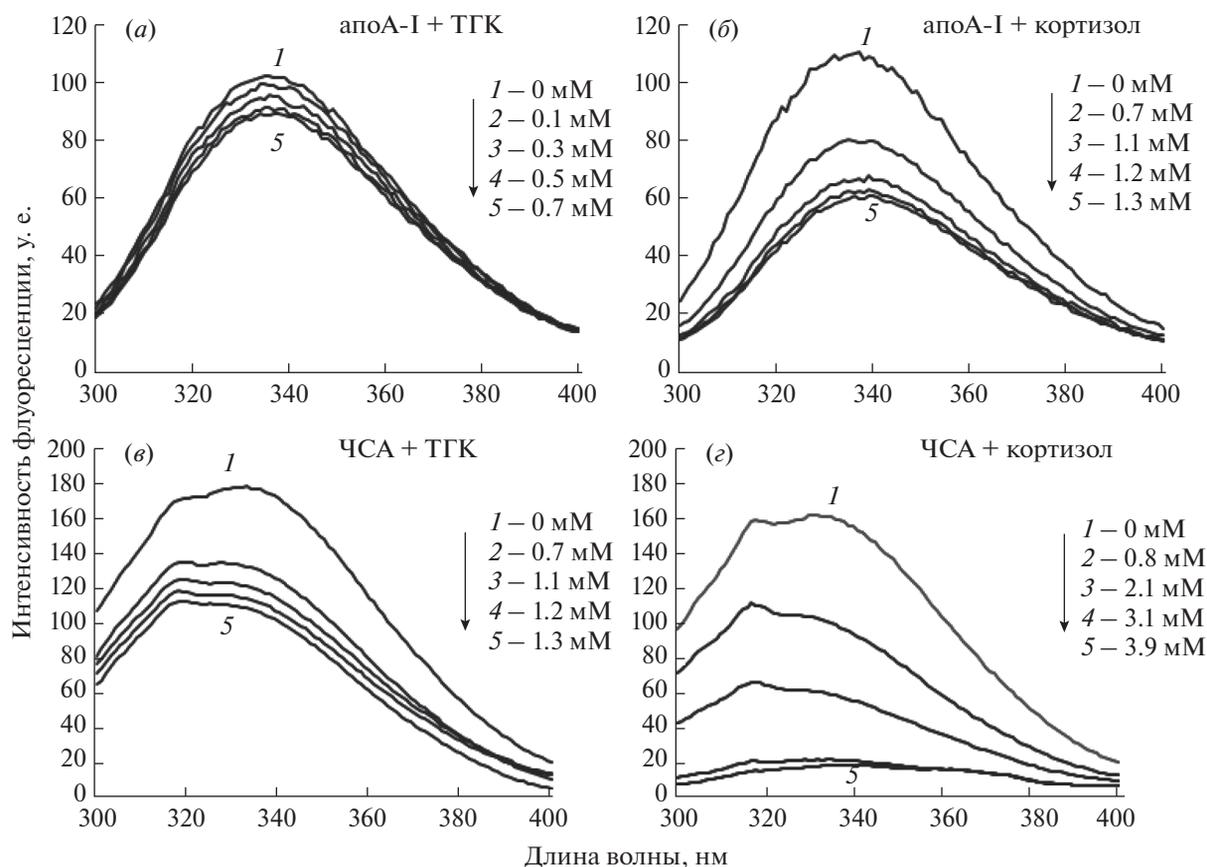


Рис. 2. Влияние ТГК (а, в) и кортизола (б, г) на собственную триптофановую флуоресценцию апоА-I (0.1 мг/мл) и ЧСА (0.1 мг/мл).

стоянной концентрации белка [13]. Прямолинейная зависимость в координатах Штерна–Фольмера указывает на существование в растворе одного типа флуорофоров, одинаково доступных для тушителя (рис. 3). На основании кривых тушения флуоресценции триптофана были рассчитаны константы связывания кортизола с апоА-I и ЧСА, которые составили $(1.0 \pm 0.1) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ и $(2.0 \pm 0.4) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ соответственно. В отличие от кортизола, его восстановленная форма вызывала менее выраженные изменения в спектрах обоих белков. Константа связывания ТГК с апоА-I составила $(3.1 \pm 0.4) \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, а с ЧСА – $(8.2 \pm 0.9) \times 10^2 \text{ M}^{-1}$.

Различия, обнаруженные между влиянием гормонов на спектральные характеристики белков, можно объяснить разной способностью гормонов проникать во внутренние области белков. Незначительное снижение флуоресценции апоА-I под влиянием ТГК, вероятно, связано с тушением остатков триптофана преимущественно на поверхности данного белка и отражает неспособность данной формы гормона проникать во внутренние области белка. В целом полученные результаты свидетельствуют о том, что констан-

та связывания гормонов с белками возрастает в ряду комплексов: апоА-I–ТГК < ЧСА–ТГК < апоА-I–кортизол < ЧСА–кортизол. Полученные результаты подтверждают существующие в литературе представления о важной роли альбумина [16] в транспорте активной формы стероидного гормона кортизола.

Как известно, взаимодействие лиганда с белком может сопровождаться конформационными изменениями последнего. Например, изменение вторичной структуры ЧСА в сторону снижения доли α -спиралей зарегистрировано при его взаимодействии с тестостероном [21], дексаметазоном [19], прогестероном [22], тритерпеноидами [23] и противоопухолевым препаратом цисплатином [24]. Противоположные изменения в сторону увеличения доли α -спиралей и β -слоев зарегистрировано при взаимодействии ЧСА с *транс*-ресвератролом [25]. Учитывая тот факт, что апоА-I выполняет не только транспортные [5], но и важные регуляторные функции [9, 10], нами было исследовано влияние кортизола и ТГК на вторичную структуру апоА-I.

Анализ соотношения элементов вторичной структуры белка проводили с помощью метода

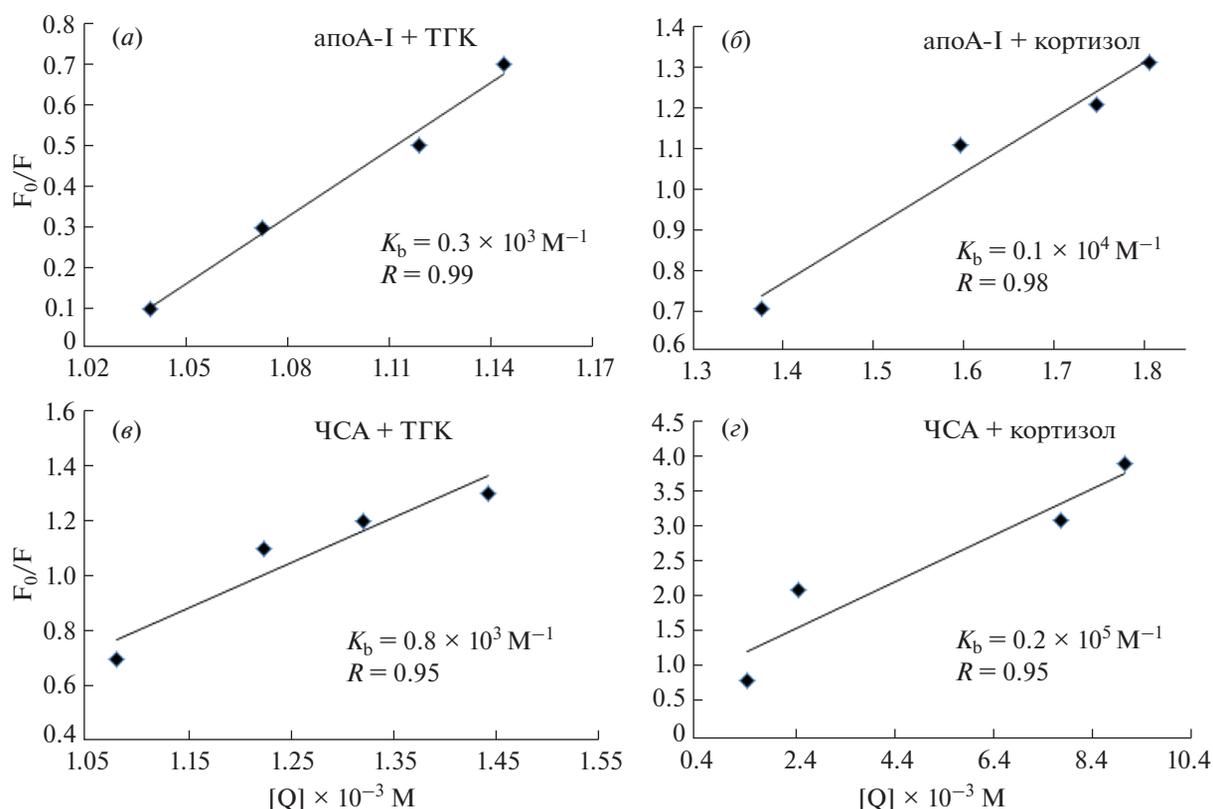


Рис. 3. Графики Штерна–Фольмера для концентрационного тушения триптофановой флуоресценции апоА-I (а, б) и ЧСА (е, з) добавлением различных концентраций кортизола (б, з) и ТКГ (а, е). По оси ординат – отношение максимальной флуоресценции белка в отсутствие лиганда $[F_0]$ к интенсивности флуоресценции белка после добавления лиганда $[F]$. По оси абсцисс – концентрация лигандов $[Q]$. R – коэффициент корреляции Пирсона.

ИК-Фурье-спектроскопии в области спектра амид I ($1600\text{--}1700 \text{ см}^{-1}$). Данная область спектра – наиболее информативна и чувствительна к изменениям конформации полипептида за счет вклада валентных колебаний связей $\text{C}=\text{O}$ [26, 27]. При анализе полосы амид I с помощью метода нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) использовали следующие интервалы положения пиков второй производной: α -спирали – от 1660 до 1649 см^{-1} , β -слои – от 1695 до 1680 см^{-1} и $1637\text{--}1614 \text{ см}^{-1}$, β -повороты – от 1679 до 1675 см^{-1} и от 1674 до 1664 см^{-1} , неупорядоченные структуры – от 1648 до 1638 см^{-1} [25, 28].

Одно из ограничений данного метода – сильное поглощение воды в области спектра амид I. Использование тяжелой воды (D_2O) вместо H_2O позволяет предотвратить вклад растворителя в спектр белка, однако не решает проблему полностью, поскольку D_2O может оказывать влияние на нативную структуру белка [29]. В последние годы получил широкое распространение метод НПВО, позволяющий снизить до минимума влияние растворителя на измерение спектра белков [30]. Кроме того, современные приборы за счет высокой чувствительности позволяют вычитать

вклад растворителя в спектр белка. Проведенное нами сравнение спектров раствора ЧСА, приготовленного на D_2O и H_2O , не выявило значительных различий между этими образцами по соотношению элементов вторичной структуры ЧСА (табл. 1). Учитывая данный факт, все дальнейшие исследования были проведены с водными растворами белков, содержащими фосфатный буфер (рН 7.4).

Согласно данным рентгеноструктурного анализа, вторичная структура ЧСА содержит α -спирали (68.8%), β -слои (7.3%), β -повороты (2.1%) и неупорядоченные структуры (21.8%) [31]. Однако данные о соотношении элементов вторичной структуры белков, полученные с помощью ИК-спектроскопии, могут существенно отличаться от этих значений. Так, количество α -спиралей в структуре альбумина, по данным разных авторов, колеблется от 47 до 70% [32]. Эти противоречия, вероятно, связаны с особенностями используемых в разных лабораториях методов регистрации и анализа ИК-спектров. Кроме того, результаты анализа вторичной структуры в значительной степени зависят от исходной конформации ис-

Таблица 1. Содержание элементов вторичной структуры ЧСА (7.5 мг/мл) в растворе дейтерия (D₂O) и воды (H₂O) по данным ИК-Фурье-спектроскопии

Растворитель	Соотношение элементов вторичной структуры ЧСА, %			
	α -спирали	β -слои	β -повороты	неупорядоченные структуры
D ₂ O	52 ± 3	16 ± 3	15 ± 2	17 ± 3
H ₂ O	48 ± 2	20 ± 3	12 ± 2	20 ± 3

Таблица 2. Влияние кортизола на содержание элементов вторичной структуры ЧСА и апоА-I по данным ИК-Фурье-спектроскопии

Элементы вторичной структуры белка	Содержание элементов вторичной структуры белка, %							
	ЧСА				апоА-I			
	Концентрация кортизола, М				Концентрация кортизола, М			
	0 (контроль)	5 × 10 ⁻⁸	5 × 10 ⁻⁷	5 × 10 ⁻⁶	0 (контроль)	5 × 10 ⁻⁸	5 × 10 ⁻⁷	5 × 10 ⁻⁶
α -Спираль	47 ± 2	49 ± 3	49 ± 2	50 ± 4	45 ± 2	50 ± 4	49 ± 2	53 ± 3*
β -Слой	21 ± 1	22 ± 2	20 ± 2	18 ± 3	14 ± 3	17 ± 2	14 ± 2	13 ± 3
β -Повороты	10 ± 2	11 ± 2	8 ± 4	13 ± 2	21 ± 3	21 ± 2	19 ± 3	15 ± 2*
Неупорядоченные структуры	22 ± 2	18 ± 3	23 ± 2	19 ± 2	20 ± 3	12 ± 4	18 ± 1	19 ± 3

* Статистически значимые различия по сравнению с соответствующим контролем ($p < 0.05$).

пользуемых белков, концентрации и способа их подготовки для анализа.

Проведенный нами анализ водного раствора ЧСА (Sigma, США) с помощью ИК-Фурье-спектроскопии выявил следующее соотношение элементов вторичной структуры: α -спирали – 47 ± 2%, β -слои – 21 ± 1%, β -повороты – 10 ± 2%, неупорядоченные структуры – 22 ± 2% (табл. 2). Подобная доля α -спиральных участков и неупорядоченных структур обнаружена в структуре апоА-I. Однако у апоА-I, по сравнению с ЧСА, содержание β -слоев было в 1.5 раза меньше, а β -повороты – в 2.1 раза больше (табл. 2).

Для изучения влияния гормонов на структуру белков использовали аликвоты белков, приготовленные на фосфатном буфере (рН 7.4). Раствор белка (7.5 мг/мл) инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в присутствии стероидных гормонов в конечной концентрации 5 × 10⁻⁸, 5 × 10⁻⁷ и 5 × 10⁻⁶ М. Контрольные пробы инкубировали параллельно в присутствии соответствующей концентрации растворителя. Для количественного определения соотношения элементов вторичной структуры белка на алмазный кристалл ИК-спектрометра наносили 20 мкл полученной смеси и проводили запись ИК-спектра.

При инкубации апоА-I в присутствии 5 × 10⁻⁶ М кортизола наблюдалось увеличение доли α -спи-

ралей на 8% ($p < 0.05$) и снижение доли β -поворотов на 6% ($p < 0.05$) (табл. 2). ТГК, в отличие от кортизола, вызывал в структуре апоА-I увеличение доли β -поворотов на 7% ($p < 0.05$) за счет уменьшения доли α -спиральных участков на 9% ($p < 0.05$) (табл. 3). При этом доля β -слоев и неупорядоченных структур в апоА-I практически не изменялась под влиянием как кортизола, так и ТГК. При инкубации ЧСА в присутствии 5 × 10⁻⁶ М ТГК (табл. 3) наблюдалось увеличение доли α -спиралей на 10% ($p < 0.05$) и снижение доли β -поворотов на 5%. Однако не обнаружено статистически значимых изменений в структуре ЧСА при его инкубации в присутствии всех исследуемых концентраций кортизола, а также в структуре апоА-I в присутствии 5 × 10⁻⁸ и 5 × 10⁻⁷ М кортизола (табл. 2). Полученные результаты свидетельствуют о разнонаправленных изменениях в структуре апоА-I под влиянием кортизола и его восстановленной формы – ТГК. Возрастание доли α -спиральных участков характерно для комплексов апоА-I–кортизол и ЧСА–ТГК, в то время как снижение доли этих структур – только для комплекса апоА-I–ТГК. Учитывая существующие представления о механизмах образования вторичной структуры белка [33], можно предположить, что наблюдаемое увеличение доли β -структур в апоА-I под действием ТГК приводит к функциональной стабилизации белка.

Таблица 3. Влияние ТГК на содержание элементов вторичной структуры ЧСА и апоА-I по данным ИК-Фурье-спектроскопии

Элементы вторичной структуры белка	Содержание элементов вторичной структуры белка, %							
	ЧСА				апоА-I			
	Концентрация ТГК, М				Концентрация ТГК, М			
	0 (контроль)	5×10^{-8}	5×10^{-7}	5×10^{-6}	0 (контроль)	5×10^{-8}	5×10^{-7}	5×10^{-6}
α -Спирали	48 ± 2	52 ± 3	51 ± 3	58 ± 3*	46 ± 2	40 ± 3	38 ± 3	37 ± 3*
β -Слой	20 ± 2	18 ± 4	21 ± 2	17 ± 3	16 ± 3	22 ± 3	24 ± 3	21 ± 2
β -Повороты	12 ± 2	13 ± 3	11 ± 3	7 ± 3*	20 ± 3	23 ± 2	24 ± 3	27 ± 2*
Неупорядоченные структуры	20 ± 3	17 ± 3	17 ± 2	18 ± 2	18 ± 2	15 ± 4	14 ± 2	15 ± 3

* Статистически значимые различия по сравнению с соответствующим контролем ($p < 0.05$).

Механизм взаимодействия исследованных нами гормонов с апоА-I остается неизученным. Предполагается, что связывание стероидных гормонов с белками происходит с участием водородных связей между атомами белка и полярными группами гормона, а также с помощью гидрофобных и гидрофильных связей [21].

Как видно из представленных на рис. 4 данных, наиболее выраженное влияние на область амид I обоих белков оказывает ТГК. При этом его влияние на структуру ЧСА имеет характер компактизации (увеличение доли α -спиралей), в то время как на апоА-I – характер декомпактизации (увеличение доли β -поворотов). Как известно, β -повороты участвуют в формировании механизмов молекулярного распознавания, белок-белковых и белок-нуклеиновых взаимодействий [34]. Исследования, выполненные на моделях пептидов с точечными аминокислотными заменами, показали, что в процессе фолдинга и рефолдинга β -повороты активно содействуют правильному сворачиванию белка за счет сближения фланкирующих регионов аминокислотных участков белковой глобулы [35]. При удалении центрального β -поворота белки теряют способность взаимодействовать с лигандом [36]. На долю β -поворотов в поверхностном слое глобулярного белка может приходиться до 30% [37]. АпоА-I относится к белкам со средним уровнем глобулярности [38]. По данным ИК-Фурье-спектроскопии, в составе апопротеинов липопротеинов высокой плотности содержится ~32% β -поворотов [28]. АпоА-I, в отличие от альбумина, обладает большей липофильностью и относительно высокой конформационной лабильностью [38].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что апоА-I не вносит существенный вклад в транспорт ТГК, но при его взаимодействии с этим метаболитом внутриклеточно или в биологических жидкостях может происходить измене-

ние конформации апоА-I. Ранее нами было обнаружено, что взаимодействие ТГК с апоА-I усиливает стимулирующий эффект апоА-I на биосинтез белка в культуре гепатоцитов [11]. Можно предположить, что появление гидроксильной группы в кольце А в процессе биотрансформации кортизола в ТГК оказывает значительное влияние на взаимодействие ТГК с аминокислотными остатками, что, в свою очередь, приводит к изменению вторичной структуры и регуляторных свойств апоА-I. Следует заметить, что биотрансформация кортизола в ТГК, а также поглощение и ресекреция апоА-I в окружающую среду наиболее активно протекают в одной и той же клетке – макрофаге. Кроме того, макрофаги способны сами синтезировать [39] и, вероятно, секретируют данный белок, обладающий важными регуляторными свойствами [11].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. В работе использовали ЧСА (код А4327; Sigma, США), диизопропиловый эфир (Sigma, США), кортизол (Serva, Германия), ТГК (Research Plus Inc., США), ДМСО (Panreac, Испания). Остальные реактивы имели категорию о.с.ч. или х.ч.

Выделение апоА-I. Липопротеины выделяли из плазмы крови человека методом изоплотностного ультрацентрифугирования в растворе КВг в присутствии 3 мМ ЭДТА- Na_2 на центрифуге Optima L-90K (Beckman Coulter, США) с использованием углового ротора 70.1 Ti при 105000 g [40]. Полученную фракцию ЛПВП диализовали против фосфатно-солевого буфера (PBS) при 4°C в течение 24 ч. Для получения нативного апоА-I проводили делипидирование ЛПВП в неденатурирующих условиях смесью бутанола и диизопропилового эфира [17]. Очистку апоА-I осуществляли методом высаливания сульфатом ам-

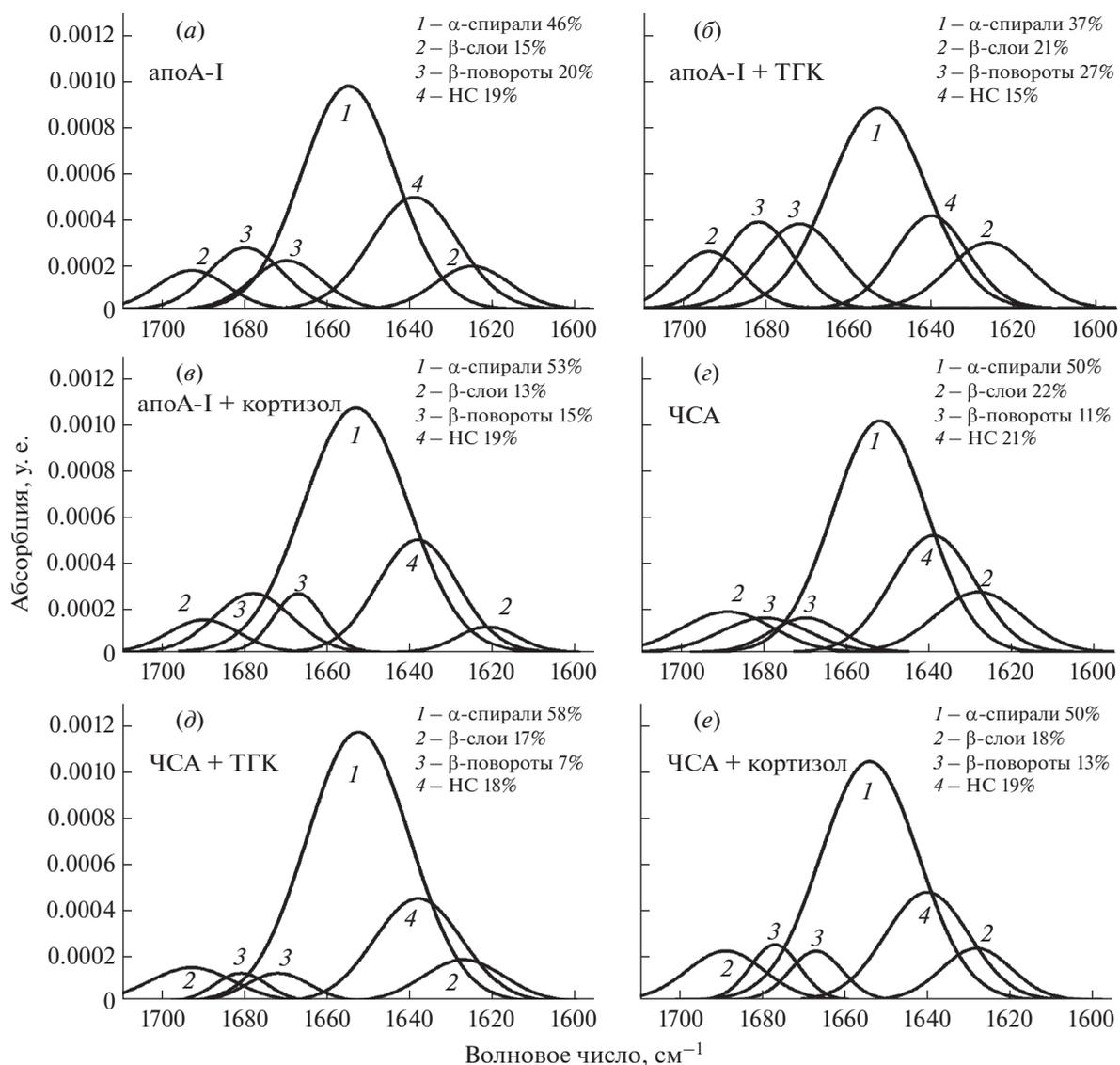


Рис. 4. Разложение полосы амид I по гауссовым компонентам для апоА-I (а), ЧСА (г), а также их комплексов с 5×10^{-6} М ТГК (б, д) и 5×10^{-6} М кортизолом (в, е). НС – неупорядоченные структуры.

мония с последующим растворением белка в 6 М мочеvine и его ренатурацией с помощью диализа против PBS (pH 7.4) в течение 24 ч [41]. Чистоту выделенного апоА-I проверяли с помощью электрофореза в ПААГ, используя набор белковых маркеров, содержащих высокоочищенные рекомбинантные белки с молекулярной массой 10–250 кДа (СибЭнзим, Россия). Концентрацию белка определяли по методу Лоури, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Флуоресцентный анализ. Константы связывания гормонов с апоА-I и ЧСА определяли методом тушения флуоресценции триптофана [13]. Для этой цели измеряли интенсивность флуоресценции раствора белка в отсутствие и в присут-

ствии возрастающих концентраций гормонов, выступающих в качестве тушителей флуоресценции. Титрование проводили в термостатируемой (37°C) кварцевой кювете, содержащей 100 мкг белка в 1 мл PBS (pH 7.4). После добавления каждой аликвоты гормона к раствору белка содержимое кюветы интенсивно перемешивали и проводили измерение в течение 3 мин. Флуоресценцию триптофановых остатков белка регистрировали на спектрофлуориметре RF-5301 (Shimadzu, Япония) при длине волны возбуждения 280 нм и испускания (эмиссии) в диапазоне 300–500 нм. Стоковые растворы гормонов готовили в смеси спирта и ДМСО (в соотношении 1 : 1). Максимальная концентрация растворителя в растворах, содержащих белок и гормон, при проведении

флуоресцентного анализа не превышала 5%. Вклад растворителя без гормона в интенсивность флуоресценции составлял не более 1.5% и не изменялся в исследуемом диапазоне волн 300–500 нм.

Инфракрасная спектроскопия. Влияние гормонов на вторичную структуру апоА-I и ЧСА исследовали методом нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) [42] с использованием приставки Smart Orbit на ИК-Фурье-спектрометре Nicolet 6700 (Thermo Scientific, США). Для этого аликвоты белка (7.5 мг/мл) в PBS (рН 7.4) инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в отсутствие или в присутствии стероидных гормонов в конечной концентрации 5×10^{-8} , 5×10^{-7} и 5×10^{-6} М. Для количественного определения соотношения элементов вторичной структуры белка на алмазный кристалл приставки Smart Orbit наносили 20 мкл смеси. Спектры регистрировали по 7 раз в диапазоне частот 4000–900 см^{-1} , 250 сканирований с разрешением 4 см^{-1} . Оптические пути прибора постоянно продували сухим воздухом для удаления паров воды. После вычитания из спектра белка спектра буфера, содержащего соответствующую концентрацию гормона или растворителя, проводили разложение области спектра амид I в диапазоне длин волн 1700–1600 см^{-1} , используя методы Фурье-деконволюции и второй производной [28]. Обработку спектров проводили с помощью программы OMNIC, поставляемой с прибором. Разложение спектров на индивидуальные полосы по Гауссу выполняли с использованием программного обеспечения Origin 9.0 [43]. Исследования проведены на оборудовании ЦКП “Спектрометрические измерения” НИИ биохимии, ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины (Новосибирск, Россия).

Статистический анализ. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов, выполненных в трех параллелях. Различия между выборками оценивали с помощью непараметрического *U*-критерия Манна–Уитни и считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время получено много фактов, свидетельствующих об участии апоА-I не только в транспорте холестерина, но и в регуляции внутриклеточных сигнальных путей, с которыми связаны его антиатерогенные, противовоспалительные и антиоксидантные свойства [10]. Ранее нами было показано, что регуляторные эффекты апоА-I зависят от конформационного состояния белка. В данной работе было исследовано влияние биологически активного гормона кортизола и его неактивного метаболита ТГК на вторичную структуру

апоА-I. Для сравнения в аналогичных условиях было исследовано взаимодействие стероидных гормонов с ЧСА. С помощью метода тушения флуоресценции триптофана установлено, что наиболее высокую константу связывания имеют комплексы ЧСА–кортизол и апоА-I–кортизол. Полученные результаты подтверждают существующие представления о важной роли альбумина и апоА-I в транспорте активных форм стероидных гормонов. Однако использование ИК-Фурье-спектроскопии выявило наиболее выраженные и разнонаправленные изменения во вторичной структуре белков под влиянием неактивной формы кортизола – ТГК. При инкубации апоА-I в присутствии ТГК наблюдалось дозозависимое снижение содержания α -спиралей и увеличение содержания β -поворотов. В ЧСА под влиянием ТГК, напротив, количество α -спиралей возрастало, а β -поворотов – снижалось. Подобные изменения обнаружены в структуре апоА-I под влиянием кортизола. Механизмы взаимодействия исследованных нами гормонов с апоА-I остаются неизученными. Однако можно предположить, что конформационные изменения апоА-I, возникающие в процессе образования комплексов апоА-I со стероидными гормонами и их метаболитами, могут приводить к изменению акцепторных и регуляторных свойств данного белка.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 0535-2019-0030).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gospodarowicz D., Massoglia S., Cheng J., Fujii D.K.* // J. Cell. Physiol. 1986. V. 127. P. 121–136. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041270116>
2. *Nofer J.R., Junker R., Pulawski E., Fobker M., Levkau B., Von Eckardstein A., Seedorf U., Assmann G., Walter M.* // J. Thromb. Haemost. 2001. V. 85. P. 730–735. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1615660>
3. *Favre G., Tazi K.A., Le Gaillard F., Bennis F., Hachem H., Soula G.* // J. Lipid Res. 1993. V. 34. P. 1093–1106. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)37696-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)37696-3)
4. *Libby P., Miao P., Ordovas J.M., Schaffer E.J.* // J. Cell. Physiol. 1985. V. 124. P. 1–8. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041240102>

5. *Gordon S.M., Hofmann S., Askew D.S., Davidson W.S.* // Trends Endocrin. Met. 2011. V. 22. P. 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.10.001>
6. *Collet X., Marcel Y.L., Tremblay N., Lazure C., Milne R.W., Perret B., Weech P.K.* // J. Lipid Res. 1997, V. 38. P. 634–644. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)37231-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)37231-X)
7. *Handwerger S., Myers S., Richards R., Richardson B., Turzai L., Moecklyns C., Meyer T., Anantharamahiah G.M.* // Endocrinology. 1995. V. 136. P. 5555–5560. <https://doi.org/10.1210/en.136.12.5555>
8. *Zhou X., Von Eckardstein A.* // J. Huazhong. Univ. Sci. Technolog. Med. Sci. 2002. V. 22. P. 270–272. <https://doi.org/10.1007/BF02896760>
9. *Усынин И.Ф., Дударев А.Н., Городецкая А.Ю., Мирошниченко С.М., Ткаченко Т.А., Ткаченко В.И.* // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2017. Т. 164. № 9. С. 285–288.
10. *Nofer J.R.* // Handb. Exp. Pharmacol. 2015. V. 224. P. 229–256. https://doi.org/10.1007/978-3-319-09665-0_6
11. *Усынин И.Ф., Панин Л.Е.* // Биохимия. 2008. Т. 73. С. 453–468.
12. *Панин Л.Е., Тузиков Ф.В., Тузикова Н.А., Усынин И.Ф., Гимаутдинова О.И.* // Биоорг. химия. 2001. Т. 27. С. 114–119. [*Panin L.E., Tuzikov F.V., Tuzikova N.A., Usynin I.F., Gimautdinova O.I.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2001. V. 27. P. 95–100.] <https://doi.org/10.1023/A:1011381019423>
13. *Lakowicz J.R.* // Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed. Springer, Boston, MA, 2006. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>
14. *Кудряшова Е.В., Гладилин А.К., Левашов А.В.* // Усп. биол. химии. 2002. Т. 42. С. 257–294.
15. *Stroupe S.D., Cheng Su-Li, Westphal U.* // Arch. Biochem. Biophys. 1975. V. 168. P. 473–482.
16. *Поляков Л.М., Суменкова Д.В., Князев Р.А., Панин Л.Е.* // Биомед. химия. 2011. Т. 57. С. 308–313. <https://doi.org/10.18097/pbmc20115703308>
17. *Gursky O., Atkinson D.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 2991–2995. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.7.2991>
18. *Белинская Д.А., Гончаров Н.В.* // Биоорг. химия. 2020. Т. 46. С. 247–260. [*Belinskaja D.A., Goncharov N.V.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 287–298.] <https://doi.org/10.31857/S0132342320030045>
19. *Cham B.E., Knowles B.R.* // J. Lipid. Res. 1976. V. 17. P. 176–181. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)37003-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)37003-6)
20. *Naik P.N., Chimatar S.A., Nandibewoor S.T.* // J. Photochem. Photobiol. B. 2010. V. 100. P. 147–159. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.05.014>
21. *Chanphai P., Vesper A.R., Bariyanga J., Bérubé G., Tajmir-Riahi H.A.* // J. Photochem. Photobiol. B. 2016. V. 161. P. 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.05.015>
22. *Abu Teir M.M., Ghithan J.H., Darwish S.M., Abu-Hadid M.M.* // J. Appl. Biol. Sci. 2011. V. 5. P. 35–47.
23. *Abboud R., Charcosset C., Greige-Gerges H.* // Chem. Phys. Lipids. 2017. V. 207. P. 260–270. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.05.011>
24. *Neault J.F., Tajmir-Riahi H.A.* // Biochim. Biophys. Acta. 1998. V. 1384. P. 153–159. [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(98\)00011-9](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(98)00011-9)
25. *Liu X., Shang Y., Ren X., Li H.* // J. Chem. 2013. V. 2013. P. 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/494706>
26. *Yang H., Yang S., Kong J., Dong A., Yu S.* // Nat. Protoc. 2015. V. 10. P. 382–396. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.024>
27. *Abrosimova K.V., Shulenina O.V., Paston S.V.* // J. Phys. Conf. Ser. 2016. V. 769. P. 1–6. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/769/1/012016>
28. *Krilov D., Balarin M., Kosovic M., Gamulin O., Brnjac-Kraljevic J.* // Spectrochim. Acta A. 2009. V. 73. P. 701–706. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2009.03.015>
29. *Cioni P., Strambini G.B.* // Biophys. J. 2002. V. 82. P. 3246–3253. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75666-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75666-X)
30. *Поляничко А.М., Романов Н.М., Старкова Т.Ю., Костылева Е.И., Чихиржина Е.В.* // Цитология. 2014. Т. 56. № 4. С. 316–322.
31. *Sugio S., Kashima A., Mochizuki S., Noda M., Kobayashi K.* // Protein Eng. Des. Sel. 1999. V. 12. P. 439–444. <https://doi.org/10.1093/protein/12.6.439>
32. *Усольцев Д.А., Ситникова В.Е., Носенко Т.Н., Олехнович Р.О., Успенская М.В.* // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. 2019. Т. 19. С. 586–593. <https://doi.org/10.17586/2226-1494-2019-19-4-586-593>
33. *Бычкова В.Е., Семисотнов Г.В., Балобанов В.А., Финкельштейн А.В.* // Усп. биол. химии. 2018. Т. 58. С. 67–100.
34. *Zhou H.X., Hoess R.H., DeGrado W.F.* // Nat. Struct. Biol. 1996. V. 3. P. 446–451. <https://doi.org/10.1038/nsb0596-446>
35. *Predki P.F., Agrawal V., Brunger A.T., Regan L.* // Nat. Struct. Biol. 1996. P. 54–58. <https://doi.org/10.1038/nsb0196-54>
36. *Marcelino A.M.C., Gierasch L.M.* // Biopolymers. 2008. V. 89. P. 380–391. <https://doi.org/10.1002/bip.20960>
37. *Kong J., Shaoning Y.U.* // Acta Biochim. Biophys. Sin. 2007. V. 39. P. 549–559. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x>
38. *Мишаарин А.Ю.* // Биоорг. химия. 1998. Т. 24. С. 563–585. [*Misharin A.Yu.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 1998. V. 24. P. 497–517.]
39. *Mogilenko D.A., Orlov S.V., Trulioff A.S., Ivanov A.V., Nagumanov V.K., Kudriavtsev I.V., Shavva V.S., Tanyanskiy D.A., Perevozchikov A.P.* // FASEB J. 2012. V. 26. P. 2019–2030. <https://doi.org/10.1096/fj.11-193946>
40. *Mills G.L., Lane P.A., Weech P.K.* // Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. A Guidebook to Lipoprotein Technique. Amsterdam: Elsevier, 1984. P. 18–116.
41. *Jiang L., Hea L., Fountoulakis M.* // J. Chromatogr. A. 2004. V. 1023. P. 317–320. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.10.029>
42. *Oberg K.A., Fink A.L.* // Anal. Biochem. 1998. V. 256. P. 92–106. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2486>
43. *Чихиржина Т.В., Белая И.А., Баранова Ю.Г., Поляничко А.М.* // Вестник СПбГУ. Физика и химия. 2017. Т. 4. С. 42–53. <https://doi.org/10.21638/11701/spbu04.2017.106>

Effects of Cortisol and Tetrahydrocortisol on the Secondary Structure of Apolipoprotein A-I as Measured by Fourier Transform Infrared Spectroscopy

A. N. Dudarev*, A. Y. Gorodetskaya*, T. A. Tkachenko*, and I. F. Usynin*,#

#Phone: (383) 335-97-35; e-mail: ivan.usynin@niibch.ru

*Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Fundamental and Translation Medicine, ul. Timakova 2, Novosibirsk, 630117 Russia

The interaction of the steroid hormone cortisol and its metabolite tetrahydrocortisol (THC) with two serum proteins – apolipoprotein A-I (apoA-I) and human serum albumin (HSA) was studied in aqueous solutions at physiological pH. Using the tryptophan fluorescence quenching method, it was found that the binding constant of hormones to proteins increases in the order: apoA-I–THC < HSA–THC < apoA-I–cortisol < HSA–cortisol. The results confirm the existing point of view that albumin and apoA-I play the important role in the transport of active forms of steroid hormones. However, the use of Fourier transform infrared spectroscopy revealed the most pronounced and multidirectional changes in the secondary structure of proteins under the influence of an inactive form of the hormone – THC. Upon incubation of apoA-I in the presence of THC, a dose-dependent decrease in the content of α -helices and an increase in β -turns were observed. On the contrary, in HSA incubated with THC, the number of α -helices increased, and β -turns decreased. Similar changes were found in the structure of apoA-I incubated with cortisol. The secondary structure of HSA in the presence of cortisol did not change. It is assumed that conformational changes in apoA-I under the influence of steroid hormones can lead to a significant change in the acceptor and regulatory properties of the protein.

Keywords: apolipoprotein A-I, albumin, cortisol, tetrahydrocortisol, protein conformation, Fourier transform infrared spectroscopy



УДК 538.911

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ ТИМИДИНФОСФОРИЛАЗЫ *Escherichia coli* В КОМПЛЕКСЕ С ИНГИБИТОРОМ 3'-АЗИДОТИМИДИНОМ И ФОСФАТОМ

© 2021 г. В. И. Тимофеев*, **, #, Н. Е. Жухлистова*, И. П. Куранова*, **

*Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Россия, 119333 Москва, Ленинский просп., 59

**НИЦ “Курчатовский институт”, Россия, 123098 Москва, пл. Академика Курчатова, 1

Поступила в редакцию 30.12.2020 г.

После доработки 20.01.2021 г.

Принята к публикации 26.01.2021 г.

Методом молекулярной динамики на траектории 50 нс исследовали состояние димерной молекулы тимидинфосфорилазы из *Escherichia coli* в комплексе с неконкурентным ингибитором фермента 3'-азидотимидином и ионом фосфата. В качестве стартовой модели использовали полученные ранее атомные координаты комплекса тимидинфосфорилазы с азидотимидином и сульфатом при разрешении 1.52 Å. Показано, что в данном временном интервале обе субъединицы димерной молекулы фермента функционируют асинхронно, при этом каждая субъединица сохраняет открытую конформацию. Обнаружено, что природа лиганда в нуклеозидном центре влияет на прочность связывания фосфата в фосфатном центре. В комплексе с ингибитором оба лиганда на всем временном интервале остаются связанными с ферментом, в то время как при симуляции поведения тимидинфосфорилазы в присутствии фосфата и субстрата тимидина наблюдается выход фосфата из активного центра. Стабилизирующее влияние азидотимидина на связывание фосфата согласуется с поведением азидотимидина как неконкурентного ингибитора тимидинфосфорилазы.

Ключевые слова: тимидинфосфорилаза, пространственная структура, 3'-азидотимидин, молекулярная динамика

DOI: 10.31857/S0132342321060245

ВВЕДЕНИЕ

Тимидинфосфорилаза (ТФ), относящаяся к семейству II нуклеозидфосфорилаз [1], катализирует обратимый фосфоролитический расщепление пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов и играет центральную роль в их метаболизме, участвуя в запасных путях синтеза природных нуклеозидов [2, 3]. Интерес к изучению структуры и свойств нуклеозидфосфорилаз связан с их вовлеченностью в метаболизм противоопухолевых и противовирусных препаратов – аналогов нуклеозидов. Среди ингибиторов тимидинфосфорилаз особое место занимают аналоги природных нуклеозидов, содержащих заместители в углеводной компоненте, некоторые из них используются непосредственно как противоопухолевые и противовирусные средства [4–6]. Например, аналог нуклеозидов, 3'-азидотимидин, содержащий азидогруппу в рибозном кольце,

применяется как лекарственный препарат при лечении синдрома иммунодефицита человека [7].

Катализируемая ферментом реакция протекает посредством нуклеофильной атаки фосфат-ионом, находящимся в фосфат-связывающем центре фермента, углеродного атома С1' рибозного кольца нуклеозида, расположенного в нуклеозидном центре. Методом рентгеноструктурного анализа установлены пространственные структуры ряда нуклеозидфосфорилаз [8–11]. Пространственная структура тимидинфосфорилазы *Escherichia coli* установлена для апофермента, а также комплексов с субстратами и ингибиторами [12–14]. Молекула тимидинфосфорилазы представляет собой димер из одинаковых субъединиц, каждая из которых имеет двухдоменное строение и состоит из малого α -спирального домена и большого α/β -домена (рис. 1). Активный центр находится в полости между двумя доменами и включает нуклеозид- и фосфат-связывающие сайты. При этом нуклеозидный сайт состоит преимущественно из аминокислотных остатков малого домена, в то время как фосфатный сайт

Сокращения: АЗТ – 3'-азидотимидин; МД – молекулярная динамика; ТФ – тимидинфосфорилаза.

Автор для связи: (эл. почта: tostars@mail.ru).

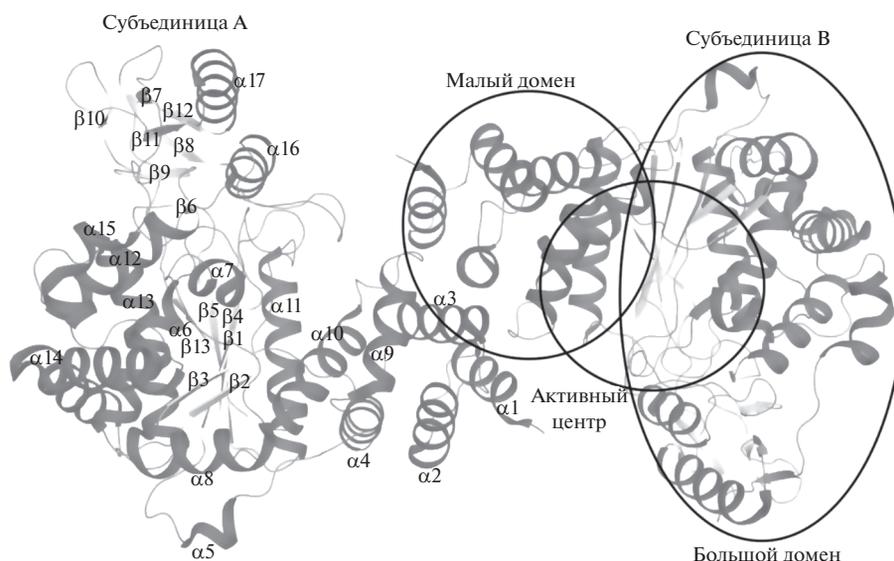


Рис. 1. Пространственная структура димерной молекулы тимидинфосфорилазы. Для одной из субъединиц приведены обозначения элементов вторичной структуры.

расположен около *C*-концевого участка главного β -слоя α/β -домена и включает аминокислотные остатки большого домена. Расстояние между связанными субстратами – ионом фосфата и нуклеозидом – в установленных структурах достаточно велико. Необходимое для протекания реакции сближение субстратов происходит посредством движения доменов и сопровождается переходом фермента из открытой конформации в закрытую. Механизмы этого перехода исследованы недостаточно.

Нами ранее были изучены кинетические параметры фосфорилаза тимидина тимидинфосфорилазой *E. coli* в присутствии 3'-азидотимидина (АЗТ) и показано, что АЗТ, используемый в качестве лекарственного препарата при терапии синдрома иммунодефицита человека, – неконкурентный ингибитор фермента [15]. Пространственная структура кристаллического комплекса тимидинфосфорилазы с АЗТ и сульфатом была установлена при разрешении 1.52 Å [15]. Связывание АЗТ в нуклеозидном центре сопровождалось конформационными изменениями, в результате которых 3'-азидогруппа оказалась погруженной в гидрофобный карман, образованный аминокислотными остатками обоих доменов субъединицы. Такой тип ингибирования был обнаружен в нуклеозидфосфорилазах впервые. Положение АЗТ частично перекрывалось с положением субстрата (тимидина), но при этом ингибитор оказывался повернутым относительно тимидина на 180° вокруг оси, проходящей через 3-й и 6-й атомы азота и углерода пиримидинового кольца. Изменившееся положение атакуемого уг-

леродного атома рибозы относительно ключевых для катализа аминокислотных остатков активного центра объясняет ингибиторное действие АЗТ.

В кристаллической структуре комплекса тимидинфосфорилазы с АЗТ и сульфатом обе субъединицы находятся в открытой конформации, однако открытая конформация может быть обусловлена присутствием межмолекулярных контактов в кристаллической решетке. Цель данной работы заключалась в изучении изменений конформации субъединиц димерной молекулы тимидинфосфорилазы в комплексе с фосфатом и 3'-азидотимидином в условиях отсутствия межмолекулярных контактов. Для этого было исследовано поведение молекулы ТФ и связанных в комплексе лигандов методом молекулярной динамики на временной траектории 50 нс.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе пространственной структуры кристаллического комплекса тимидинфосфорилазы *E. coli* с ингибитором АЗТ и фосфатом было показано, что образование комплекса сопровождается конформационными изменениями и формированием вокруг азидогруппы ингибитора гидрофобного кармана, в образовании которого участвуют аминокислотные остатки обоих доменов субъединиц. При этом сохраняется открытая конформация обеих субъединиц (рис. 1). Однако в кристаллической решетке открытая конформация субъединиц в комплексе ТФ/АЗТ/фосфат может стабилизироваться и межмолекулярными контактами. Анализ кристаллической упаковки

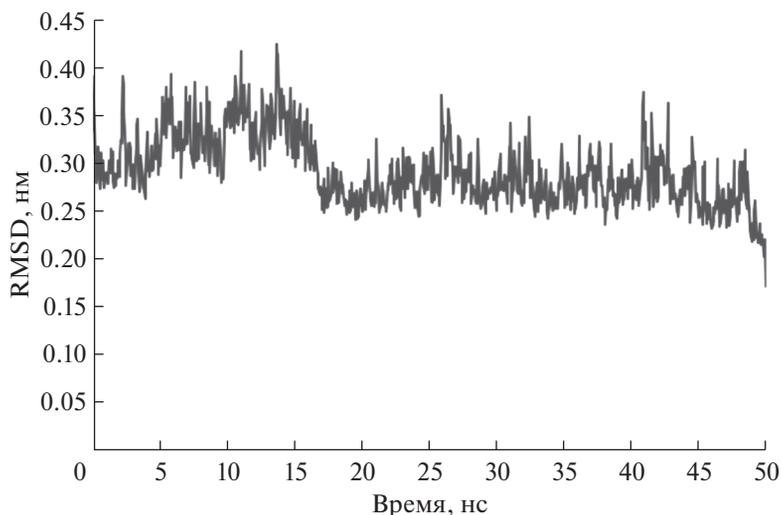


Рис. 2. График зависимости среднеквадратичного отклонения (RMSD) $C\alpha$ -атомов димера тимидинфосфорилазы от времени в комплексе с 3'-азидотимиридином и фосфатом.

комплекса указывает на то, что между субъединицами, связанными операцией симметрии $-y + 1/2, x - 1/2, z - 1/4$, образуются водородные связи, в которых участвуют аминокислотные остатки петель большого домена. Несколько аминокислотных остатков одной из них, подвижной петли 367–381, закрывают полость активного сайта в закрытой конформации. В образовании межмолекулярных связей (операция симметрии $-x, -y, -z + 1/2$) участвуют также аминокислотные остатки Glu20, Asp65 малого домена и His76, Asn78 связывающей домены петли.

Исследование методом молекулярной динамики (МД) на временной траектории 50 нс дает возможность проследить, как меняется конформация субъединиц димерной молекулы фермента (рис. 1) в комплексе с фосфатом и АЗТ в отсутствие межмолекулярных контактов, возникающих в кристаллическом комплексе, и объяснить особенности ингибирования фермента 3'-азидотимиридином.

МД-исследование димера фермента показало, что величины RMSD в начале эксперимента имеют тенденцию к увеличению, но, начиная с момента времени ~ 16 нс (рис. 2), происходит некоторая стабилизация конформационных состояний димера (величины RMSD колеблются в диапазоне ~ 1.3 Å). К концу процесса симуляции значения RMSD начинают уменьшаться (рис. 2).

Изменения конформации субъединиц в молекуле комплекса ТФ при МД-исследовании можно определить по результатам суперпозиций координат $C\alpha$ -атомов исходной молекулы и координат на выбранной точке временной траектории МД 0–50 нс. Суперпозиция моделей димера ТФ в

комплексе с АЗТ и фосфатом, полученных методом молекулярной динамики на временной траектории МД 50 нс с интервалом 0.5 нс (100 фреймов), показана на рис. 3. Полученные данные МД свидетельствуют, что в целом как пространственная структура субъединиц димера, так и положения лигандов (рис. 3) существенно не изменяются.

Сравнение пространственных структур субъединицы А молекулы ТФ в различные моменты МД-эксперимента (11 точек на временной траектории с интервалом 5 нс) со структурой, полученной в результате рентгеноструктурного эксперимента (PDB_ID: 4LHM), не выявило принципиальных различий; значения RMSD не превысили 1.3 Å. Можно предположить, что на всем протяжении 50-нс симуляции субъединица димера, так же как в кристаллической структуре, сохраняет открытую конформацию (рис. 3). При совмещении молекул по $C\alpha$ -атомам двух субъединиц в исходной и конечной точках времени симуляции RMSD составляет ~ 3.0 Å, что может свидетельствовать (учитывая небольшое значение RMSD при сравнении субъединиц А) о том, что нет синхронизации изменения конформаций субъединиц димера.

Значения среднеквадратичных смещений $C\alpha$ -атомов (RMSF) субъединиц димера (рис. 4), свидетельствующих о нестабильности пространственной структуры субъединиц, изменяются в пределах ~ 2 Å, причем в различных субъединицах димера величины и характер флуктуаций разные. При анализе среднеквадратичных флуктуаций $C\alpha$ -атомов аминокислотных остатков в процессе МД оказалось, что наибольшие флуктуации наблюдаются в петлях или смежных с ними α -спира-

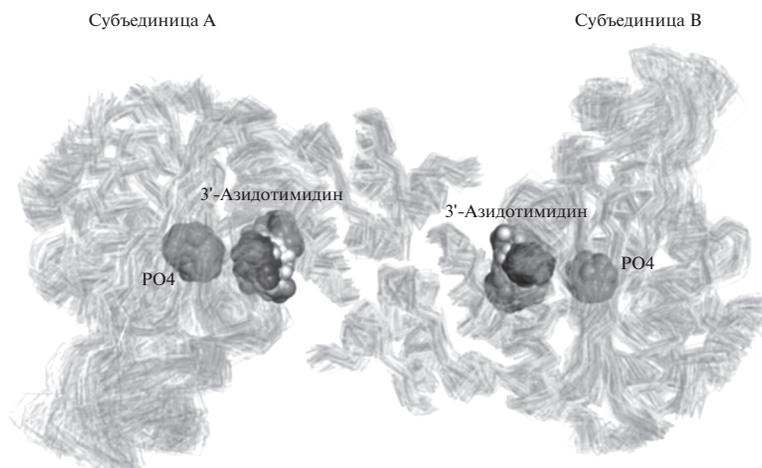


Рис. 3. Суперпозиция моделей димера тимидинфосфорилазы в комплексе с 3'-азидотимидином и фосфатом, полученных методом молекулярной динамики на временной траектории МД 50 нс с интервалом 0.5 нс (100 фреймов).



Рис. 4. Величины среднеквадратичных смещений $C\alpha$ -атомов (RMSF) субъединиц димера тимидинфосфорилазы.

лях и β -лентах. Петли 66–71, 155–160 и 194–197, соединяющие большой и малый домены, испытывают значительные флуктуации. Петли большого домена (264–270, 305–334, 365–390, 393–399), аминокислотные остатки которых участвуют в межмолекулярных водородных связях, наблюдаемых в кристаллической структуре (PDB_ID: 4LHM), также значительно изменяют свои положения по сравнению с исходными, а аминокислотные остатки этих петель – свою конформацию.

Критерием смещения доменов друг относительно друга можно считать изменение величины расстояния между аминокислотными остатками, находящимися в разных доменах. Эти величины отслеживали на симулируемой траектории, характеризующей изменение расстояний между $C\alpha$ -атомами аминокислотных остатков Ile173–Ala373, Asp178–Phe210, Leu117–Arg171, и использовали для оценки конформационного состояния субъединиц в комплексе ТФ/АЗТ/фосфат на симулируемых траекториях. Согласно данным Pug-

mire et al. [8], более короткие расстояния между парами аминокислотных остатков Phe210–Asp178 и Ala373–Ile173 (5.14 и 6.64 Å, PDB_ID: 1BRW) подтверждают закрытую конформацию; расстояния 9.42 и 14.04 Å, наблюдаемые в кристаллической структуре [15] (PDB_ID: 4LHM), соответственно, для Phe210–Asp178 и Ala373–Ile173, – открытую конформацию. Характер сближения остатков Leu117 и Arg171, принадлежащих различным доменам субъединицы ТФ, можно проследить по изменению расстояния $C\alpha_{Leu117} \dots C\alpha_{Arg171}$ (рис. 5) на МД-траектории для структуры комплекса ТФ с АЗТ и ионом фосфата.

Расстояния между $C\alpha$ -атомами остатков Leu117, Arg171 в субъединицах А и В комплекса ТФ с АЗТ и ионом фосфата, судя по графику (рис. 5), в начале симуляции заметно различаются, но различия уменьшаются на протяжении времени симуляции ~16–33 нс (величина расстояний колеблется в основном в пределах 13–16 Å), а затем вновь увеличиваются. Можно отметить периодические сближения пары $C\alpha$ -атомов остатков

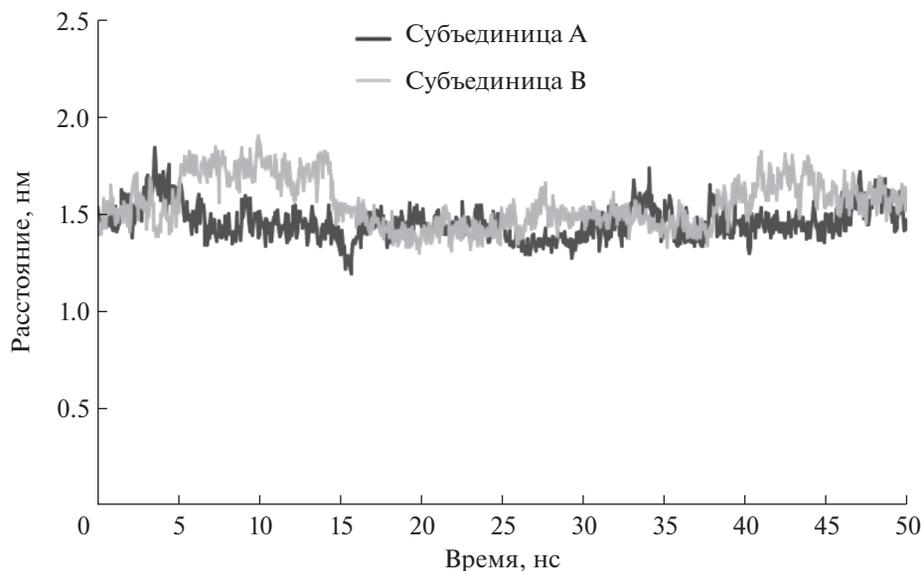


Рис. 5. Изменение расстояния между $C\alpha$ -атомами остатков Leu117 и Arg171 в течение 50-нс симуляции для комплекса тимидинфосфорилазы с ионом фосфата и 3'-азидотимидином.

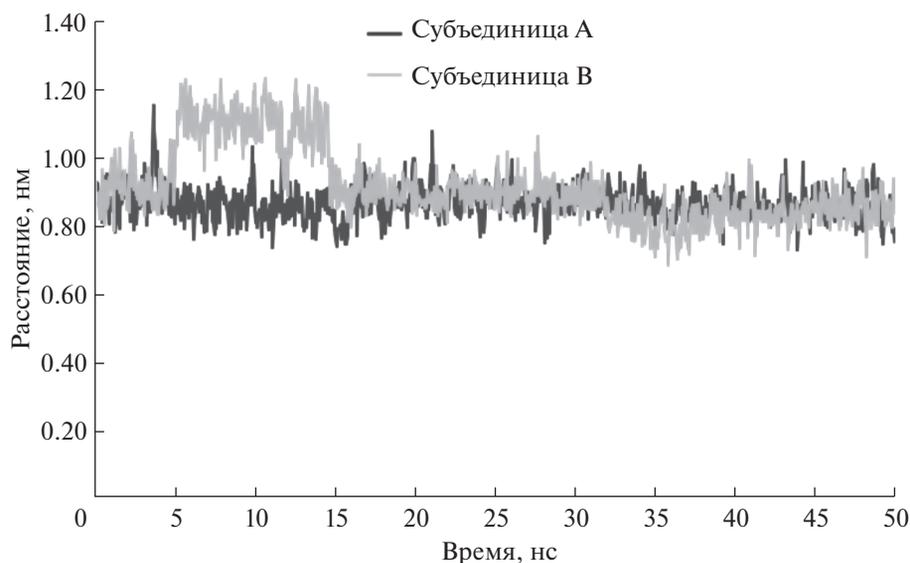


Рис. 6. Изменение расстояния между $C\alpha$ -атомами остатков Asp178 и Phe210 в течение 50-нс симуляции для комплекса тимидинфосфорилазы с ионом фосфата и 3'-азидотимидином.

Leu117 и Arg171 до 13 Å (и даже до ~12 Å в субъединице А в момент времени ~15 нс) в обеих субъединицах; расстояние между соответствующими атомами, наблюдаемое в кристаллическом комплексе ТФ с АЗТ и ионом фосфата, т.е. в открытой конформации, равно 14.2 Å. Синхронизации в изменении этих расстояний в субъединицах фермента, судя по приведенному графику (рис. 5), не наблюдается.

На рис. 6 представлены графики, позволяющие оценить характер изменения расстояний

между $C\alpha$ -атомами остатков Asp178 (малый домен) и Phe210 (большой домен). Периодические сближения пары $C\alpha$ -атомов остатков в обеих субъединицах происходят асинхронно, и процессы сближения доменов в субъединицах явно не согласованы, хотя к концу процесса симуляции характер периодического сближения остатков становится практически одинаковым. Максимально близкое расстояние между $C\alpha$ -атомами составляет >7 Å. В кристаллической структуре пиримидиннуклеозидфосфорилазы из *Bacillus*

Таблица 1. Изменение расстояния между C α -атомами некоторых остатков субъединицы А тимидинфосфорилазы в течение 50-нс симуляции для комплекса тимидинфосфорилазы с ионом фосфата и 3'-азидотимидином

Время, нс	Расстояние, Å		
	Ile173...Ala373	Asp178...Phe210	Leu117...Arg171
0	14.1	8.6	13.9
5	12.8	8.1	16.4
10	11.2	8.5	13.8
15	11.0	7.9	13.3
20	11.6	10.0	15.0
25	13.8	9.0	14.5
30	12.1	9.1	14.7
35	11.6	8.0	14.3
40	11.1	8.7	14.1
45	13.3	8.7	15.1
50	12.0	7.6	14.2
PDB_ID: 4LHM	14.04	9.42	14.2

stearothermophilus [8] (PDB_ID: 1BRW), где наблюдается закрытая конформация фермента, расстояние между гомологичными остатками Phe207 и Asp175 равно 5.14 Å.

Измерение расстояний между C α -атомами аминокислот Ile173 и Ala373, расположенных в разных доменах субъединицы А, в разные моменты времени симуляции с интервалом 5 нс, по которым можно судить о степени сближения доменов во время МД-эксперимента, показало, что эти расстояния меняются в пределах 11.0–14.1 Å. Эти данные также подтверждают, что конформация субъединицы А открытая (табл. 1).

В структуре комплекса ТФ/АЗТ/фосфат [15] (PDB_ID: 4LHM) ион фосфата, локализованный в α/β -домене субъединицы фермента, непосредственно связан водородными связями с аминокислотными остатками Ser86, Ser95, Ser113, Thr123 и Lys84, а с His85, Lys191 и Asp92 – через молекулы воды. Во время МД-эксперимента фосфат-ион остается в фосфат-связывающем сайте, периодически меняя свою ориентацию. При этом изменяется число водородных связей из-за изменения конформации некоторых аминокислотных остатков из координационной сферы иона фосфата (табл. 2). На рис. 7 представлены ионы сульфата в моменты времени 0 и 15 нс (время наибольшего сближения доменов) и координирующие их аминокислотные остатки.

Как показано Pugmire et al. [13], связывание иона фосфата в активном центре пиримидиннуклеозидфосфорилаз приводит к формированию водородной связи между остатками His119 и Gly208 большого домена. При этом образование водородной связи между остатками His119

и Gly208 ассоциируется с подвижками в большом домене. На графике зависимости между временем эксперимента и расстоянием NE2_His119...O_Gly208 в комплексе ТФ с АЗТ и фосфатом (рис. 8) для обеих субъединиц на всем протяжении МД-эксперимента наблюдается тенденция периодического сближения остатков His119 и Gly208 до расстояний, соответствующих водородной связи NE2_His119...O_Gly208. В субъединице А от начала симуляции до ~14 нс изменение расстояний NE2_His119...O_Gly208 происходит от длины водородной связи 2.8 до 5 Å. В субъединице В вплоть до ~25 нс эти аминокислотные остатки часто образуют водородные связи, а затем расстояния NE2_His119...O_Gly208 периодически начинают существенно изменяться, часто увеличиваясь от значения, соответствующего Н-связи, до 4.5 Å и более (рис. 8). В субъединице А в моменты времени 5 и 10 нс, где, судя по расстояниям Ile173...Ala373 и Asp178...Phe210 (табл. 1), происходит некоторое сближение доменов, число водородных связей, образуемых ионом фосфата, уменьшается (табл. 2), а расстояния NE2_His119...O_Gly208 несколько увеличиваются (табл. 2). На следующем временном интервале, несмотря на разное число полярных контактов, образуемых ионом фосфата, водородные связи NE2_His119...O_Gly208 сохраняются.

В комплексе с ингибитором (ТФ/АЗТ/фосфат) водородная связь между остатками His119 и Gly208, подтверждающая присутствие иона в фосфат-связывающем центре, сохраняется более продолжительное время на всем временном интервале, что отличает его от комплекса с субстратом [16]. Сравнение симулируемых траекторий в

Таблица 2. Водородные связи, образуемые ионом фосфата субъединицы А тимидинфосфорилазы, на временном интервале 50 нс в фиксированные промежутки времени с интервалом 5 нс и длины связей NE2_His119...O_Gly208, наблюдаемые в эти промежутки времени

Время, нс	Расстояние, Å					
	NZ_Lys84	N_Ser86	OG_Ser95	OG_Ser113	OG1_Thr123	NE2_His119...O_Gly208
0	2.8 (O4)	2.9 (O4)	2.6 (O1)	2.7 (O3)	2.6 (O1)	2.8
5	2.8 (O4)	—	3.0 (O3)	—	—	3.6
10	2.7 (O2)	—	2.7 (O4)	—	2.9 (O4)	3.5
	3.1 (O1)		3.2 (O2)			
15	2.7 (O2)	2.7 (O2)	2.5 (O4)	—	2.6 (O4)	3.0
20	3.2 (O3)	—	2.7 (O3)	—	2.8 (O2)	2.8
	2.8 (O4)		3.1 (O1)		2.8 (O3)	
25	2.7 (O4)	—	—	—	2.7 (O1)	2.8
30	2.8 (O3)	—	2.7 (O4)	—	2.5 (O2)	2.8
35	2.8 (O1)	—	2.7 (O4)	—	2.7 (O4)	2.8
40	—	—	2.5 (O4)	—	2.7 (O4)	2.9
			3.2 (O1)		3.1 (O3)	
45	2.8 (O1)	—	2.6 (O3)	—	2.6 (O2)	2.7
50	2.9 (O2)	—	2.7 (O4)	—	2.8 (O4)	3.0
	2.9 (O1)				3.3 (O3)	

Примечание: в скобках указан атом кислорода иона фосфата, который образует водородную связь с соответствующим остатком. Прочерк означает отсутствие водородной связи между атомами.

комплексе ТФ с ингибитором и в комплексе ТФ с субстратом [16] показывает, что комплекс с ингибитором и фосфатом стабилен на всем временном интервале, в то время как в комплексе с субстратом и фосфатом наблюдался выход фосфата из связывающего центра.

Молекула АЗТ, расположенная в нуклеозид-связывающем сайте, в кристаллическом комплексе ТФ/АЗТ/фосфат взаимодействует с аминокислотными остатками из обоих доменов. Нуклеозид-связывающий карман ограничен аминокислотными остатками спиралей 161–172 (Tyr168 и Arg171) и 179–193 (Ile183, Ser186 и Lys190), которые расположены на поверхности α -домена, обращенной к междоменной щели, и остатками спирали 213–231 (Leu220) и β -ленты 82–86 (His85) домена α/β . Атом N3 пиримидинового кольца молекулы АЗТ образует водородную связь с O^γ_Ser186 α -домена. Атомы O2 и O4 пиримидинового кольца образуют водородные связи с гуанидиновой группой Arg171 и NZ_Lys190 соответственно.

МД-эксперимент показал, что пиримидиновый фрагмент молекулы АЗТ сохраняет контакты с координирующими ее аминокислотными остатками на всем протяжении эксперимента (табл. 3). Однако конформация молекулы АЗТ на протяжении МД-эксперимента изменяется; ориентация O5' гидроксильной группы относительно рибоз-

ного цикла, характеризуемая торсионным углом C3'-C4'-C5'-O5', остается разной во время 50-нс симуляции. В момент времени 15 нс наблюдается некоторое сближение пар остатков из разных доменов (Ile173–Ala373, Asp178–Phe210, Leu117–Arg171) до расстояний 11.0, 7.9 и 13.3 Å соответственно. При этом происходит сближение атомов O_Leu117 и O5'_AZT до 4.9 Å. Следует отметить, что боковой радикал остатка Leu117 из гибкой петли большого домена субъединицы ТФ может изменять свою позицию и ориентацию во время процесса симуляции, сдвигаясь периодически в направлении нуклеозида, в отличие от Arg171, который координирует пиримидиновый фрагмент АЗТ и практически не меняет свою конформацию.

При анализе пространственной структуры кристаллического комплекса *E. coli* ТФ/АЗТ/фосфат [15] было показано, что образование комплекса сопровождается конформационными изменениями и формированием вокруг азидогруппы ингибитора гидрофобного кармана, в образовании которого участвуют аминокислотные остатки обоих доменов субъединиц: Leu220 (спираль 213–231), Phe210 и Met211 (петля 204–214) домена α/β и Val177, Ile183 и Ile187 (спираль 179–193 α -домена), Leu117 (петля 112–122 большого домена). Большинство этих остатков инвариантны в пиримидиновых нуклеозидфосфорилазах семейства II. Было показано [15], что гидрофобный карман об-

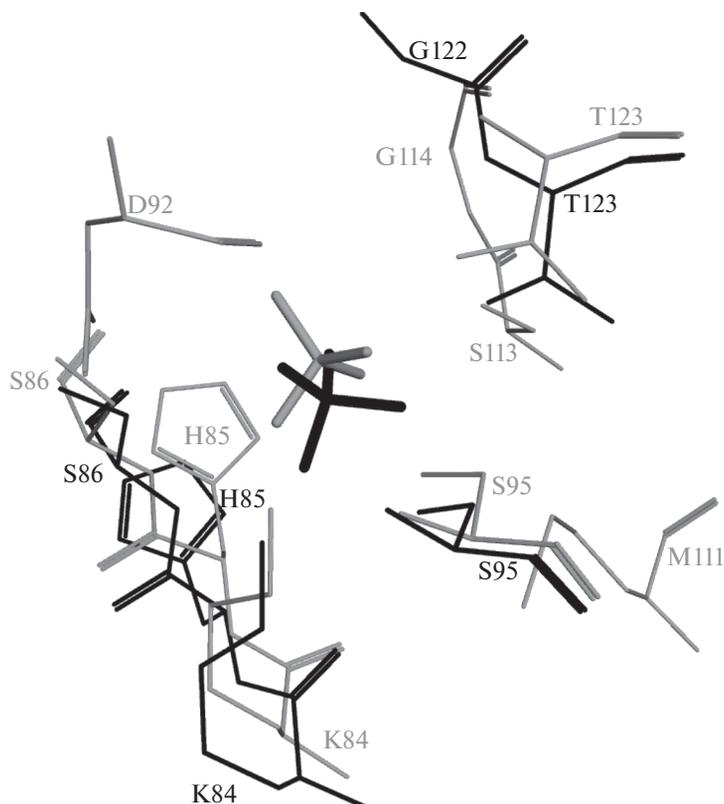


Рис. 7. Ион фосфата из субъединицы А тимидинфосфорилазы в моменты времени 0 нс (серый цвет) и 15 нс (черный цвет) в окружении координирующих его аминокислотных остатков.

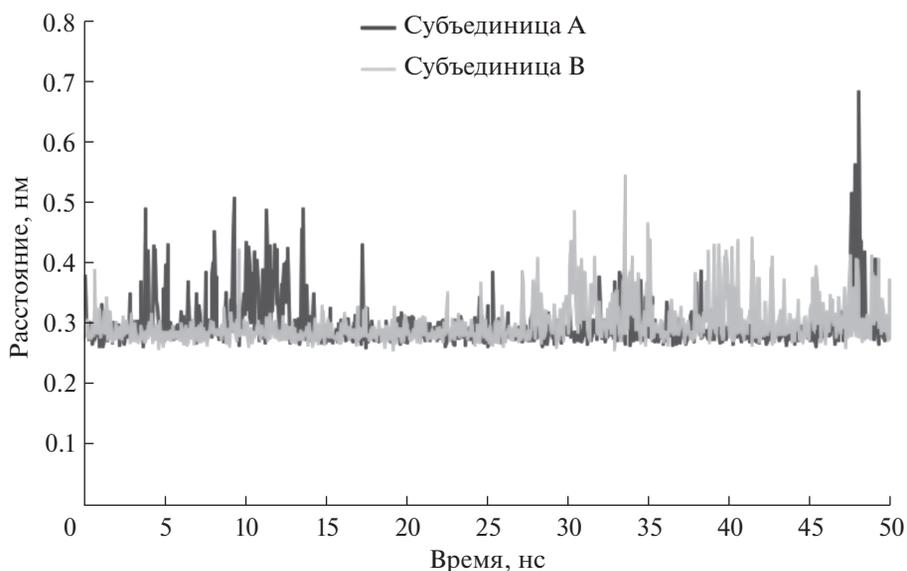


Рис. 8. Изменение расстояния между атомами O_Gly208 и NE2_His119 в течение 50-нс симуляции для комплекса тимидинфосфорилазы с ионом фосфата и 3'-азидотимидином.

разуется только после связывания АЗТ. При этом обе субъединицы находятся в открытой конформации.

Азидогруппа молекулы АЗТ в течение МД-эксперимента занимает гидрофобный карман, смещаясь в его полости. Гидрофобные остатки,

Таблица 3. Величины (Å) контактов пиримидинового фрагмента молекулы 3'-азидотимидина с координирующими его аминокислотными остатками в течение 50-нс симуляции

Время, нс	Расстояние, Å			
	N3_A3T... OG_Ser186	O4_A3T... NZ_Lys190	O2_A3T... NH1_Arg171	O2_A3T... NH2_Arg171
0	2.8	2.9	2.7	3.1
5	2.8	2.9	2.9	3.1
10	2.9	3.2	2.7	3.1
15	3.0	2.7	2.8	2.7
20	2.8	2.9	2.8	2.9
25	2.9	2.9	2.9	2.9
30	2.6	3.0	2.9	3.0
35	2.9	2.8	2.9	2.7
40	2.9	3.1	2.9	3.1
45	3.0	2.8	2.9	3.2
50	2.9	2.9	2.8	3.1

окружающие эту группу, в основном мало меняют свою конформацию. Расположение азидогруппы, которое практически сохраняется во время 50-нс симуляции, в гидрофобном кармане, находящемся между большим и малым доменами, может препятствовать сближению реакционных центров, что объясняет свойства АЗТ как неконкурентного ингибитора.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Стартовой моделью комплекса ТФ с фосфатом и АЗТ послужили координаты пространственной структуры димера тимидинфосфорилазы *E. coli* в комплексе с АЗТ и сульфатом, решенной методом молекулярного замещения с разрешением 1.52 Å (PDB_ID: 4LHM) [15]. С использованием программы Coot [17] сульфат заменили на фосфат. Молекулярное моделирование проводили с использованием программного комплекса GROMACS 2020.2 [18]. В качестве силового использовали поле amber99sb-idln [19]. Область моделирования представляла собой прямоугольный параллелепипед размером 134.955 × 134.955 × 136 Å. Белок помещали в центр ячейки, весь объем ячейки заполняли водой; использовали трехатомную модель воды – TIP3P. Параметризацию АЗТ проводили с использованием программы antechamber [20]. На первой стадии выполняли предварительную минимизацию энергии системы с АЗТ и фосфатом. После минимизации энергии проводили процедуры стабилизации температуры и давления системы. Величину температуры выбрали равной 310 К, величину давления – 1 атм. Использовали следующие алгоритмы поддержания температуры и давления: термостат V-rescale [21] и

баростат Parrinello-Rahman [22] соответственно. Системы моделировали на временном интервале общей продолжительностью 50 нс с шагом 2 фс.

Анализ строения ТФ в определенных точках симулируемой траектории осуществляли с помощью совмещения структурных моделей белка в этих точках со структурой димера в исходной точке процесса симуляции и с помощью совмещения структурных моделей белка в этих точках с кристаллической структурой белка (PDB_ID: 4LHM). При совмещении структур использовали программу PyMol [23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе методом молекулярной динамики на траектории 50 нс исследовали состояние димерной молекулы тимидинфосфорилазы из *Escherichia coli* в комплексе с неконкурентным ингибитором фермента 3'-азидотимидином и ионом фосфата. В качестве стартовой модели использовали полученные ранее атомные координаты комплекса тимидинфосфорилазы с азидотимидином и сульфатом при разрешении 1.52 Å.

Сравнение пространственных структур субъединицы А фермента в различных временных точках МД-эксперимента со структурой, полученной в рентгеноструктурном эксперименте, не выявило значительных различий, поэтому можно предположить, что на всем протяжении 50-нс симуляции обе субъединицы димера сохраняют открытую конформацию. Показана большая стабильность комплекса ТФ с АЗТ и фосфатом по сравнению с комплексом ТФ с тимидином и фосфатом [16]. Расположение азидогруппы между

двумя доменами молекулы препятствует сближению доменов, необходимому для перехода к закрытой конформации, что объясняет неконкурентный характер ингибирования 3'-азидотимидином.

Полученные данные объясняют некоторые особенности механизма функционирования ТФ и могут быть использованы для разработки антиопухолевых и противовирусных средств.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках выполнения работ по государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pugmire M.J., Ealick S.E.* // *Biochem. J.* 2002. V. 361. P. 1–25.
<https://doi.org/10.1042/0264-6021:3610001>
2. *Friedkin M., Roberts D.* // *J. Biol. Chem.* 1954. V. 207. P. 245–256.
3. *Leer J.C., Hammer-Jespersen K., Schwartz M.* // *Eur. J. Biochem.* 1977. V. 75. P. 217–224.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1977.tb11520.x>
4. *Desgranges C., Razaka G., Rabaud M., Bricaud H., Balzarini J., De Clercq E.* // *Biochem. Pharmacol.* 1983. V. 32. P. 3583–3590.
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(83\)90307-6](https://doi.org/10.1016/0006-2952(83)90307-6)
5. *Woodman P.W., Sarrif A. M., Heidelberger C.* // *Cancer Res.* 1980. V. 40. P. 507–511.
6. *Schwartz E.L., Baptiste N., Megati S., Wadler S., Otter B.A.* // *Cancer Res.* 1995. V. 55. P. 3543–3550.
7. *Zhu L., Yang F., Chen L., Meehan E.J., Huang M.* // *J. Struct. Biol.* 2008. V. 162. P. 40–49.
8. *Pugmire M.J., Ealick S.E.* // *Structure.* 1998. V. 6. P. 1467–1469.
[https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(98\)00145-2](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(98)00145-2)
9. *Norman R.A., Barry S.T., Bate M.M., Breed J., Colls J.G., Ernill R.J., Luke R.W.A., Minshull C.A., McAlister M.S.B., McCall E.J., McMiken H.H.J., Paterson D.S., Timms D., Tucker J.A., Paupit R.A.* // *Structure.* 2004. V. 12. P. 75–84.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2003.11.018>
10. *El Omari K., Bronckaers A., Liekens S., Pérez-Pérez M.-J., Balzarini J., Stammers D.K.* // *Biochem. J.* 2006. V. 399. P. 199–204.
<https://doi.org/10.1042/BJ20060513>
11. *Balaev V.V., Lashkov A.A., Gabdulkhakov A.G., Dontsova M.V., Seregina T.A., Mironov A.S., Betzel C., Mikhailov A.M.* // *Acta Crystallogr. F. Struct. Biol. Commun.* 2016. V. 72 (Pt 3). P. 224–233.
<https://doi.org/10.1107/S2053230X1600162X>
12. *Walter M.R., Cook W.J., Cole L.B., Short S.A., Koszalka G.W., Krenitsky T.A., Ealick S.E.* // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 14016–14022.
<https://doi.org/10.2210/pdb1tpt/pdb>
13. *Pugmire M.J., Cook W.J., Jasanoff A., Walter M.R., Ealick S.E.* // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 281. P. 285–299.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1941>
14. *Timofeev V.I., Abramchik Yu.A., Fateev I.V., Zhukhlistova N.E., Murav'eva T.I., Kuranova I.P., Esipov R.S.* // *Crystallogr. Rep.* 2013. V. 58. P. 842–853.
<https://doi.org/10.1134/S1063774513060230>
15. *Timofeev V., Abramchik Yu., Zhukhlistova N., Muravieva T., Fateev I., Esipov R., Kuranova I.* // *Acta Cryst.* 2014. V. D70. P. 1155–1165.
<https://doi.org/10.1107/S1399004714001904>
16. *Сидоров-Бирюков Д.Д., Подшивалов Д.Д., Тимофеев В.И., Жухлистова Н.Е., Куранова И.П.* // *Кристаллография.* 2019. Т. 64. С. 99–105.
17. *Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K.* // *Acta Cryst.* 2010. V. D66. P. 486–501.
<https://doi.org/10.1107/s0907444910007493>
18. *Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B., Lindahl E.* // *SoftwareX* 2015. V. 1–2. P. 19–25.
<https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
19. *Lindorff-Larsen K., Piana S., Palmo K., Maragakis P., Klepeis J.L., Dror R.O., Shaw D.E.* // *Proteins.* 2010. V. 78. P. 1950–1958.
<https://doi.org/10.1002/prot.22711>
20. *Salomon-Ferrer R., Case D.A., Walker R.C.* // *WIREs Comput. Mol. Sci.* 2013. V. 3. P. 198–210.
<https://doi.org/10.1002/wcms.1121>
21. *Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F., Dinola A., Haak J.R.* // *J. Chem. Phys.* 1984. V. 81. P. 3684–3690.
22. *Parrinello M., Rahman A.* // *J. Chem. Phys.* 1982. V. 76. P. 2662–2666.
23. *Schrodinger LLC.* // *The PyMOL Molecular Graphics-System. Version 1.8.* 2015.
<https://github.com/schrodinger/pymol-open-source>

Molecular Dynamics Study of *Escherichia coli* Thymidine Phosphorylase in a Complex with an Inhibitor 3'-Azidothymidine and Phosphate

V. I. Timofeev^{*, **, #}, N. E. Zhukhlistova^{*}, and I. P. Kuranova^{*, **}

[#]E-mail: tostars@mail.ru

^{*}*Shubnikov Institute of Crystallography of Federal Scientific Research Centre "Crystallography and Photonics", Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 59, Moscow, 119333 Russia*

^{**}*National Research Centre "Kurchatov Institute", pl. Akademika Kurchatova 1, Moscow, 123182 Russia*

The state of a dimeric thymidine phosphorylase molecule from *Escherichia coli* in a complex with a noncompetitive enzyme inhibitor 3'-azidothymidine and a phosphate ion was studied by the molecular dynamics method on a 50 ns trajectory. The previously obtained atomic coordinates of the complex of thymidine phosphorylase with azidothymidine and sulfate at a resolution of 1.52 Å were used as a starting model. It was shown that in this time interval both subunits of the dimeric enzyme molecule function asynchronously, while each subunit retains an open conformation. It was found that the nature of the ligand in the nucleoside center affects the binding strength of phosphate in the phosphate center. In a complex with an inhibitor, both ligands remain bound to the enzyme over the entire time interval, while when simulating the behavior of thymidine phosphorylase in the presence of phosphate and thymidine substrate, phosphate is released from the active site. The stabilizing effect of azidothymidine on phosphate binding is consistent with the behavior of azidothymidine as a noncompetitive inhibitor of thymidine phosphorylase.

Keywords: thymidine phosphorylase, spatial structure, 3'-azidothymidine, molecular dynamics



РАЗРАБОТКА ОПТИМАЛЬНОЙ МЕТОДИКИ ЗАМЫКАНИЯ ДИСУЛЬФИДНОЙ СВЯЗИ В СИНТЕЗЕ АТОЗИБАНА – АНТАГОНИСТА ОКСИТОЦИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ¹

© 2021 г. Д. В. Авдеев*, #, М. В. Овчинников*, У. С. Дудкина*, А. С. Молокоедов*, А. А. Азьмуко*, М. Е. Палькеева*, М. В. Сидорова*

*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, Россия, 121552 Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

Поступила в редакцию 18.02.2021 г.

После доработки 24.02.2021 г.

Принята к публикации 28.02.2021 г.

Проведен крупномасштабный твердофазный синтез Атозибана – Мра¹-D-Тур(OEt)-Пе-Thr-Asn-Cys⁶-Pro-Orn-Gly-NH₂ циклического 1,6-дисульфида – единственного клинически используемого антагониста окситоциновых рецепторов. Подобраны условия для замыкания дисульфидной связи (S–S) в молекуле Атозибана как в растворе, так и на полимере в ходе твердофазного синтеза. Проведена сравнительная оценка образования S–S-связи в различных условиях. Изучены побочные продукты, образующиеся при замыкании дисульфидной связи как в растворе, так и на полимерном носителе. Разработана методика, позволяющая синтезировать Атозибан в укрупненном масштабе (10–20 ммоль), включающая циклизацию защищенного полупродукта с образованием S–S-связи в ходе твердофазного синтеза, при минимальном образовании побочных продуктов.

Ключевые слова: антагонист окситоциновых рецепторов, Атозибан, твердофазный синтез, замыкание дисульфидной связи

DOI: 10.31857/S013234232106004X

ВВЕДЕНИЕ

Дисульфидная связь – один из структурообразующих элементов в молекулах многих биологически активных пептидов – таких пептидных гормонов, как Окситоцин, Вазопрессин, Соматостатин, Инсулин [1, 2], нейромедиаторов, факторов роста и др. Дисульфидные мостики играют важную роль в реализации биологического эффекта многих пептидных лекарств [3]. Примеры таких соединений – агонисты вазопрессиновых и соматостатиновых рецепторов, такие как Терлипрессин,

син, Фелипрессин, Десмопрессин, Орнипрессин, Октреотид, Ланреотид и Пасиреотид. Данные пептиды содержат одну дисульфидную связь и производятся в промышленных масштабах [4–7]. К настоящему времени существует лишь один клинически используемый антагонист окситоциновых рецепторов – Атозибан, который применяется для предотвращения преждевременных родов и также производится в промышленных масштабах [8, 9]. Такие пептидные лекарства, как Линаклотид и Плеканатид, выступают агонистами гуанилатциклазы, содержат в своей структуре три и две S–S-связи соответственно [10].

В настоящее время существует достаточно большое количество способов создания дисульфидных мостиков в пептидах. При окислении тиольных предшественников используются кислород воздуха, феррицианид калия, диметилсульфоксид, перекись водорода [11]. При синтезе сложных пептидов применяют буферы, имитирующие физиологические условия, как правило, с использованием глутатионовой системы, содержащей 5 мМ восстановленный и 0.1 мМ окисленный глутатион в различных соотношениях [12]. При синтезе природных пептидов, содержащих несколько дисульфидных связей в молекуле,

¹ Дополнительные материалы для этой статьи доступны по doi 10.31857/S013234232106004X для авторизованных пользователей.

Сокращения: Вос – *трет*-бутилоксикарбонил; Bu^t – *трет*-бутил; DBU – 1,8-диазабико[5.4.0]-ундец-7-ен; DCM – дихлорметан; DIC – *N,N'*-диизопропилкарбодимид; DMF – диметилформамид; DMSO – диметилсульфоксид; D-Тур(OEt)-ОН – D-2-амино-3-(4-этоксифенил)пропановая кислота; DTG – дитиотреитол; Fmoc – 9-флуоренилметилоксикарбонил; ESI – электрораспылительная химическая ионизация при атмосферном давлении; HOBT – 1-гидроксисбензотриазол; MePip – 4-метилпиперидин; Мра – 3-меркаптопропионовая кислота; *i*-PrOH – изопропиловый спирт; TFA – трифторуксусная кислота; TIS – триизопропилсилан; Trt – тритил.

Автор для связи: (тел.: +7 (915) 051-25-55; эл. почта: mityaavdeev93@mail.ru).

успешно применяют спонтанное замыкание S—S-мостиков с использованием мягких окислителей. Так, в работе по синтезу конотоксинов с двумя дисульфидными мостиками спонтанная циклизация тиольных предшественников кислородом воздуха приводила к преимущественному образованию природного дисульфидного изомера [13]. Альтернативный подход — прямая конверсия защищенных (Trt, Acn, Tmob, Mob и др.) линейных предшественников пептидов в циклические дисульфиды. Для этой цели наиболее часто используют иод в различных растворителях [14], реже применяют трифторацетат таллия(III) [15] или сульфоксиды в присутствии хлорсиланов [16].

Синтез природных пептидов или их аналогов, содержащих внутримолекулярные дисульфидные мостики, — до сих пор достаточно сложная задача [17]. Это обусловлено тем, что, независимо от способа (классического или твердофазного) получения соответствующего линейного предшественника, на стадии замыкания внутримолекулярного дисульфидного мостика в пептиде, во избежание межмолекулярной агрегации и образования побочных дисульфидных димеров и олигомеров, приходится работать в условиях высокого разбавления. Рабочие концентрации пептидов при циклизации, как правило, составляют 10^{-4} – 10^{-5} М (т.е. 0.1–1.0 мг/мл) [14]. Концентрирование реакционных смесей циклизации перед выделением целевого продукта — довольно длительный процесс, в ходе которого также возможно образование побочных продуктов, в частности из-за наличия в смеси остаточных количеств окислителя, приводящих к образованию продуктов более глубокого окисления серы (соответствующих сульфоксидов), а также несоблюдения рН или температурного режима. Атозибан разрешен к практическому применению в нашей стране в качестве лекарственного препарата, что диктует необходимость разработки именно крупномасштабной схемы его получения. При синтезе Атозибана мы столкнулись с рядом проблем на стадии создания дисульфидной связи.

Цель данного исследования — разработка оптимальной методики получения Атозибана в укрупненном масштабе, сравнение различных условий замыкания S—S-связи и изучение примесей, образующихся в ходе как твердофазного синтеза, так и синтеза в растворе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Атозибан (I) имеет следующую структуру — Mpa¹-D-Tyr(OEt)-Ile-Thr-Asn-Cys⁶-Pro-Orn-Gly-NH₂ циклический 1,6-дисульфид. Данный антагонист был получен заменой четырех аминокислотных остатков в молекуле Окситоцина. Тирозин был заменен на алкилированный аналог D-Tyr(OEt), ци-

стеин — на дезаминоцистеин (Mpa), лейцин — на орнитин, глутамин — на треонин. Такие модификации были проведены для получения аналога — антагониста окситоциновых рецепторов — и увеличения его протеолитической устойчивости [3].

Известны различные методы промышленного получения Атозибана и, судя по литературным данным, предпочтение отдается синтезу в растворе [9, 18]. В данной работе для синтеза этого пептида был выбран твердофазный метод, т.к., по нашему мнению, он более технологичен. В сочетании с N^α-Fmoc-защитой для блокирования функциональных групп боковых цепей аминокислот использовали кислоталабильные защитные группы: Bu^t — для треонина, Boc — для орнитина, Trt — для аспарагина. При синтезе пептидов остаток цистеина защищали Acn- или Trt-группой, остаток меркаптопропионовой кислоты — Trt-группой. Для отщепления Fmoc-защит использовали раствор 5% 4-MePip/2% DBU/DMF [19]. Для создания пептидной связи применяли DIC/NOBt-метод. В результате твердофазного синтеза был получен линейный предшественник Атозибана — Mpa-D-Tyr(OEt)-Ile-Thr-Asn-Cys-Pro-Orn-Gly-NH₂ — с чистотой 76% по данным ВЭЖХ. Основополагающая стадия в синтезе Атозибана — циклизация, поэтому замыкание дисульфидного мостика изучалось нами как в растворе, так и на полимере.

Замыкание S—S-мостика в растворе. В литературе имеются отдельные упоминания о том, что введение органических растворителей в состав реакционных смесей на стадии циклизации способствует образованию внутримолекулярных дисульфидов [20]. Наши собственные данные по синтезу Октреотида [21] показывают, что в этом случае циклизация тиольного предшественника с концентрацией 10–20 мг/мл без образования заметных количеств димеров проходит в метаноле. Мы провели серию экспериментов по получению Атозибана в водных или водно-органических растворах (H₂O/изопропиловый спирт, H₂O/диоксан, H₂O/изопропиловый спирт/CH₃CN) с использованием нарастающих концентраций линейного SH-пептида (1.0–20.0 мг/мл) при рН 7.0–8.0 (табл. 1). Для контроля полноты протекания циклизации параллельно применяли ВЭЖХ и тест Эллмана [22]. Введение органических растворителей в состав реакционной смеси при циклизации позволило нам увеличить концентрацию исходного дитиола (II).

Как видно из табл. 1 и рис. 1, в использованных для циклизации условиях нам не удалось избежать образования продуктов с межмолекулярными S—S-связями — параллельных и антипараллельных димеров (III) и (IV), структура которых после выделения из реакционной смеси с помощью ВЭЖХ была подтверждена методом масс-

Таблица 1. Влияние условий замыкания S–S-мостика действием H₂O₂ на содержание целевого и побочных (димерных) продуктов в реакционной смеси при получении Атозибана (I) в растворе

Концентрация SH-предшественника, мг/мл	pH	Растворитель	Состав реакционной смеси по ВЭЖХ, %		
			Атозибан (I)	SH-предшественник (II)	димеры (III) + (IV)
1	7.0	H ₂ O	74.10	0.15	10.20
5	7.0	H ₂ O/ <i>i</i> -PrOH 1 : 1	71.00	0.24	9.28
	7.0	H ₂ O/диоксан 1 : 1	62.20	0.17	14.20
10	7.5	H ₂ O/ <i>i</i> -PrOH/CH ₃ CN 5 : 3 : 1	71.80	0.30	12.83
	7.5	H ₂ O/ <i>i</i> -PrOH 1 : 1	73.70	0.23	10.10
20	7.5–8.0	H ₂ O/ <i>i</i> -PrOH 1 : 1	63.12	0.26	18.20

спектрометрии. В спектре ESI (+) фракции, содержащей смесь пептидов (III) и (IV), наблюдался единственный пик молекулярного иона (1988.6), соответствующий массе димерных продуктов. В дальнейшем при оценке результатов циклизации нами учитывалось суммарное количество пептидов (III) и (IV). При этом в интервале концентраций исходного SH-соединения 1–10 мг/мл содержание побочных продуктов практически не менялось и составляло ~10–14% (табл. 1). При повышении концентрации исходного соединения (II) до 20 мг/мл количество дисульфидных димеров (III) и (IV) возрастало до 18.2% (табл. 1). Как оказалось, димеры имеют более низкую растворимость, чем Атозибан, и существенно осложняют выделение целевого продукта. Лучшие результаты при замыкании S–S-мостика в растворе были получены в следующих условиях: H₂O/изопропиловый спирт при концентрации пептида 10 мг/мл. Окисление происходило в течение 15 мин. По завершении реакции pH реакционной смеси доводили до 4 с помощью уксусной кислоты, и целевой пептид, имеющий чистоту по ВЭЖХ 73.7%, выделяли с помощью препаративной ВЭЖХ.

Стоит отметить, что на стадии подкисления реакционной смеси нельзя применять трифторуксусную кислоту, т.к. наличие остаточных количеств H₂O₂ может привести к образованию соответствующего сульфоксида. Такие побочные продукты были нами выделены. В масс-спектре ESI (+) наблюдается пик молекулярного иона (1010), соответствующий сульфоксиду Атозибана. Выход Атозибана-ацетата при замыкании дисульфидной связи в растворе составил 31.5% в

расчете на стартовую аминокислоту, присоединенную к полимерному носителю. Полученные результаты побудили нас продолжить поиски оптимальной методики и перейти к экспериментам замыкания дисульфидной связи на полимерном носителе.

Замыкание S–S-мостика на твердой фазе. Важный аспект замыкания S–S-мостика на твердой фазе – эффект псевдоразбавления, за счет которого при набухании пептидил-полимера в определенном растворителе расстояние между соседними пептидными цепями увеличивается, и взаимодействие между ними становится минимальным, что может имитировать разбавление в растворе. Поэтому мы предполагали, что циклизация Атозибана на полимере поможет нам обойти проблему высоких разбавлений, наблюдающихся при окислении в растворе, и сократить образование побочных продуктов, а также упростить процедуру выделения продукта. Как правило, для замыкания S–S-мостика в различных пептидах требуется подбор специальных условий [11].

Атозибан не содержит в молекуле остатка триптофана, поэтому в качестве окислителя при создании S–S-связи на полимере был выбран I₂, поскольку он хорошо растворим в органических растворителях, обеспечивающих хорошую сольватацию пептидил-полимера, и при его использовании наблюдается прямая конверсия цистеин-защищенного пептида в циклический дисульфид [11]. К настоящему моменту существует довольно большое количество работ по изучению замыкания дисульфидных мостиков на полимерном носителе [14, 23, 24], однако систематиче-

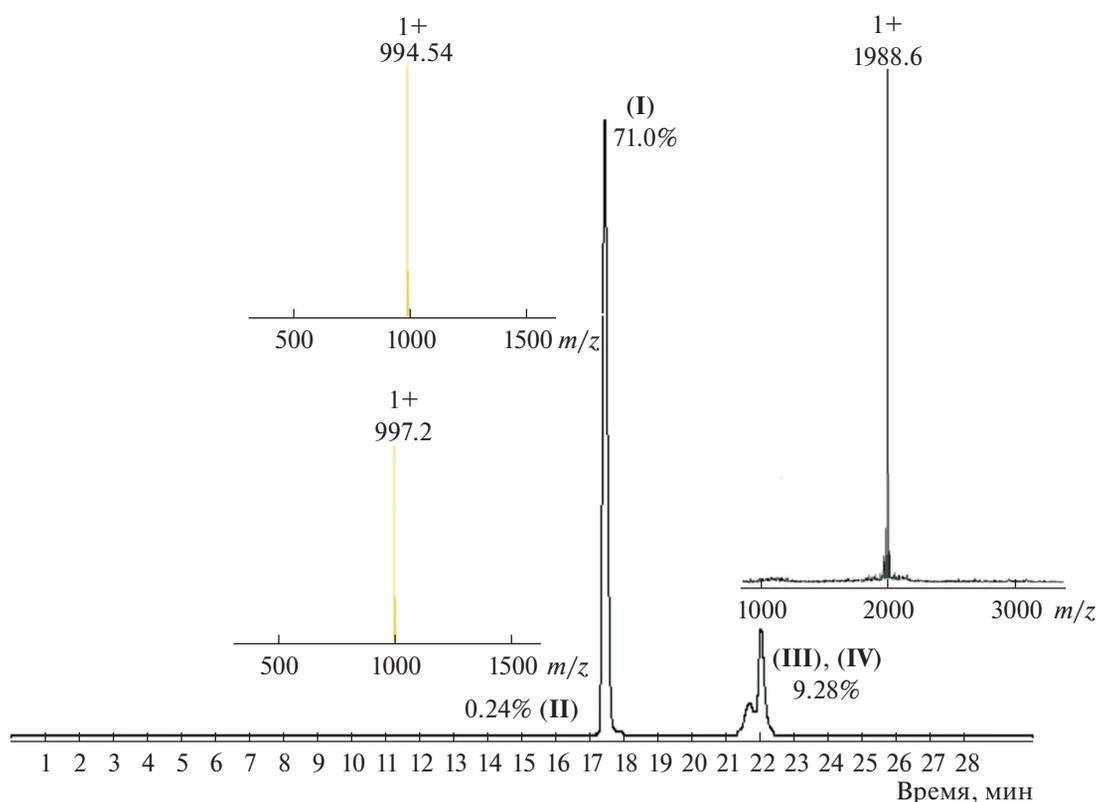
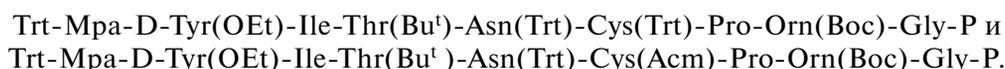


Рис. 1. Профиль аналитической ВЭЖХ и спектры ESI (+) продуктов при замыкании S–S-мостика в Атозибанае в растворе в течение 15 мин действием H_2O_2 в смеси $\text{H}_2\text{O}/i\text{-PrOH}$ (1 : 1): (I) – Атозибан, (II) – линейный SH-предшественник Атозибана, (III–V) – димеры.

ских исследований по изучению зависимости количества окислителя, времени проведения циклизации и растворителя на состав образующихся примесей в синтезе Атозибана не проводилось. Мы осуществили серию экспериментов по синте-

зу Атозибана на твердой фазе, включая стадию образования дисульфидного мостика (табл. 2).

На amidном полимере Ринка с использованием двух различных защит остатка цистеина нами было синтезировано два пептидил-полимера:



Конверсию защищенного производного пептида в циклический полупродукт на твердой фазе проводили действием различных избытков иода (3–35 экв.) в таких органических растворителях, как DMF, диоксан и уксусная кислота, при комнатной температуре в течение 1–5 ч (табл. 2).

Наилучшие результаты наблюдаются при использовании в качестве растворителя DMF. При применении же диоксана и уксусной кислоты в одинаковых условиях (10-кратный избыток иода, 1 ч) всегда присутствует большое количество линейного SH-пептида и димеров. Как видно из табл. 2, при увеличении количества окислителя и времени проведения циклизации в реакционной смеси во всех случаях неожиданно нарастает содержание линейного SH-предшественника Ато-

зибана (II) и димеров. При использовании Trt-защиты наиболее полное замыкание S–S-мостика наблюдается при действии трехкратного избытка I_2 в течение 1 ч при комнатной температуре. При этом содержание SH-пептида и димеров составляет менее 7% и не наблюдается других побочных продуктов. Чистота же самого Атозибана составляет более 85%.

Для анализа реакционных смесей получения Атозибана (I) были подобраны условия ВЭЖХ, в которых наблюдалось хорошее разрешение пиков, соответствующих SH-, SS-формам пептида и побочным продуктам (рис. 2). Стоит отметить, что в тех же условиях, но с Acm-защитой на цистеине в реакционной смеси присутствует довольно большое количество SH-пептида (II). Мы

Таблица 2. Влияние условий замыкания S–S-мостика действием I₂ на содержание целевого и побочных продуктов в реакционной смеси при циклизации Атозибана (I) на твердой фазе

№	Защиты Cys и Mpa	Условия циклизации			Состав реакционной смеси по ВЭЖХ, %		
		экв. I ₂	растворитель	время, ч	Атозибан (I)	примеси	
						SH-пептид (II)	димеры (III) + (IV)
1	Trt, Trt	40	DMF	4	11.21	63.73	5.10
2	Trt, Trt	10	DMF	4	35.40	43.80	8.20
3	Trt, Trt	10	DMF	1	44.94	43.28	4.70
4	Trt, Trt	10	Диоксан	1	33.11	36.80	11.20
5	Trt, Trt	10	AcOH	1	42.36	46.80	6.20
6	Trt, Trt	5	DMF	4	67.67	11.69	3.90
7	Trt, Trt	7	DMF	1	67.50	11.80	0.57
8	Trt, Trt	3	DMF	1	85.51	3.71	4.80
9	AcM, Trt	3	DMF	1	75.70	12.90	5.30

идентифицировали продукт (II) (рис. 2), который соответствует направленно полученному SH-предшественнику Атозибана (II). В масс-спектрах ESI (+) наблюдается пик молекулярного иона (997.2), соответствующий SH-пептиду (II). При анализе ¹H-ЯМР-спектров Атозибана (I) и пептида (II) наиболее заметные изменения наблюдаются у сигналов протонов цистеина. Сигнал амидного протона линейного предшественника Атозибана (I) сместился в более сильное поле по сравнению с сигналом амидного протона Атозибана (I): в пептиде (II) – αNH, Cys (7.94 м.д.), в Атозибана – αNH, Cys (8.44 м.д.). Такая же тенденция наблюдается и для βCH₂-протонов, а именно в пептиде (II) – βCH₂, Cys (2.60; 2.75 м.д.), в Атозибана – βCH₂, Cys (3.02; 2.85 м.д.). Также изменились сигналы амидных протонов тирозина, треонина и орнитина в пептиде (II): в пептиде (II) – αNH, D-Tyr(OEt) (8.15 м.д.), в Атозибана – αNH, D-Tyr(OEt) (8.39 м.д.); в пептиде (II) – αNH, Thr (7.78 м.д.), в Атозибана – αNH, Thr (7.20 м.д.); в пептиде (II) – αNH, Orn (8.17 м.д.), в Атозибана – αNH, Orn (8.08 м.д.). Стоит отметить изменение сигналов протонов при β-углеродном атоме в изолейцине: в пептиде (II) – βCH₂, Ile (1.70 м.д.), в Атозибана – βCH₂, Ile (1.85 м.д.). Таким образом, ¹H-спектр ЯМР и масс-спектр ESI (+) побочного продукта совпадают со спектрами специально полученного сульфгидрильного производного.

При обработке реакционной смеси циклизации H₂O₂ продукт, соответствующий пику пептида (II), переходит в Атозибан (I).

На сегодняшний момент, судя по литературным данным, не существует однозначного представления о механизме замыкания S–S-мостика действием I₂ [17]. Мы предполагаем, что схематически суть происходящего можно объяснить следующим образом (схема 1). При взаимодействии защищенного производного пептида с I₂ первоначально образуется моно-иод-производное (Ib), которое с высокой скоростью внутримолекулярно превращается в циклический продукт (Id). Одновременно с учетом избытка иода образуется и некоторое количество ди-иод-производного (Ic). В пользу этого говорит тот факт, что в наших экспериментах (табл. 2) при увеличении молярного количества иода растет и количество линейного продукта со свободными SH-группами (II). При этом, видимо, ди-иод-производное (Ic) не переходит в продукт (Id), иначе мы должны были бы всегда получать главным образом циклический продукт. Из табл. 2 следует, что при 40-кратном избытке I₂ содержание SH-пептида в реакционной смеси составляло 63.73%, при 10-кратном избытке – 43.8%, а при трехкратном – 3.71%. В случае AcM-защитной группы на цистеине ситуация принципиально не меняется (табл. 2). Мы предполагаем, что скорость внутримолекулярного замыкания цикла в случае тритильного производного выше, чем в случае AcM-производного.

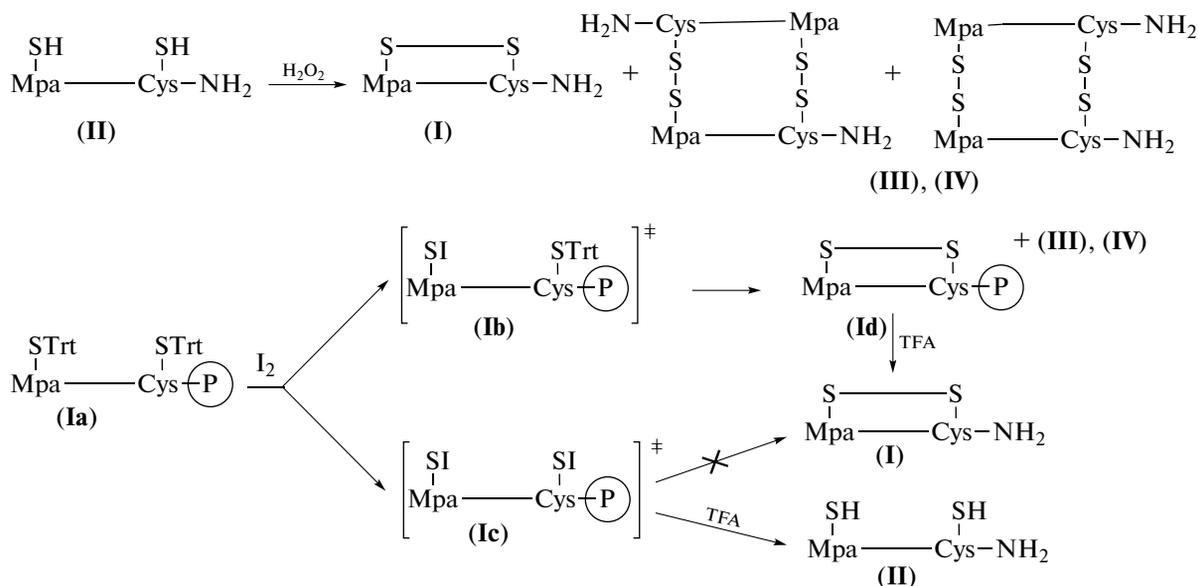


Схема 1. Схема циклизации Атозибана (I) в растворе и на твердой фазе.

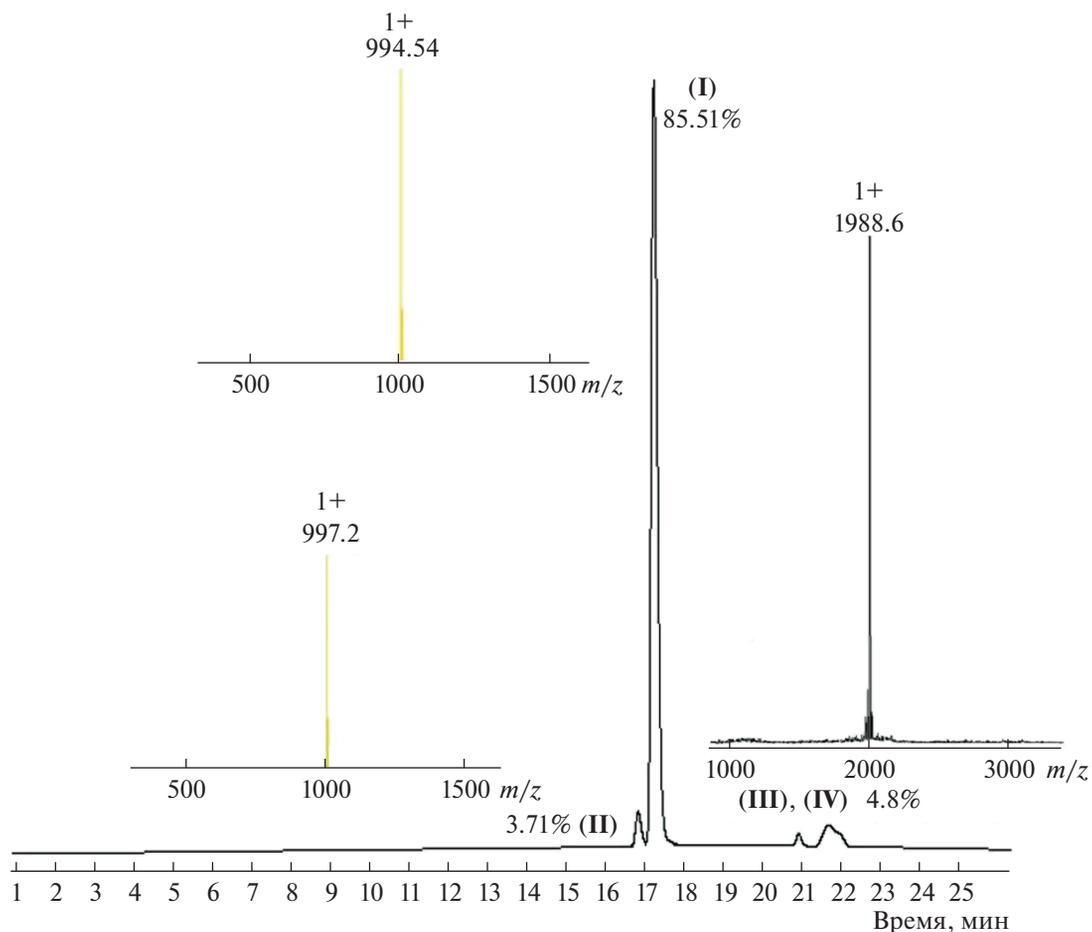


Рис. 2. Профиль аналитической ВЭЖХ и спектры ESI (+) продуктов при замыкании S–S-мостика в Атозибана (I) на твердой фазе в течение 1 ч с использованием 3 экв. I₂ в DMF: (I) – Атозибан, (II) – линейный SH-предшественник Атозибана, (III–V) – димеры.

Как видно из табл. 2, во всех случаях при циклизации в DMF содержание димеров в реакционной смеси меньше, чем при циклизации в растворе.

Выход Атозибана-ацетата (**I**) при замыкании дисульфидной связи на полимере составил 50%.

Сравнительная оценка замыкания S–S-мостика на твердой фазе и в растворе. Несмотря на то что время замыкания S–S-мостика в растворе меньше (не более 15 мин) и существует возможность контроля полноты протекания с помощью теста Элмана и ВЭЖХ, плюсов проведения окисления на твердой фазе оказалось больше: во-первых, отсутствует проблема растворимости; во-вторых, существенно упрощается процесс обработки реакционной массы, путем нескольких промывок пептидил-полимера при обычной фильтрации удается полностью удалить избыток окислителя; в-третьих, нам удалось добиться практически полного отсутствия димеров при циклизации на полимере. Возможно, уменьшение степени замещения смолы при твердофазном синтезе позволит свести к минимуму образование димеров. Главное преимущество циклизации на полимере – увеличение суммарного выхода Атозибана (**I**) на стартовую аминокислоту (50% по сравнению с 31.5% в растворе).

Разработанная методика была успешно использована для синтеза Атозибана (**I**) в укрупненном масштабе (10–20 ммоль).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали производные аминокислот L- и D-ряда (Fluka, Швейцария); тритил-3-меркаптопропионовую кислоту (Trt-Mpa), DMF, NMM, HOBT, TBTU, TIS, DTNB – реагент Элмана, дихлорметан и трифторуксусную кислоту (Fluka, Швейцария); уксусную кислоту, металлический иод, аскорбиновую кислоту (о.с.ч.; Реахим, Россия). Для ВЭЖХ применяли ацетонитрил (CH₃CN; Carl Roth GmbH, Германия).

Аналитическую ВЭЖХ проводили на хроматографе Knauer 1001A (Германия) на колонке (4.6 × 250 мм) Kromasil 100-5 ODS (Швеция), размер частиц сорбента 5 мкм, размер пор порядка 100 Å. В качестве элюентов использовали буфер А (0.05 М КН₂РО₄, рН 3.0) и буфер Б (70%-ный ацетонитрил в буфере А), элюцию проводили со скоростью 1 мл/мин в градиенте концентрации буфера Б в буфере А (20–80% за 30 мин), детекция при длине волны 220 нм. Препаративную ВЭЖХ Атозибана осуществляли с использованием прибора Knauer 1001 (Германия) на колонке Kromasil 50 × 250 мм с размером частиц сорбента 10 мкм. В качестве элюентов использовали буфер А (0.01 М водный раствор ацетата аммония, рН 4.5, содержащий 3% ацетонитрила) и буфер Б (70%-ный ацетонитрил в буфере А). Элюцию проводили со

скоростью 20 мл/мин от 100% буфера А в градиенте концентраций буфера Б (0.5%/мин). Фракции, соответствующие целевому веществу, объединяли, концентрировали в вакууме и лиофилизовали.

¹H-ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре WH-500 (500 МГц; Bruker, Германия) в DMSO-d₆ при 300 К, концентрация пептидов составляла 2–3 мг/мл, химические сдвиги (δ, м.д.) измеряли относительно тетраметилсилана. Приведены значения химических сдвигов (δ, м.д.). Отнесение сигналов к определенным группам протонов аминокислотных остатков проводили с помощью метода дифференциального двойного резонанса. Масс-спектры регистрировали на приборе Amazon (Bruker, Германия) методом электрораспылительной ионизации (ESI) в режиме регистрации положительных ионов (напряжение на капилляре – 3500 В). Диапазон сканирования масс, m/z – 70–2200. Применяли шприцевый ввод образца, растворенного в смеси CH₃CN–вода. Газ-распылитель – азот, температура интерфейса – 100°C.

Твердофазный синтез Атозибана (I**). Получение Trt-Mpa-D-Tyr(OEt)-Ile-Thr(Bu^t)-Asn(Trt)-Cys(Trt)-Pro-Orn(Boc)-Gly-полимера (**Ia**).** Синтез пептида проводили в ручном режиме из 8 г (5.44 ммоль) полимера Ринка (Novabiochem, Великобритания) с содержанием аминогрупп 0.68 ммоль/г. Снятие Fmoc-защиты с α-аминогруппы проводили последовательно раствором 5%-ного 4-метилпиперидина и 2%-ного 1,8-диазабихло[5.4.0]ундец-7-ена (DBU) в DMF в течение 5 и 10 мин. Аминокислотные цепи удлиняли в соответствии со стандартными процедурами одностадийного цикла, включающего 30-минутную активацию присоединяемой аминокислоты (16.32 ммоль) в присутствии эквивалентных количеств DIC и HOBT в смеси NMP и DMF (1 : 1). Цикл синтеза включал все необходимые промывки пептидил-полимера DMF и тест с нингидрином на остаточные аминогруппы [18]. Аликвоты пептидил-полимера (**Ia**), содержание пептида в которых составляло ~0.5 ммоль, использовали для тестовых синтезов Атозибана (**I**), условия и результаты которых представлены в табл. 1 и 2. Основную часть нонапептидил-полимера (**Ia**) с содержанием пептида 3.6 ммоль использовали для получения целевого продукта (**I**). Для оценки качества промежуточного нонапептида образец N^α-свободного пептидилполимера (**Ia**) обрабатывали деблокирующей смесью TFA/TIS/H₂O (90 : 5 : 5 v/v/v) в течение 1 ч. После осаждения продукта диэтиловым эфиром содержание основного вещества в образце составило 89% по данным ВЭЖХ.

Получение *Mpa*¹-*D-Tyr(OEt)*-*Ile-Thr-Asn-Cys*⁶-*Pro-Orn-Gly-NH₂* циклического 1,6-дисульфида (I**).**

а) *Замыкание S–S-связи в растворе.* Твердофазный синтез нонапептидил-полимера (**Ia**) проводили по описанной выше методике из 15.3 г (7.2 ммоль) амидного полимера Ринка с содержанием аминокрупп 0.48 ммоль/г. Пептидил-полимер (**Ia**) (28.5 г), полученный по окончании синтеза, суспендировали в охлажденной до 4°C смеси, содержащей 200 мл TFA, 10 мл деионизованной воды, 10 мл TIS и 10 г DTT, и перемешивали в течение 2 ч. Полимер отфильтровывали, промывали деблокирующей смесью (2 × 30 мл), смесью CH₂Cl₂/TFA (1 : 1, 2 × 30 мл), фильтрат упаривали до маслообразного состояния. Продукт осаждали охлажденным диэтиловым эфиром, отфильтровывали, промывали диэтиловым эфиром (2 × 30 мл), этилацетатом (2 × 30 мл), высушивали при комнатной температуре. Сырой продукт твердофазного синтеза (7.1 г) растворяли в 800 мл смеси *i*-PrOH/CH₃CN/H₂O в соотношении 2 : 1 : 5 (v/v/v). К полученному раствору при перемешивании добавляли 3 мл 2%-ного водного раствора NH₄OH (pH 8.0–9.0) и 5 мл 3%-ного водного раствора H₂O₂. Полноту образования дисульфидной связи проверяли при помощи реактива Эллмана и ВЭЖХ. По окончании циклизации в реакционную смесь добавляли AcOH до pH 4.0, упаривали органические растворители в вакууме, продукт очищали с помощью ВЭЖХ. Выход Атозибана-ацетата составил 2.39 г (31.5% в расчете на стартовую аминокислоту).

Масс-спектр ESI⁺, *m/z* (*I*_{отн.}, %): 994.54 (100) [*M*]⁺. Чистота (ВЭЖХ): 99.66%.

Спектр ¹H-ЯМР приведен в дополнительных материалах.

б) *Замыкание S–S-связи на твердой фазе.* К суспензии 10 г нонапептидил-полимера (**Ia**) (3.62 ммоль) в 400 мл DMF добавляли 100 мл раствора иода (10.86 ммоль) в DMF и энергично перемешивали в течение 2 ч, пептидил-полимер отфильтровывали, промывали на фильтре DMF (3 × 100 мл). Затем избыток иода удаляли 10%-ным раствором аскорбиновой кислоты в смеси DMF/H₂O 2 : 1 (2 × 100 мл), пептидил-полимер отфильтровывали, промывали на фильтре DMF (3 × 100 мл), дихлорметаном (3 × 100 мл) и высушивали. Отщепление пептида от полимера проводили в одну стадию путем обработки пептидил-полимера 85 мл смеси (90% TFA, 5% деионизованной воды, 5% TIS) при комнатной температуре в течение 1.5 ч. Полимер отфильтровывали, промывали деблокирующей смесью (2 × 40 мл). Фильтрат упаривали до маслообразного состояния, осаждали продукт 85 мл диэтилового эфира, отфильтровывали выпавший осадок, промывали диэтиловым эфиром (2 × 40 мл).

Получили 3 г белого порошка. Содержание основного вещества в образце по данным ВЭЖХ составило 85.51%. Сырой продукт растворяли в 150 мл воды, pH реакционной смеси доводили 2.5%-ным раствором аммиака до 6.5–7.5. При перемешивании к гомогенному раствору добавляли 0.6 мл 3%-ной H₂O₂. Полноту образования дисульфидной связи проверяли при помощи реактива Эллмана [18] и ВЭЖХ. К раствору добавляли AcOH до pH 4.0–5.0 и очищали с помощью ВЭЖХ. Выход Атозибана-ацетата составил 1.9 г (50% в расчете на стартовую аминокислоту).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная нами методика позволяет получить технический Атозибан чистотой более 85% с образованием димерных продуктов менее 5%, что открывает возможности внедрения этой методики в промышленное производство.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке ЗАО «Обнинская химико-фармацевтическая компания».

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Myers R.D. // Peptides. 1994. V. 15. P. 367–381. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(94\)90025-6](https://doi.org/10.1016/0196-9781(94)90025-6)
2. Kondo F., Okada S., Miyachi A., Kurita M., Tsuji K., Harada K. // Anal. Bioanal. Chem. 2012. V. 7. P. 1783–1791. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5635-6>
3. Schteingart C.D., Lau J.L. // Annual Reports in Medicinal Chemistry. 2017. V. 50. P. 543–586. <https://doi.org/10.1016/bs.armc.2017.08.003>
4. Авдеев Д.В., Сидорова М.В., Овчинников М.В., Моисеева Н.И., Осипов В.Н., Балаев А.Н., Хачатрян Д.С. // Биоорг. химия. 2019. Т. 45. С. 374–379. [Avdeev D.V., Sidorova M.V., Ovchinnikov M.V., Moiseeva N.I., Osipov V.N., Balaev A.N., Khachatryan D.S. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 248–252.] <https://doi.org/10.1134/S1068162019040034>
5. Kyncl J., Rudinger J. // J. Endocr. 1970. V. 48. P. 157–165. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0480157>

6. *Gajjar K., Martin-Hirsch P.P., Bryant A., Owens G.L.* // Cochrane Database of Systematic Reviews. 2016. V. 7. P. 1–81.
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD006120.pub4>
7. *Mannucci P.M.* // Haemophilia. 2000. V. 6. P. 60–67.
8. *Ronald F.L., Ronald Kam K.Y.* // Expert Rev. 2008. Obstet. Gynecol. V. 3. P. 163–174.
<https://doi.org/10.1586/17474108.3.2.163>
9. *Andersson L., Blomberg L., Flegel M., Lepsa L., Bo Nilsson, Verlander M.* // Biopolymers. 2000. V. 55. P. 227–250.
[https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)55:3<227::AID-BIP50>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)55:3<227::AID-BIP50>3.0.CO;2-7)
10. *Musaimi O.Al., Shaer D. Al., de la Torre B.G., Albericio F.* // Pharmaceuticals. 2018. V. 11. P. 1–10.
<https://doi.org/10.3390/ph11020042>
11. *Кудрявцева Е.В., Сидорова М.В., Евстигнеева Р.П.* // Усп. химии. 1998. Т. 67. С. 611–630.
12. *Rabenstein D.L., Yeo P.L.* // J. Org. Chem. 1994. V. 59. P. 4223–4229.
<https://doi.org/10.1021/jo00094a039>
13. *Жмак М.Н., Кашеверов И.Е., Уткин Ю.Н., Цетлин В.И., Вольпина О.М., Иванов В.Т.* // Биоорг. химия. 2001. Т. 27. С. 83–88. [*Zhmak M.N., Kashesheverov I.E., Utkin Yu.N., Tsetlin V.I., Vol'pina O.M., Ivanov V.T.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2001. V. 27. P. 67–71.]
<https://doi.org/10.1023/A:1011319101676>
14. *Andreu D., Albericio F., Solé N.A., Munson M.C., Ferrer M., Barany G.* // Methods Mol. Biol. 1994. V. 35. P. 91–169.
<https://doi.org/10.1385/0-89603-273-6:91>
15. *Fujii N., Otaka A., Funakoshi S., Bessho K., Watanabe T., Akaji K., Yajima H.* // Chem. Pharm. Bull. 1987. V. 35. P. 2339–2347.
16. *Koide T., Otaka A., Suzuki H., Fujii N.* // Synlett. 1991. V. 345. P. 1
<https://doi.org/10.1002/chin.199205259>
17. *Góngora-Benítez M., Tulla-Puche J., Albericio F.* // Chem. Rev. 2014. V. 114. P. 901–926.
<https://doi.org/10.1021/cr400031z>
18. *Bray B.L.* // Nat. Rev. 2003. V. 2. P. 586–593.
<https://doi.org/10.1038/nrd1133>
19. *Сидорова М.В., Палькеева М.Е., Азьмуко А.А., Овчинников М.В., Молокоедов А.С., Бушувев В.Н., Писаренко О.И.* // Биоорг. химия. 2019. Т. 45. С. 145–154. [*Sidorova M.V., Palkeeva M.E., Azmuko A.A., Ovchinnikov M.V., Molokoedov A.S., Bushuev V.N., Pisarenko O.I.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 18–26.]
<https://doi.org/10.1134/S106816201901014X>
20. *Сидорова М.В., Молокоедов А.С., Азьмуко А.А., Кудрявцева Е.В., Краузе Е., Овчинников М.В., Беспалова Ж.Д.* // Биоорг. химия. 2004. Т. 30. С. 115–125. [*Sidorova M.V., Molokoedov A.S., Az'muko A.A., Kudryavtseva E.V., Krause E., Ovchinnikov M.V., Besspalova Zh.D.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2004. V. 30. P. 101–110.]
<https://doi.org/10.1023/B:RUBI.0000023093.05123.31>
21. *Moroder L., Besse D., Musiol H.-J., Rudolph-Boehner S., Sideler F.* // Biopolymers. 1996. V. 40. P. 207–234.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0282\(1996\)40:2<207::aid-bip2>3.0.co;2-#](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0282(1996)40:2<207::aid-bip2>3.0.co;2-#)
22. *Ellman G.L.* // Arch. Biochem. Biophys. 1959. V. 82. P. 70–77.
[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
23. *Albericio F., Hammer R.P., García-Echeverría C., Molins M.A., Chang J.L., Munson M.C., Pons M., Giralt E., Barany G.* // Int. J. Pept. Protein Res. 1991. V. 37. P. 402–413.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1991.tb00755.x>
24. *Garcia-Echeverria C., Albericio F., Pons I.M., Barany G., Giralt E.* // Tetrahedron Letters. 1989. V. 30. P. 2441–2444.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)80422-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)80422-6)

Development of an Optimal Method for Closing the Disulfide Bond in the Synthesis of Atosiban – Antagonist of Oxytocin Receptors

D. V. Avdeev*, #, M. V. Ovchinnikov*, Y. S. Dudkina*, A. S. Molokoedov*, A. A. Azmuko*, M. E. Palkeeva*, and M. V. Sidorova*

#Phone: +7 (915) 051-25-55; e-mail: mityaavdeev93@mail.ru

*National Medical Research Center for Cardiology, Ministry of Health of the Russian Federation, 3-ya Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia

This work is devoted to large-scale solid-phase synthesis (SPS) of Atosiban – Mpa¹-D-Tyr(OEt)-Ile-Thr-Asn-Cys⁶-Pro-Orn-Gly-NH₂ 1,6 disulfide – the only clinically used oxytocin receptor antagonist. The conditions have been selected for the closure of the disulfide bond (S–S) in the Atosiban molecule both in solution and in the course of SPS with minimal formation of by-products. A comparative assessment of the formation of S–S bonds was carried out in various conditions. The by-products formed during the closure of the disulfide bond have been studied both in solution and on a polymer support. A technique has been developed that allows the synthesis of Atosiban on an enlarged scale, including the cyclization of a protected intermediate with the formation of an S–S bond during solid-phase synthesis, with minimal formation of by-products.

Keywords: oxytocin receptor antagonist, Atosiban, solid-phase synthesis, disulfide bond closure



УДК 577.112.6+547-327

МИМЕТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ Arg-Gly-Asp: СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИАГРЕГАЦИОННЫХ СВОЙСТВ

© 2021 г. О. В. Грибовская*, #, В. П. Мартинович*, Е. В. Родько**, Е. Д. Расюк**, Т. В. Рябцева***, В. П. Голубович*

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Беларусь, 220141 Минск, ул. Ак. Куревича, 5/2

**ГУ “Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий”, Беларусь, 220053 Минск, Долгиновский тракт, 160

***ГУ “Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии”, Беларусь, 220116 Минск, ул. Семашко, 8

Поступила в редакцию 16.03.2021 г.

После доработки 27.03.2021 г.

Принята к публикации 29.03.2021 г.

Известно, что последовательность Arg-Gly-Asp в молекуле фибриногена – ключевая в связывании с рецепторами, находящимися на поверхности тромбоцитов. С целью поиска соединений, способных ингибировать данное взаимодействие, были синтезированы аналоги Arg-Gly-Asp-последовательности – 2-ацетоксибензоил-Arg-βAla-Asp, 4-пиперидинкарбонил-βAla-Asp и 4-аминобензоил-βAla-Asp. Показано, что данные соединения способны в разной степени ингибировать агрегацию тромбоцитов. Наибольшую способность ингибировать агрегацию тромбоцитов показал 2-ацетоксибензоил-Arg-βAla-Asp. Также установлено снижение экспрессии маркеров CD62p и CD63 на тромбоцитах при воздействии на них аналогов Arg-Gly-Asp, что подтверждает способность данных соединений блокировать сайты связывания фибриногена с гликопротеиновыми рецепторами GP IIb/IIIa.

Ключевые слова: Arg-Gly-Asp-миметики, агрегация тромбоцитов, пептидный синтез, GP IIb/IIIa-рецептор, маркеры тромбоцитов

DOI: 10.31857/S0132342321060087

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания – основная причина смерти и инвалидности практически во всех развитых странах. Превалирующее количество летальных исходов приходится на инфаркт миокарда, вызываемый закупоркой сосудов тромбами. Образованию же тромбов чаще всего способствуют гликопротеиновые рецепторы тромбоцитов, поскольку конечным звеном в агрегации тромбоцитов оказывается связывание фибриногена с активированными GP IIb/IIIa-рецепторами тромбоцитов. GP IIb/IIIa-рецептор относится к суперсемейству структурно родственных гликопротеиновых рецепторов, состоящих из двух субъединиц: GP IIb или α_{IIb} (α-субъединица) и GP IIIa или β₃ (β-субъединица), присутствующих в различных клетках и названных “интегринными” [1] или “цитоадгезинами” [2].

Сокращения: GP – гликопротеин; βAla – β-аланин; DIPС – *N,N'*-диизопропилкарбодимид; TEA – триэтиламин; HOSu – *N*-гидроксиsuccинимид; HOBT – *N*-гидроксибензотриазол; ESI – ионизация распылением в электрическом поле; ОТП – обогащенная тромбоцитами плазма.

Автор для связи: (тел.: + 37517 374-82-63; эл. почта: olymelnik@yandex.ru).

Известно, что некоторые интегринны, включая GP IIb/IIIa, распознают общую аминокислотную последовательность – трипептид Arg-Gly-Asp. Эта последовательность присутствует в цепях большинства адгезивных гликопротеинов, выполняющих различные функции. Важность Arg-Gly-Asp-последовательности подтверждается ингибированием процесса адгезии гликопротеинов в присутствии коротких Arg-Gly-Asp-содержащих пептидов [3]. Несмотря на общий участок распознавания, интегринны высокоспецифичны во взаимодействии с различными гликопротеинами [1, 2].

К настоящему времени определены необходимые функциональные группы в структуре Arg-Gly-Asp-миметиков, участвующие в ионном и гидрофобном взаимодействии с рецептором [4].

Варьирование структуры Arg-Gly-Asp-последовательности [5, 6] позволяет получать соединения с различными физиологическими временами жизни. Известно, что низкомолекулярные Arg-Gly-Asp-содержащие пептиды и пептидомиметики нашли применение при наличии высокого и среднего риска ишемии при остром коронарном синдроме, при ангиопластике в комбинации с клопидогрелем [7, 8]. Например, эптифибатид

(интегрилин), Arg-Gly-Asp-подобный циклический гептапептид, отличается достаточно высокой специфичностью по отношению к GP IIb/IIIa и не оказывает существенного влияния на активность других интегринов [9, 10]. Было создано также несколько пептидомиметиков Arg-Gly-Asp-последовательности, ингибиторов GP IIb/IIIa, для перорального применения (ксемилофибан, орбофибан, сибрафибан, лотрафибан) [11]. Предполагалось использовать их с целью длительной профилактики тромбозов. К сожалению, многочисленные исследования данных веществ [12] не только не показали преимущества их перед аспирином, но даже выявили их высокую цитотоксичность. Это не дало оснований для их клинического применения.

Поэтому разработка новых ферментативно устойчивых, а значит — длительно действующих, Arg-Gly-Asp-пептидов и пептидомиметиков для орального применения важна для лечения и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний и нарушений мозгового кровообращения.

Цель данного исследования состояла в получении новых аналогов аминокислотной последовательности Arg-Gly-Asp, способных ингибировать агрегацию тромбоцитов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основой для создания миметиков последовательности Arg-Gly-Asp служил трипептид Arg-βAla-

Asp, как показано ранее, эффективный ингибитор агрегации тромбоцитов [13]. Для создания конъюгата с аспирином, способного блокировать тромбообразование по двум механизмам — ингибированию активации тромбоцитов тромбоксаном A₂ и прямому блокированию сайтов связывания гликопротеиновых рецепторов GP IIb/IIIa, был синтезирован 2-ацетоксибензоил-Arg-βAla-Asp (**V**) — трипептид Arg-βAla-Asp, ацилированный по α-аминогруппе аргинина ацетилсалициловой кислотой, соединением, обладающим собственной антитромботической активностью.

Исходным соединением в синтезе миметиков Arg-Gly-Asp был дипептид Boc-βAla-Asp(OMe)-OMe (**I**), который получали конденсацией диметилового эфира аспарагиновой кислоты с защищенной аминокислотой Boc-βAla-OH. В качестве конденсирующего агента использовали *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид с добавлением *N*-гидроксисукцинимидоэфира (схема 1). Далее синтезированным сукцинимидным эфиром ацетилсалициловой кислоты ацилировали α-аминогруппу аргинина. Модифицированный трипептид 2-ацетоксибензоил-Arg-βAla-Asp(OMe)-OMe (**IV**) был получен конденсацией 2-ацетоксибензоил-аргинина с H-βAla-Asp(OMe)-OMe. Заключительная стадия синтеза — щелочной гидролиз сложноэфирных групп аспарагиновой кислоты. Синтез включает 6 стадий, общий выход соединения (**V**) составил 46%.

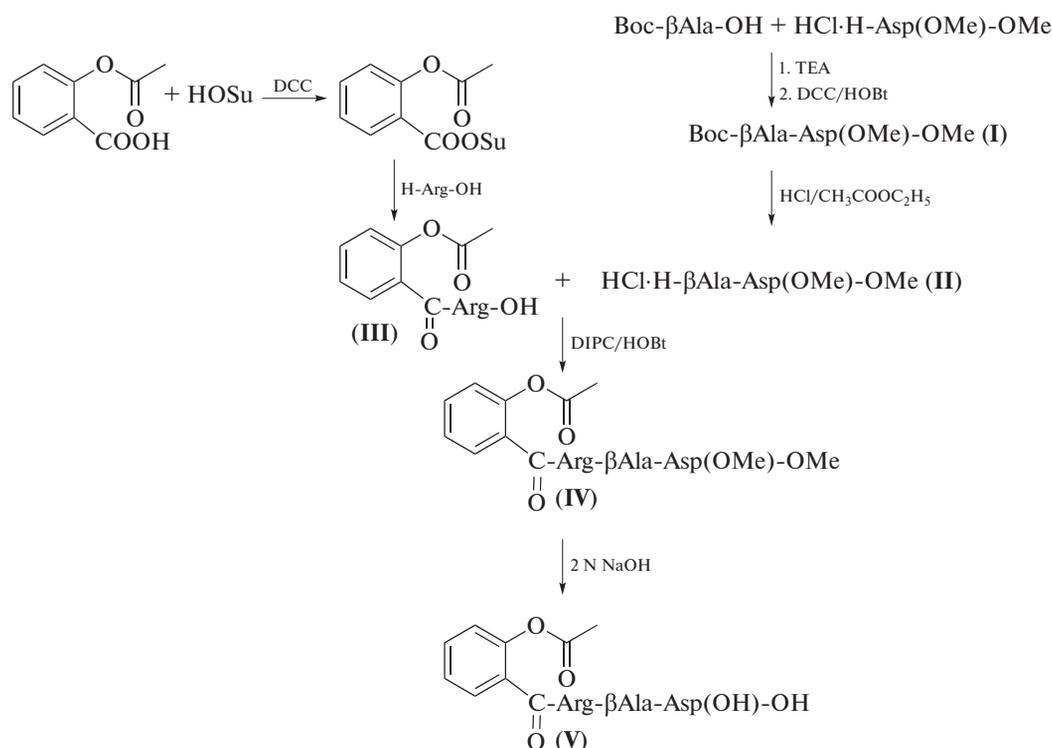


Схема 1. Схема синтеза 2-ацетоксибензоил-Arg-βAla-Asp.

Опираясь на работы [14, 15], мы предположили, что замена аргинина в последовательности Arg-βAla-Asp на 4-пиперидинкарбоновую и 4-аминобензойную кислоты вызовет увеличение антитромботической активности соединений. Это можно объяснить тем, что циклические фрагменты структур пептидомиметиков, имитирующие боковую цепь аргинина, способствуют стабилизации необходимой для проявления биологической активности конформации.

Синтез соединения 4-аминобензоил-βAla-Asp (VIII) осуществляли по схеме 2. Конденсация Вос-производного 4-аминобензойной кислоты, полученного обработкой последней ди-трет-бутилдикарбонатом в водно-диоксановой смеси, с дипептидом HCl·H-βAla-Asp(OMe)-OMe (II) протекала с высоким выходом (86%). Деблокирование соединения (VI) проводили в две стадии – щелочным (для омыления сложноэфирных групп аспарагиновой кислоты) и кислотным гидролизом (для удаления кислотолабильной защитной Вос-группы).

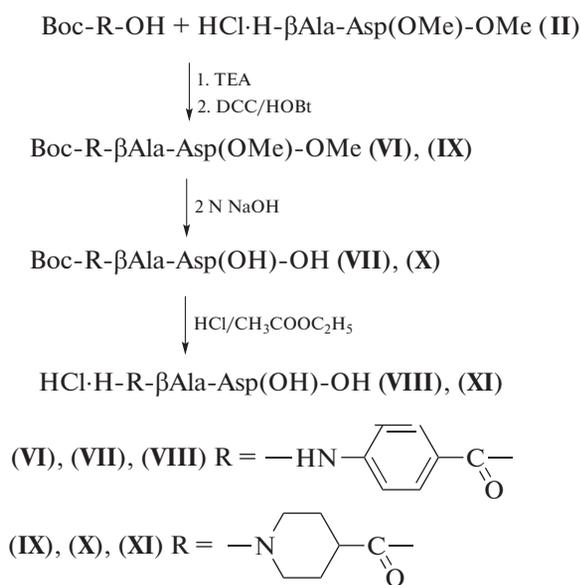


Схема 2. Схема синтеза 4-пиперидинкарбонил-βAla-Asp и 4-аминобензоил-βAla-Asp.

При синтезе 4-пиперидинкарбонил-βAla-Asp (XI) использовали вышеописанные синтетические подходы. Суммарные выходы 4-пиперидинкарбонил-βAla-Asp (XI) и 4-аминобензоил-βAla-Asp (VIII) составили 40 и 51% соответственно. Идентификацию целевых соединений выполняли методами масс-спектрометрии, ¹H-ЯМР-спектроскопии, гомогенность подтверждали методами ТСХ и аналитической ВЭЖХ.

Антиагрегационную активность полученных соединений изучали на богатой тромбоцитами плазме крови человека с использованием ADP в качестве индуктора агрегации тромбоцитов (рис. 1). Исследования показали, что все аналоги

последовательности Arg-βAla-Asp – 2-ацетоксибензоил-Arg-βAla-Asp (V), 4-пиперидинкарбонил-βAla-Asp (XI) и 4-аминобензоил-βAla-Asp (VIII) – способны в разной степени ингибировать агрегацию тромбоцитов, но все они более активны, чем исходный трипептид Arg-βAla-Asp.

Наибольшую способность ингибировать агрегацию тромбоцитов показало соединение 2-ацетоксибензоил-Arg-βAla-Asp (V), при добавлении которого степень агрегации снижалась с 42.6 до 15.0% у первого и с 83.7 до 24.1% у второго донора.

Известно [16], что активация тромбоцитов связана с изменением экспрессии ряда поверхностных рецепторов. Для выявления активированных тромбоцитов при иммунофенотипировании чаще всего используют маркеры CD36 (рецептор тромбоспондина), CD61 (интегриновая цепь β3) и CD41 (α-цепь интегрин в комплексе CD61/CD41, известен также как GPIIb/IIIa, CD42a [GPIX], CD42b [GPIb]) и CD62P (P-селектин). Эти гликопротеины экспрессируются тромбоцитами и мегакариоцитами, обеспечивая клеточную адгезию и связывание фибриногена, что приводит к агрегации тромбоцитов и их закреплению на эндотелии [17]. Так, P-селектин (CD62P) содержится в α-гранулах тромбоцитов и выступает кальций-зависимым белком, который во время активации тромбоцита перемещается к плазматической мембране, где он участвует во взаимодействии тромбоцитов с эндотелиальными клетками и лейкоцитами. Интегриновые рецепторы располагаются на мембране тромбоцитов в комплексе с тетраспонинами (CD9 и CD63), которые поддерживают трансдукцию сигнала и стабильную адгезию [18].

В подтверждение гипотезы о том, что полученные соединения – 2-ацетоксибензоил-Arg-βAla-Asp (V), 4-пиперидинкарбонил-βAla-Asp (XI) и 4-аминобензоил-βAla-Asp (VIII) – способны напрямую блокировать сайты связывания гликопротеидных рецепторов GP IIb/IIIa, мы провели оценку экспрессии маркеров тромбоцитов после контакта и инкубации Arg-βAla-Asp-пептида и его аналогов с образцами клеточного тромбоконцентрата методом проточной цитофлуориметрии (BD FACSCantoII). Экспрессию оценивали, регистрируя процент тромбоцитов, связавшихся с флуоресцентно мечеными антителами относительно маркеров (табл. 1).

Полученные результаты – изменение экспрессии маркера CD62p, Δ% от 8.10 (для Arg-βAla-Asp) до 3.10 (для 2-ацетоксибензоил-Arg-βAla-Asp) и маркера CD63, Δ% от 7.15 (для Arg-βAla-Asp) до 1.40 (для соединения (V)) – свидетельствуют о снижении экспрессии маркеров CD62p и CD63 на тромбоцитах при воздействии на них исследуемых веществ, подтверждая, что синтезированные соединения (V), (VIII) и (XI) способны бло-

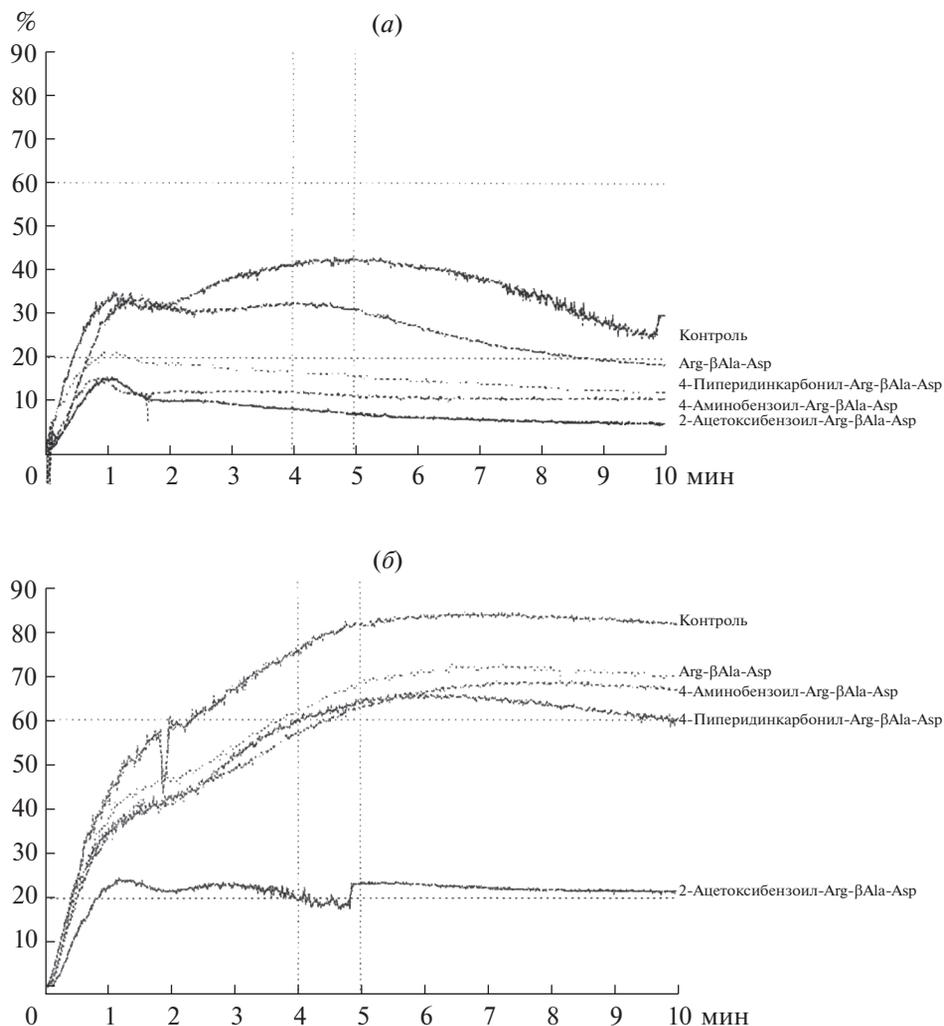


Рис. 1. Агрегация тромбоцитов в присутствии Arg-βAla-Asp и аналогов в концентрации 10^{-5} М в плазме первого (а) и второго (б) доноров.

кировать сайты связывания фибриногена с гликопротеиновыми рецепторами GP IIb/IIIa. Незначительное снижение экспрессии маркера CD62p и CD63 на тромбоцитах при воздействии на них 2-ацетоксибензоил-Arg-βAla-Asp (**V**) скорее всего связано с тем, что немалую роль в ингибировании агрегации тромбоцитов играет способность данного соединения подавлять синтез тромбосана A_2 — индуктора агрегации тромбоцитов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы аминокислоты, реагенты, растворители (Sigma, США, Fluka, Швейцария, Acros Organics, Бельгия). Процессы синтеза соединений, удаления защитных групп контролировали методом ТСХ на пластинках с закрепленным слоем силикагеля (Sorbfil, Россия) в системах растворителей: хлороформ—метанол—

25%-ный раствор аммиака, 6 : 4 : 1 (А); бутанол—уксусная кислота—вода, 4 : 1 : 1 (Б); этилацетат—пиридин—уксусная кислота—вода, 5 : 3 : 2 : 1 (В). Вещества обнаруживали на пластинках с помощью хлор-бензидинового реагента.

Аналитическую ВЭЖХ проводили на хроматографе Agilent 1200 (США) с масс-детектором QQQ (Triple Quadrupole) Agilent 6410, колонка Agilent Zorbax SB C18 RR (2.1 × 30 мм). Использовали градиент концентраций ацетонитрила от 10 до 95% в 0.05%-ном растворе муравьиной кислоты. Скорость потока 0.5 мл/мин.

Спектры ^1H -ЯМР получены на спектрометре AVANCE 500, Bruker BioSpin (США), с рабочей частотой 500 МГц для ядер ^1H в CD_3OD . Химические сдвиги приведены в миллионных долях, а КССВ — в герцах. В качестве внутреннего стандарта использован сигнал растворителя δ_{H} 3.34 м.д. (CD_3OD).

Температуры плавления (некорректируемые) определяли на приборе Кофлера. Удельное вращение соединений измеряли на спектрополяриметре J-20 "Jasco" (Япония).

Вос-βAla-Asp(OMe)₂ (I). К раствору 3.06 г (15.5 ммоль) хлоргидрата диметилового эфира аспарагиновой кислоты в 12.5 мл DMF добавляли 2.80 мл ТЕА (20.2 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин и затем добавляли 2.93 г (15.5 ммоль) Вос-βAla-OH. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд вносили последовательно 2.20 г (16.3 ммоль) НОВт и 4.80 г (23.3 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали в течение 1.5 ч при 0°C и 4 ч при комнатной температуре, осадок отфильтровывали, промывали на фильтре 4.0 мл DMF. В фильтрат добавляли 40.0 мл этилацетата, полученный раствор промывали 9%-ным раствором лимонной кислоты, 5%-ным раствором NaHCO₃, насыщенным раствором NaCl, водой, затем сушили над Na₂SO₄. После сушки этилацетат упаривали, а образовавшийся маслообразный остаток переосаждали из диэтилового эфира петролейным эфиром и сушили над P₂O₅. После сушки в эксикаторе продукт закристаллизовался. Получили 3.50 г (68%) соединения (I), $[\alpha]_D^{20} +9.5^\circ$ (с 1, MeOH), R_f 0.55 (Б), 0.90 (В).

HCl·H-βAla-Asp(OMe)-OMe (II). К раствору 3.32 г (10.0 ммоль) соединения (I) в 2.0 мл этилацетата добавляли 5.7 мл 4.5 н. раствора HCl в этилацетате. Перемешивали взвесь в течение 50 мин, осадок отделяли фильтрованием, промывали на фильтре этилацетатом, эфиром, сушили в эксикаторе над NaOH. Выход продукта (II) составил 2.70 г (99%). $[\alpha]_D^{20} -3.5^\circ$ (с 1, MeOH), R_f 0.26 (А), 0.78 (Б).

2-Ацетоксибензоил-Arg (III). К раствору 0.90 г (5.0 ммоль) 2-ацетоксибензойной кислоты в 5.0 мл диоксана добавляли 0.63 г (5.5 ммоль) *N*-гидроксисукцинимид. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд прибавляли 1.23 г (6.0 ммоль) DCC. Перемешивали 1 ч при охлаждении и 2 ч при комнатной температуре. После окончания реакции осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали, а полученный раствор *N*-гидроксисукцинимидного эфира 2-ацетоксибензойной кислоты добавляли к 4.0 мл охлажденного водного раствора, содержащего 0.65 г (3.7 ммоль) аргинина. После окончания реакции (12 ч) диоксан упаривали, а в остаток добавляли 12.0 мл ацетона. Выпавший кристаллический осадок соединения (III) дважды промывали этилацетатом по 3.0 мл. После сушки в вакууме над P₂O₅ получали 0.98 г (79%) кристаллического соединения (III), R_f 0.70 (А), 0.58 (В). Масс-спектр ESI, m/z : 337.36 $[M + H]^+$, 382.38 $[M + 2Na]^+$.

2-Ацетоксибензоил-Arg-βAla-Asp(OMe)-OMe (IV). К раствору 0.67 г (2.7 ммоль) соединения (II) в 3.5 мл DMF добавляли 0.90 г (2.7 ммоль) 2-ацетоксибензоил-Arg (III). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч. Охладив реакционный сосуд до 0°C, вносили последовательно 0.38 г (2.8 ммоль) НОВт и 0.45 мл (2.9 ммоль) DIPС. Реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч при 0°C и 4 ч при комнатной температуре, осадок отфильтровывали, промывали на фильтре 0.5 мл DMF. В фильтрат добавляли 15.0 мл диэтилового эфира, выпавший осадок переосаждали из метанола диэтиловым эфиром. Очистку соединения проводили методом колоночной хроматографии на силикагеле 60 (0.02–0.045 мм), используя в качестве элюента смесь хлороформ–метанол–вода в соотношении 20 : 24 : 1. Фракции, содержащие чистый пептид, объединяли и упаривали. После сушки в эксикаторе получили 0.68 г (49%) соединения (IV). R_f 0.88 (А), 0.91 (В). По данным ВЭЖХ содержание целевого соединения (IV) – 98%. Масс-спектр ESI, m/z : 551.69 $[M + H]^+$, 573.73 $[M + Na]^+$.

2-Ацетоксибензоил-Arg-βAla-Asp (V). К раствору 0.42 г (0.8 ммоль) соединения (IV) в 9.7 мл метанола добавляли 0.9 мл 2 н. NaOH. После окончания гидролиза реакционную смесь нейтрализовывали до pH 2–3 4.5 н. раствором HCl в этилацетате, растворитель упаривали в вакууме досуха, а к остатку добавляли 2.0 мл метанола. Нерастворившийся осадок NaCl отфильтровывали, в фильтрат добавляли 5.0 мл безводного эфира. После переосаждения из метанола диэтиловым эфиром и сушки в эксикаторе над P₂O₅ было получено 0.39 г (89%) соединения (V) с т. пл. 95–97°C, R_f 0.67 (А), 0.57 (Б). Масс-спектр ESI, m/z : 523.69 $[M + H]^+$, 545.73 $[M + Na]^+$. ¹H-ЯМР (CD₃OD): 1.27 (2H, м, CHCH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂), 1.31 (2H, м, CHCH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂), 2.62 (2H, д, J 20, CH₂COOH), 2.73 (3H, с, OCOCH₃), 2.84 (2H, м, CHCH₂CH₂CH₂NH), 3.19 (1H, м, NHCH(CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂)CO), 3.48 (1H, м, CH(CH₂COOH)COOH), 3.70–3.75 (4H, м, HNCH₂CH₂CO), 7.21–7.87 (4H, м, C₆H₄(OCOCH₃)CO).

Вос-4-аминобензоил-βAla-Asp(OMe)-OMe (VI). К раствору 0.84 г (3.1 ммоль) соединения (II) в 3.5 мл DMF добавляли 0.55 мл ТЕА (4.0 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин и затем добавляли 0.74 г (3.1 ммоль) Вос-4-аминобензойной кислоты. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд добавляли последовательно 0.43 г (3.2 ммоль) НОВт и 0.76 г (3.7 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при 0°C и 10 ч при комнатной температуре, осадок отфильтровывали, промывали на

фильтре 1.0 мл DMF. В фильтрат добавляли 10.0 мл этилацетата, полученный раствор промывали 9%-ным раствором лимонной кислоты, 5%-ным раствором NaHCO_3 , насыщенным раствором NaCl , водой, затем сушили над Na_2SO_4 . После сушки этилацетат упаривали, а к остатку добавляли 7.0 мл петролейного эфира. После выдерживания на холоде продукт закристаллизовался, его отфильтровали и сушили над P_2O_5 . Выход соединения (VI) составил 1.20 г (86%). R_f 0.82 (Б), 0.88 (В). Масс-спектр ESI, m/z : 451.88 $[M]^+$.

Вос-4-аминобензоил- β Ala-Asp (VII) образуется в результате омыления 1.00 г (2.2 ммоль) соединения (VI) 2.54 мл 2 н. раствора NaOH в течение 45 мин. Выход кристаллического продукта после обработки, аналогичной для соединения (V), составил 0.83 г (89%). R_f 0.56 (Б), 0.77 (В). Масс-спектр ESI, m/z : 423.81 $[M]^+$, 446.82 $[M + \text{Na}]^+$.

HCl-4-аминобензоил- β Ala-Asp (VIII). К раствору 0.75 г (1.7 ммоль) Вос-4-аминобензоил- β Ala-Asp (VII) в 2.0 мл этилацетата добавляли 6.8 мл 4.5 н. раствора HCl в этилацетате. Раствор перемешивали в течение 1 ч, растворитель удаляли, а остаток два раза промывали диэтиловым эфиром. После высушивания в эксикаторе над NaOH получено 0.63 г (98%) соединения (VIII) с т. пл. 280–285°C, R_f 0.53 (А), 0.45 (В). По данным ВЭЖХ содержание целевого соединения (VIII) – 96%. Масс-спектр ESI, m/z : 323.38 $[M]^+$, 359.83 $[M + \text{Na}]^+$. $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 1.20 (2H, тр, J 10, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 2.50 (2H, д, J 20, CH_2COOH), 3.52 (2H, м, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 4.65 (1H, м, $\text{NHCH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{COOH}$), 6.96; 7.41; 7.91 (4H, 3 д, J 5; 10; 5, $\text{NH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}$).

Вос-4-пиперидинкарбонил- β Ala-Asp(OMe)-OMe (IX) К раствору 1.08 г (4.0 ммоль) соединения (II) в 4.5 мл DMF прибавляли 0.42 мл (5.2 ммоль) TEA. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин и затем добавляли 0.92 г (4.0 ммоль) Вос-4-пиперидинкарбонической кислоты. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд добавляли последовательно 0.57 г (4.2 ммоль) NOEt и 0.99 г (4.8 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при 0°C и 10 ч при комнатной температуре. Очистку и выделение вещества (VIII) проводили аналогично описанному для соединения (VI). Выход продукта составил 1.25 г (68.7%). R_f 0.78 (А), 0.84 (В). Масс-спектр ESI, m/z : 443.36 $[M]^+$, 466.38 $[M + 2\text{Na}]^+$, 489.56 $[M + 2\text{Na}]^+$.

Вос-4-пиперидинкарбонил- β Ala-Asp (X) образуется в результате омыления 0.96 г (2.1 ммоль) соединения (IX) 2.52 мл 2 н. раствора NaOH в течение 45 мин. Выход кристаллического продукта после обработки, аналогичной для соединения (V),

составил 0.82 г (91%). R_f 0.53 (Б), 0.67 (В). Масс-спектр ESI, m/z : 415.38 $[M]^+$, 438.36 $[M + \text{Na}]^+$.

HCl-4-пиперидинкарбонил- β Ala-Asp (XI). К раствору 0.75 г (1.8 ммоль) Вос-4-пиперидинкарбонил- β Ala-Asp (X) в 2.0 мл этилацетата добавляли 7.0 мл 4.5 н. раствора HCl в этилацетате. Раствор перемешивали в течение 1 ч, растворитель удаляли, а остаток два раза промывали диэтиловым эфиром. После сушки в эксикаторе над NaOH было получено 0.61 г (97%) соединения (X) с т. пл. 120–122°C, R_f 0.58 (А), 0.34 (В). По данным ВЭЖХ содержание целевого вещества (X) – 98%. Масс-спектр ESI, m/z : 338.32 $[M + \text{Na}]^+$, 361.38 $[M + 2\text{Na}]^+$. $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 1.28 (1H, кв, J 10, $\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_{2\text{пиперидин}}$), 1.92–2.02 (4H, м, $\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_{2\text{пиперидин}}$), 2.87 (2H, м, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 3.06 (2H, тр, J 15, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 3.47 (4H, м, $\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{пиперидин}$), 3.74 (2H, д, J 20, CH_2COOH), 4.18 (1H, м, $\text{NHCH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{COOH}$).

Ингибирование ADP-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro*. Изучение агрегации тромбоцитов проводили с использованием обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП), с информированного согласия доноров. Для исключения контактной активации тромбоцитов в работе использовали только пластмассовую или силиконовую посуду (кюветы, пробирки, пипетки). Донорскую кровь смешивали с 3.8%-ным раствором цитрата натрия в соотношении 9 : 1 по объему и центрифугировали при малых оборотах (7 мин при 200 г). Супернатант, представляющий собой ОТП, отбирали в пластиковую посуду. Затем оставшуюся кровь центрифугировали, но уже на более высоких оборотах (15 мин при 2000 г). Образовавшийся после повторного центрифугирования верхний слой представлял собой бестромбоцитную плазму. ОТП использовали для исследования функциональной активности тромбоцитов, бестромбоцитную плазму – для калибровки шкалы оптической плотности прибора и, при необходимости, для разведения ОТП до стандартного содержания клеток, которое должно составлять 200–300 тыс. тромбоцитов/мкл. Агрегацию тромбоцитов вызывали введением агониста ADP в конечной концентрации 2.5 мкМ и регистрировали турбидиметрическим методом Борна [19] на агрегометре AP 2110 фирмы “Солар” (Беларусь, Минск). В контрольном опыте ОТП (300 мкл) инкубировали в течение 2 мин при 37°C с 0.9%-ным раствором NaCl (30 мкл). При исследовании соединений в ОТП (300 мкл) вносили исследуемое соединение с концентрацией 10^{-5} М в 0.9%-ным раствором NaCl . Затем добавляли ADP (30 мкл) и фиксировали протекание агрегации в течение 10 мин. Опыты проводили двукратно.

Определение поверхностных маркеров тромбоцитов осуществляли методом проточной цито-

Таблица 1. Экспрессия маркеров тромбоцитов после контакта и инкубации Arg-βAla-Asp-пептида и его аналогов с образцами клеточного тромбоконцентрата

Воздействующее вещество	Маркер на поверхности тромбоцитов			
	CD62p		CD63	
	экспрессия, %	изменение экспрессии, Δ%	экспрессия, %	изменение экспрессии, Δ%
Контрольный опыт	41.95 (3.55; 67.90)	—	40.80 (10.95; 67.45)	—
Arg-βAla-Asp	23.85 (3.05; 54.72)*	8.10 (0.55; 22.40)	24.04 (8.95; 42.40)*	7.15 (1.85; 24.75)
2-Ацетоксибензоил-Arg-βAla-Asp (V)	35.35 (3.15; 63.15)*	3.10 (0.60; 8.25)	39.70 (9.95; 64.30)*	1.40 (0.20; 2.30)
4-Аминобензоил-βAla-Asp (VIII)	21.25 (3.00; 52.20)*	4.55 (0.55; 13.20)	31.35 (9.15; 57.55)*	5.90 (1.15; 12.05)
4-Пиперидинкарбонил-βAla-Asp (XI)	26.15 (3.30; 46.71)*	6.55 (0.30; 24.69)	33.95 (9.45; 59.50)*	4.50 (1.35; 9.50)

Примечание: результаты представлены в виде медианы, в скобках указаны значения 25-го и 75-го перцентилей.

* Статистически значимые изменения, метод Фридмана ANOVA, $p \leq 0.05$.

флуориметрии (BDFACSCantoII). Тромбоциты получали методом автоматического тромбоцитозера в отделении экстракорпоральных методов лечения ГУ “Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии” с информированного согласия доноров. В опытной пробирке соединяли 500 мкл тромбоконцентрата с 500 мкл раствора исследуемого соединения с концентрацией 10^{-5} М в 0.9%-ном растворе NaCl. В контрольной пробирке использовали раствор NaCl (0.9%). Исходная концентрация тромбоцитов в тромбоконцентрате составляла 698.5 (582.0; 786.5) $\times 10^9$ /л. Данные представлены в виде медианы (25-й перцентиль; 75-й перцентиль). Статистический анализ разницы между экспрессией маркера на тромбоцитах в контрольной и опытных пробах проводили методом Фридмана.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенной работы получены аналоги последовательности Arg-βAla-Asp, способные эффективно ингибировать агрегацию тромбоцитов, что делает их перспективными соединениями для дальнейших исследований в качестве потенциальных антитромботических препаратов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры в рамках данного исследования, с участием людей как объектов исследования, были выполнены в соответствии с этическими стандартами национального комитета и комитета организации, где выполнено исследование, и в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 года и последующими ее изменениями или с сопоставимыми этическими стандартами.

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hynes R.O. // Cell. 1987. V. 48. P. 549–554. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90233-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90233-9)
- Plow E.F., Pierschbacher M.D., Ruoslahti E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 6002–6006. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.16.6002>
- Pierschbacher M.D., Ruoslahti E. // Nature. 1984. V. 309. P. 30–33. <https://doi.org/10.1038/309030a0>
- Zablocki J.A., Miyano M., Garland R.B., Pireh D., Schretzman L., Rao S.N., Lindmark R.J., Panzer-Knodle S. G., Nicholson N.S., Taite B.B. // J. Med. Chem. 1993. V. 36. P. 1811–1819. <https://doi.org/10.1021/jm00065a003>
- Miyashita M., Akamatsu M., Hayashi Y., Ueno T. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2000. V. 10. P. 859–863. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(00\)00113-X](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(00)00113-X)
- Cannon C.P. // Clin. Cardiol. 2003. V. 26. P. 358–364. <https://doi.org/10.1002/clc.4950260803>
- Hirsh J. // Guidelines for Antithrombotic Therapy. BC Decker Inc., Hamilton. Ontario, 1999. 72 p.
- Topol E.J., Moliterno D.J., Herrmann H.C., Powers E.R., Grines C.L., Cohen D.J., Cohen E.A., Bertrand M., Neumann F.J., Stone G.W., DiBattiste P.M., Demopoulos L. // N. Engl. J. Med. 2001. V. 344. P. 1888–1894. <https://doi.org/10.1056/NEJM200106213442502>
- Valgimigli M., Campo G., Percoco G., Bolognese L., Vasanelli C., Colangelo S., De Cesare N., Rodriguez E. A.,

- Ferrario M., Moreno R., Piva T., Sheiban I., Paschetto G., Prati F., Nazzaro M.S., Parrinello G., Ferrari R.* // JAMA. 2008. V. 299. P. 1788–1799.
<https://doi.org/10.1001/jama.299.15.joc80026>
10. *Sinnaeve P.R., Alexander J.H., Bogaerts K., Belmans A., Wallentin L., Armstrong P., Adgey J.A., Tendera M., Diaz R., Soares-Piegas L., Vahanian A., Granger C.B., Van De Werf F.J.* // Am Heart J. 2004. V. 147. P. 993–998.
<https://doi.org/10.1016/j.ahj.2003.12.028>
11. *Husted S.* // Eur. Heart J. 2007. V. 9. Suppl. D. P. D20–D27.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/sum012>
12. *Бокарев И.Н.* Противотромбоцитарная терапия в клинической практике. Методические рекомендации. Москва: Ньюдиамед, 2007. 34 с.
13. *Мельник О.В., Мартинович В.П., Голубович В.П.* // Биоорг. химия. 2006. Т. 32. С. 39–46. [*Mel'nik O.V., Martinovich V.P., Golubovich V.P.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2006. V. 32. P. 122–128.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162006020038>
14. *Pollina E.* // J. Undergrad. Sci. 1996. V. 3. P. 119–126.
15. *Nicholson N.S., Abood N.A., Panzer-Knodle S.G., Frederick L.G., Page J.D., Salyers A.K., Suleymanov O.D., Szalony J.A., Taite B.B., Anders R.J.* // Med. Res. Rev. 2001. V. 21. P. 211–226.
<https://doi.org/10.1002/med.1007>
16. *Kannan M., Ahmad F., Saxena R.* // Blood. 2019. V. 37. P. 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.05.007>
17. *Hechler B., Gachet C.* // Thromb. Vasc. Biol. 2015. V. 35. P. 2307–2315.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.303395>
18. *Israels S.J., McMillan-Ward E.M.* // J. Thromb. Haemost. 2005. V. 93. P. 311–318.
<https://doi.org/10.1160/TH04-08-0503>
19. *Born G.V.R.* // Nature. 1962. V. 194. P. 927–929.
<https://doi.org/10.1038/194927b0>

Mimetics of Arg-Gly-Asp Sequence: Synthesis and Study of Antiaggregation Activity

O. V. Gribovskaya*, #, V. P. Martinovich*, E. V. Rodko**, E. D. Rasyuk**,
 T. V. Ryabtseva***, and V. P. Golubovich*

#Phone: +375 17 374-82-63; e-mail: olymelnik@yandex.ru

*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, ul. ak. Kuprevicha 5/2, Minsk, 220141 Belarus

**State Institution “Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies”,
 Dolginovsky Tract 160, Minsk, 220053 Belarus

***State Institution “Minsk Scientific and Practical Center of Surgery, Transplantology and Hematology”,
 ul. Semashko 8, Minsk, 220045 Belarus

It is known that the Arg-Gly-Asp sequence in the molecule of fibrinogen is responsible for binding to receptors on the surface of platelet. The purpose of our work was to find new compounds that can inhibit this interaction. Mimetics of Arg-Gly-Asp sequence – 2-acetoxybenzoyl-Arg-βAla-Asp, 4-pipyridinecarbonyl-βAla-Asp, and 4-aminobenzoyl-βAla-Asp-OH were synthesized. It was shown that these compounds are capable to inhibit platelet aggregation with varying degrees. The mimetic 2-acetoxybenzoyl-Arg-βAla-Asp showed the greatest ability to inhibit platelet aggregation. Also, a decrease in the expression of markers CD62p and CD63 on platelets when exposed to mimetics was found, which confirms the ability of these compounds to block the binding sites of fibrinogen with glycoprotein receptors GP IIb/IIIa.

Keywords: Arg-Gly-Asp-mimetics, platelet aggregation, peptide synthesis, GP IIb/IIIa receptor, platelet markers



СИНТЕЗ И ОЦЕНКА ПСИХОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ КАРКАСНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АЛЬФА-ПИРРОЛИДОНА

© 2021 г. Ю. Н. Климочкин*, И. М. Ткаченко*, А. Н. Резников*,
В. А. Ширяев*, М. С. Казачкова*, Н. С. Ковалев**, Д. А. Бакулин**, #,
Е. Е. Абросимова**, Д. В. Куркин**, И. Н. Тюренков**

*ФГБОУ ВО «Самарский государственный технический университет», кафедра органической химии,
Россия, 443100 Самара, ул. Молодогвардейская, 244

**ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, лаборатория
фармакологии сердечно-сосудистых средств НЦИЛС, Россия, 400131 Волгоград, площадь Павших Борцов, 1

Поступила в редакцию 07.12.2020 г.

После доработки 27.12.2020 г.

Принята к публикации 30.12.2020 г.

Производные альфа-пирролидона и некоторые производные адамантана обладают широким спектром психотропной активности. Осуществлен синтез и проведена оценка психотропной активности адамантановых и гомоадамантановых производных альфа-пирролидона. Синтезирован ряд каркасных соединений, содержащих фрагмент пирролидин-2-она либо в боковой цепи, либо в составе каркасной системы. Взаимодействием 1-бромадамантана с пирролидин-2-оном получен *N*-(адамантан-1-ил)пирролидин-2-он (ТМ-2). Из β-дикарбонильных производных гомоадамантана получен конденсированный с гомоадамантановым каркасом пирролидин-2-он — *цис*-декагидро-4,8:6,10-диметаноциклононан[*b*]пиррол-2(1*H*)-он (ТМ-1). Синтез исходной 2-(5-оксогомоадамантил)уксусной кислоты проводили путем расщепления соответствующего кетодиэфира или цианокетодиэфира гомоадамантана в условиях реакции Холлера–Бауэра при сонохимической активации. Далее полученную γ-кетокислоту вводили в реакцию Лейкарта–Валлаха с получением ТМ-1. Оценку психотропной активности соединений проводили на экспериментальных животных (крысах линии Wistar и мышях линии СВА) в стандартных поведенческих тестах. Соединение ТМ-2 проявило выраженную анксиолитическую, антидепрессантную и ноотропную активность. Анализ связывания соединений проводили при помощи молекулярного докинга синтезированных соединений к ГАМК-В-рецептору, который также показал высокую энергию связывания с рецептором для ТМ-2.

Ключевые слова: пирролидин-2-он, адамантан, гомоадамантан, анксиолитики, антидепрессанты, ноотропы

DOI: 10.31857/S0132342321060105

ВВЕДЕНИЕ

ГАМК и глутаминовая кислота — основные нейромедиаторы центральной нервной системы (ЦНС), принимающие участие в регуляции различных функций ЦНС в условиях нормы и пато-

логии, в том числе при тревожных и депрессивных расстройствах. Тревожные расстройства характеризуются иррациональным неконтролируемым страхом и стойким чувством тревоги, сопровождаются нарушениями в модуляции мозговых цепей, которые регулируют эмоциональные реакции на потенциально опасные стимулы. Множество работ доказывают, что мозговые цепи в миндалевидном теле (часть лимбической системы) содержат ингибирующие сети гамма-аминомасляной кислоты, и этот нейротрансмиттер играет ключевую роль в модуляции как нормальных, так и патологических тревожных реакций. Воздействие на аллостерические сайты на поверхности ГАМК-рецепторов позволяет регулировать уровень ингибирования нейронов в миндалевидном теле. Именно на этом основано дей-

Сокращения: ГАМК — гамма-аминомасляная кислота; ГЭБ — гематоэнцефалический барьер; ОП — тест «Открытое поле»; ПКЛ — тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»; ПМХ — тест «Подвешивание мышей за хвост»; РСА — рентгеноструктурный анализ; ТЭИ — тест экстраполяционного извлечения; УРПИ — условная реакция пассивного избегания; ANR-10 — 4-(адамантан-1-ил)пирролидин-2-он; IE-1 — 1-(3-Гидроксиадамантан-1-ил)-пирролидин-2-он; ТМ-1 — (3aS*,10aS*)-декагидро-4,8:6,10-диметаноциклононан[*b*]пиррол-2(1*H*)-он; ТМ-2 — 1-(адамантан-1-ил)пирролидин-2-он.

Автор для связи: (тел.: +7 (919) 545-33-67; эл. почта: mbfdoc@gmail.com).

стве многих классов анксиолитиков. Изменения концентрации эндогенных модуляторов этих аллостерических сайтов, а также изменения в составе субъединиц рецептора ГАМК могут выступать механизмом, посредством которого подавляется нейрональное торможение в патологических состояниях тревоги [1].

Для производных ГАМК характерен широкий спектр фармакологической активности, который включает в себя анксиолитические, антиамнестические, седативные, противосудорожные и противогипоксические свойства, выраженность которых в значительной степени зависит от способности проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). В данную группу препаратов входят линейные производные ГАМК (пикамилон, фенибут, баклофен, толибут и др.) и ее циклические производные из семейства рацетамов (фенотропил, пирацетам, прамирацетам, анирацетам, фазорацетам и др.) [2, 3].

Основу химической структуры рацетамов составляет молекула альфа-пирролидона (циклическая форма ГАМК). Препараты данной группы как ноотропные лекарственные средства, способствующие консолидации памяти, процессу обучения и повышающие умственную работоспособность, нашли широкое применение для лечения различных когнитивных нарушений, возникающих вследствие поражения ЦНС (ишемии, травмы и различные дегенеративные процессы) [4]. Анализ спектра фармакологической активности рацетамов показал, что производные альфа-пирролидона оказывают не только ноотропный, но и анксиолитический, антидепрессантный, противосудорожный, церебропротекторный и другие эффекты [4].

Другой подход к модуляции системы ГАМК–глутаминовая кислота – блокирование глутаматных NMDA-рецепторов, приводящее к опосредованному усилению ГАМКергического воздействия [5]. Такими свойствами обладают производные адамантана, которые широко применяются при лечении заболеваний, связанных со снижением выработки дофамина (астения, синдром хронической усталости, болезнь Паркинсона), судорожным синдромом, депрессивным и/или тревожным состоянием. В настоящее время в клинической практике применяется около 20 производных адамантана [6].

Уникальность адамантанового каркаса для биологического применения обусловлена его способностью повышать метаболическую стабильность и способствовать распределению препарата, что приводит к улучшению фармакокинетических свойств и увеличению способности препарата к взаимодействию с терапевтическими мишенями [7–14]. Кроме того, липофильная адамантановая структура способствует прохожде-

нию через гистогематические барьеры [7, 8, 10], что особенно важно при дизайне веществ с психотропной активностью. Многие психотропные средства недостаточно хорошо проходят через ГЭБ, что ослабляет их влияние на ЦНС. Модификация данных препаратов посредством введения адамантильного заместителя в ряде случаев повышало способность к проникновению через ГЭБ и способствовало повышению концентрации препарата в головном мозге [7, 8, 10, 11, 14].

Представленные данные обосновывают целесообразность поиска и изучения нейрпсихотропных и церебропротекторных свойств у каркасных производных пирролидона. Цель настоящей работы – синтез новых производных пирролидин-2-она, содержащих структурные фрагменты адамантана и гомоадамантана, и изучение их психотропных свойств на лабораторных животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методы синтеза. 4-(Адамантан-1-ил)пирролидин-2-он (ANR-10) получен в соответствии с методикой, приведенной в работе [15].

1-(3-Гидроксиадамантан-1-ил)-пирролидин-2-он (IE-1) получен в соответствии с методикой, приведенной в работе [16].

1-Адамантилпирролидин-2-он (TIM-2) был получен путем нагревания 1-бромадамантана в запаянной ампуле при 140°C в течение 20 ч (рис. 1).

(3aS*,10aS*)-Декагидро-4,8:6,10-диметаноциклононан[b]пиррол-2(1H)-он (TIM-1) был получен в две стадии из этил-4-(2-этоксикарбонилметил)-5-оксотрицикло[4.3.1.1^{3,8}]ундекан-4-карбоксилата или этил-4-(цианометил)-5-оксотрицикло[4.3.1.1^{3,8}]ундекан-4-карбоксилата гидролизом и последующим восстановлением в условиях реакции Лейкарта–Валлаха (рис. 1). Относительная конфигурация стереоцентров была предположена исходя из модели Фелкина–Ана и подтверждена совокупностью данных двумерных экспериментов ЯМР НМРС, НМВС, NOESY.

Строение полученных соединений подтверждено совокупностью результатов физико-химических методов анализа, таких как ЯМР- и ИК-спектроскопия, а также соотношением температуры плавления образца полученного соединения с литературными данными при наличии таковых.

Влияние исследуемых соединений на поведение животных. Изучение психотропных свойств исследуемых соединений проводили на крысах линии Wistar и мышах линии СВА (см. “Эксперим. часть”). Животным контрольной группы вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме.

Тест “Открытое поле”. В тесте “Открытое поле” по сравнению с крысами контрольной группы, двигательная активность была значимо выше

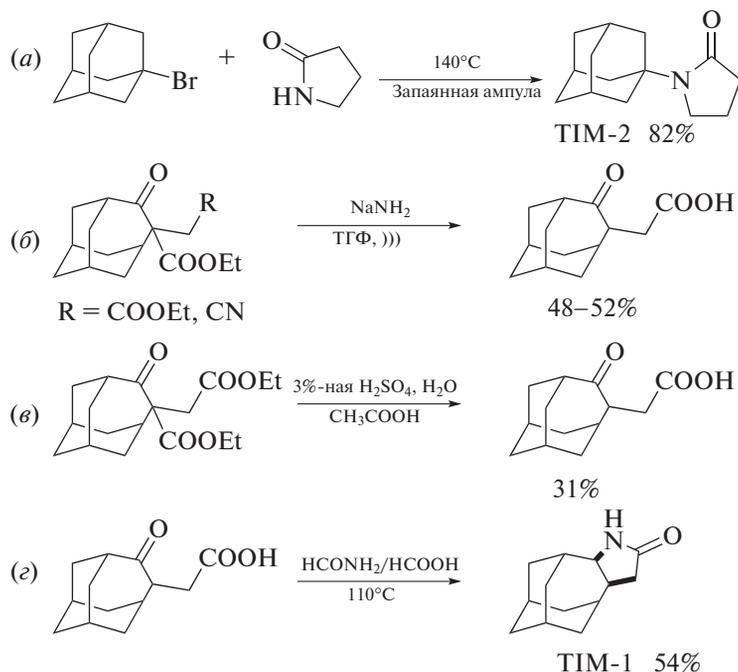


Рис. 1. Схемы синтеза соединений. Синтез 1-(адамantan-1-ил)пирролидин-2-она (TIM-2) (а); синтез 2-(5-оксотрицикло[4.3.1.1^{3,8}]ундекан-4-ил)уксусной кислоты по реакции Холлера–Бауэра (б); гидролиз-декарбоксилирование этил-4-(2-этоксикарбонилметил)-5-оксотрицикло[4.3.1.1^{3,8}]ундекан-4-карбоксилата (в); синтез (3a5*,10a5*)-декагидро-4,8:6,10-диметаноциклононан[б]пиррол-2(1H)-она (TIM-1) (г).

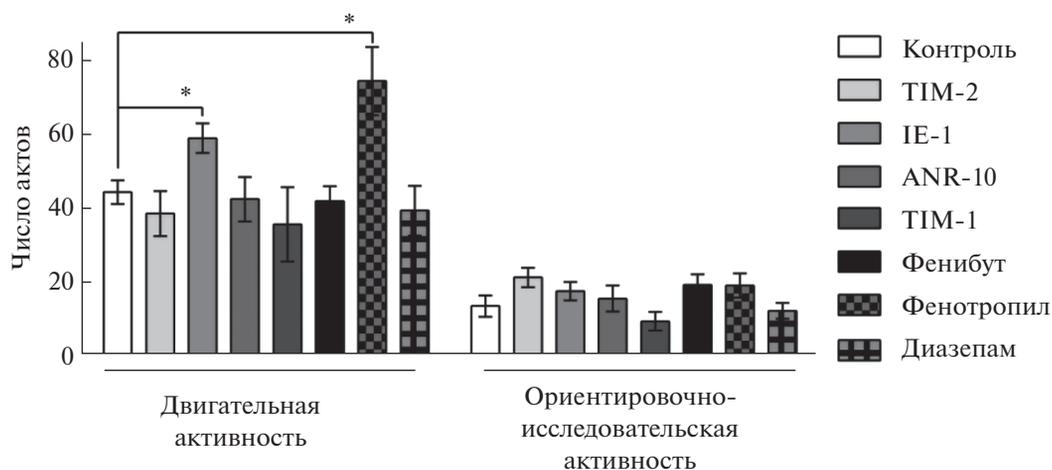


Рис. 2. Показатели двигательной и ориентировочно-исследовательской активности крыс линии Wistar в тесте “Открытое поле” (ОП). Двигательная активность – количество пересеченных квадратов; ориентировочно-исследовательская активность – суммарное количество стоек и количество обследованных отверстий-норок; в группе “Контроль” $n = 10$, в опытных группах $n = 8$.

* Различия достоверны относительно группы “Контроль” при $p < 0.05$ (критерий Данна).

в группах крыс, которым вводили соединение IE-1 или фенотропил (рис. 2). Ориентировочно-исследовательская активность была незначимо выше в группах крыс, которым вводили соединение TIM-2 или препараты сравнения фенибут и фенотропил. У животных, которым вводили соеди-

нение TIM-1, двигательная и ориентировочно-исследовательская активность была незначимо ниже, чем у контрольных.

Тест “Приподнятый крестообразный лабиринт”. Тест “Приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ) использовали для изучения поведения

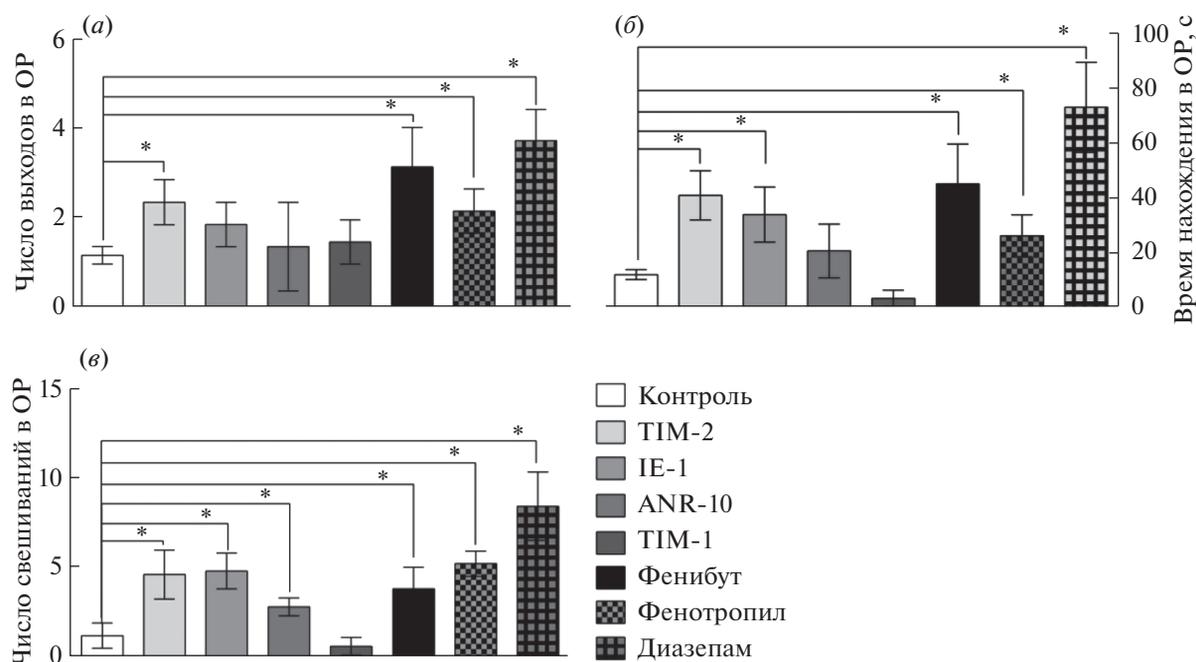


Рис. 3. Число выходов в открытые рукава (а), продолжительность нахождения в открытых рукавах (б) и количество свешиваний с их краев (в) крыс линии Wistar в тесте ПКЛ. ПКЛ – Приподнятый крестообразный лабиринт, ОР – открытый рукав установки; в группе “Контроль” $n = 10$, в опытных группах $n = 8$.

* Различия достоверны относительно группы “Контроль” при $p < 0.05$ (критерий Данна).

крыс в условиях переменной стрессогенности (при свободном выборе комфортных условий): фиксировали время, проведенное животным в открытых рукавах, которые не были защищены стенками (потенциально стрессогенной зоне), а также количество выходов в открытые рукава и число свешиваний с их края.

В тесте ПКЛ животные, которым вводили некоторые исследуемые соединения или препараты сравнения, по сравнению с контрольной группой, чаще выходили (соединение TIM-2) и дольше пребывали в открытых рукавах (соединения TIM-2 и IE-1), а также совершали больше свешиваний с их краев (соединения TIM-2, IE-1 и ANR-10). Это свидетельствует об отсутствии тревоги и страха у животных, которым вводили исследуемые соединения или референтные препараты, при выходе и нахождении на открытых, ярко освещенных и значительно поднятых над уровнем пола рукавах лабиринта (рис. 3). Для уточнения специфичности и выраженности анксиолитического действия наиболее активных соединений на следующем этапе был выполнен тест конфликтной ситуации по Vogel.

Тест “Конфликтная ситуация в варианте Vogel”. Тест “Конфликтная ситуация в варианте Vogel” – высокоспецифичный тест при оценке анксиолитической активности соединений. Данный тест основывается на конфликте мотиваций между утолением жажды (после 48-часовой водной де-

привации) и страхом получить болевое раздражение при попытке взятия воды через поилку (которая находится под электрическим напряжением). Крысы, которым за 60 мин до тестирования ввели исследуемое производное пирролидона-2 (соединение TIM-2) или референтные препараты фенибут, диазепам, несмотря на действие сильного авersive фактора, продолжали подходить к поилке, чтобы утолить жажду: количество подходов за 10 мин наблюдения составило, соответственно, 12.8 ± 1.1 , 13 ± 0.7 и 18 ± 0.8 ($p < 0.05$) (рис. 4). У животных, получивших соединение IE-1 и препарат сравнения фенотропил, поведение в данном тесте значимо не отличалось от такового у животных контрольной группы.

Тесты “Принудительное плавание по Porsolt” и “Подвешивание мышей за хвост” (ПМХ). В обоих тестах (“Принудительное плавание по Porsolt” и “Подвешивание мышей за хвост”) время иммобилизации, характеризующее поведение отчаяния крыс и мышей, которым ввели соединение TIM-2, было значительно ниже относительно контрольных животных (на 86 и 35% в обоих тестах соответственно) и животных, которым ввели соединение IE-1 (на 90 и 52% соответственно), что было сопоставимо с действием референтного препарата флуоксетина (91 и 60% соответственно) (рис. 5а, 5б). Это указывает на выраженную антидепрессантную активность данных соединений.

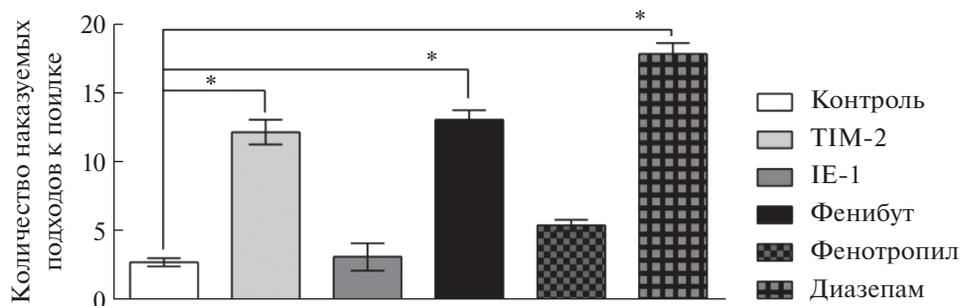


Рис. 4. Количество наказуемых подходов к поилке в тесте “Конфликтная ситуация в варианте Vogel” (крысы линии Wistar). В группе “Контроль” $n = 10$, в опытных группах $n = 8$.

* Различия достоверны относительно группы “Контроль” при $p < 0.05$ (критерий Данна).

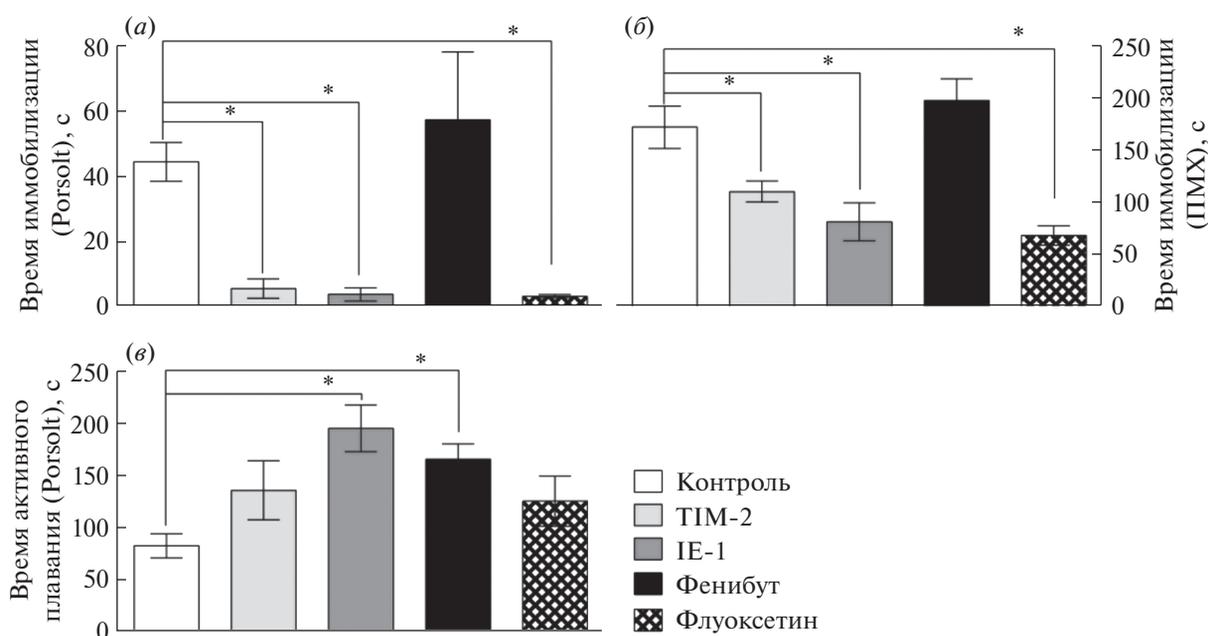


Рис. 5. Время иммобилизации в тесте “Принудительное плавание по Porsolt” (крысы линии Wistar) (а) и тесте “Подвешивание мышей за хвост” (мыши линии СВА) (б); продолжительность активного плавания в тесте Porsolt (в). В группе “Контроль” $n = 10$, в опытных группах $n = 8$.

* Различия достоверны относительно группы “Контроль” при $p < 0.05$ (критерий Данна).

В тесте “Принудительное плавание по Porsolt” у крыс, которым вводили соединения IE-1 и, в меньшей степени, TIM-2, фенибут или флуоксетин продолжительность активного плавания была на 138, 65, 80 и 52% соответственно больше, чем у контрольных животных (рис. 5в).

Влияние исследуемых соединений на формирование и сохранение памятного следа в тестах “Условная реакция пассивного избегания” (УРПИ) и “Тест экстраполяционного избегания” (ТЭИ). Тесты УРПИ и ТЭИ принципиально отличаются по принятию решений ухода от воздействия негативных факторов. В тесте УРПИ животное в первом обучающем сеансе, при переходе из ярко освещенного отсека в темный (более комфорт-

ный для нее), получает электро-болевое раздражение через электродный пол, затем покидает темную камеру и остается до конца теста в светлом отсеке. При повторном тестировании (через 24 ч), если животное помнит о возможном электро-болевом раздражении в темной камере, то оно не заходит в нее и предпочитает оставаться в некомфортном ярко освещенном отсеке. Это указывает на то, что животное обучено.

В тесте ТЭИ животное помещается в цилиндр, который закреплен вертикально в центре емкости с водой и погружен в нее на 2 см. Температура воды составляет 17–18°C, что является сильной авersiveй средой, для избавления от которой крысе необходимо поднырнуть под край цилиндра.

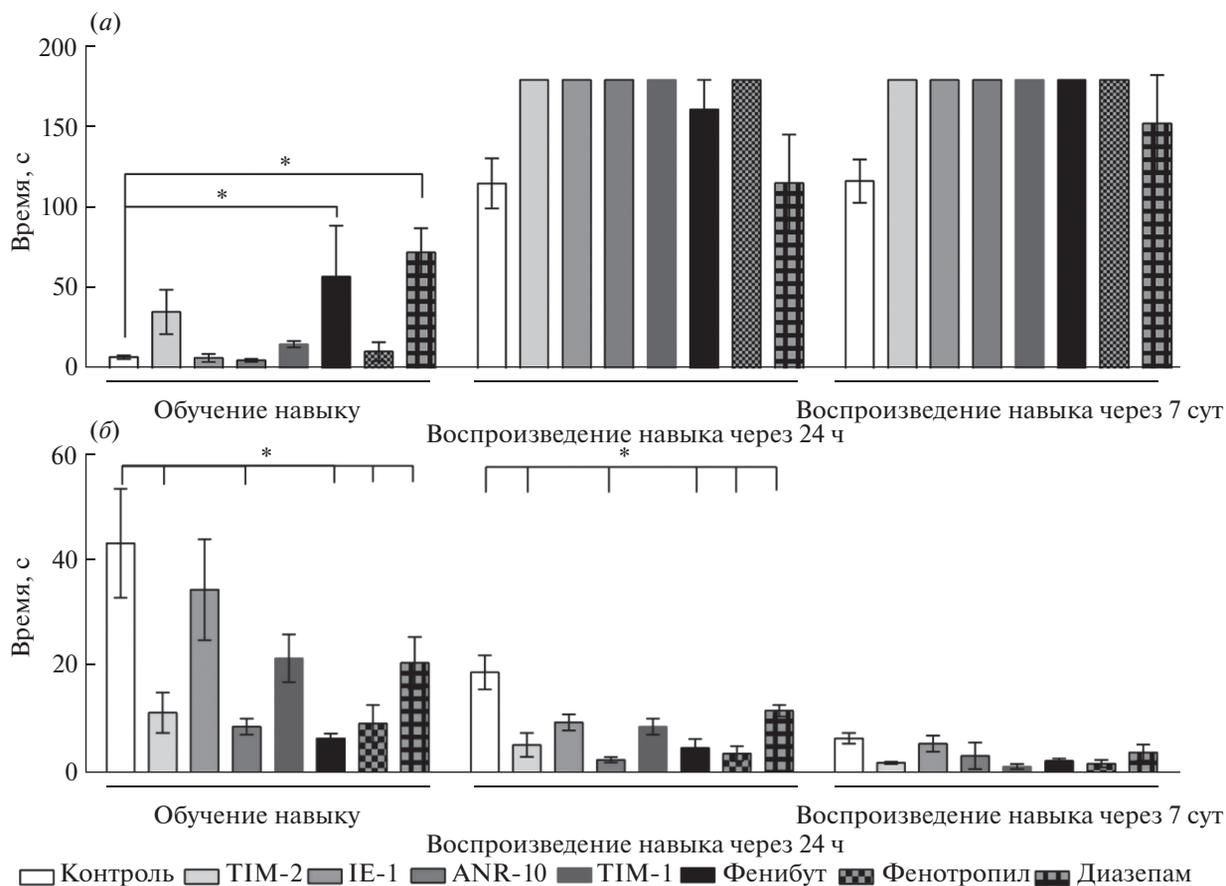


Рис. 6. Время захода в темный отсек с электродным полом в тесте УРПИ (а); время решения задачи (подныривания) в тесте ТЭИ (б). Тесты проводили на крысах линии Wistar; в группе “Контроль” $n = 10$, в опытных группах $n = 8$. * Различия достоверны относительно группы “Контроль” при $p < 0.05$ (критерий Данна).

дра и выбраться на сухую площадку. При первом сеансе животное затрачивает определенное время для экстраполяционного избавления. А при повторных сеансах животные, исходя из предыдущего опыта, находят выход значительно быстрее, а при последующих тестированиях уже реализуется выработанная стратегия поведения, и животные быстрее решают задачу экстраполяционного избавления. В нашем эксперименте, после обучения, животных тестировали через 24 ч и на 7-е сутки.

В тесте УРПИ у крыс, которым вводили адмантановые производные альфа-пирролидона, регистрировали быстрое (через 24 ч) и длительное (в течение 7 сут) сохранение памятного следа (рис. 6а). Напротив, у животных, которым вводили диазепам, наблюдалось амнезирующее действие, что проявлялось и в формировании, и в сохранении памятного следа.

В условиях активного избегания авersive среды в тесте ТЭИ у крыс, которым вводили соединения TIM-2, ANR-10 или препарат сравнения фенибут, быстрее формировалось и в течение 7 сут сохранялось наиболее рациональное пове-

дение в условиях активного избавления от авersive фактора (воды низкой температуры) (рис. 6б). У животных, которым вводили диазепам в тесте ТЭИ, как и у животных контрольной группы, в авersive условиях наблюдалась наименее рациональная стратегия поведения. Сравнительно психотропные свойства соединения TIM-2 и препарата сравнения диазепам следует отметить, что диазепам существенно превосходит по анксиолитической активности адмантановое производное альфа-пирролидона, но последний обладает выраженным антидепрессантным и ноотропным действием.

Для уточнения возможного механизма действия соединения-лидера (TIM-2) на следующем этапе было проведено исследование его взаимодействия с рядом нейромедиаторных систем головного мозга на мышах линии СВА.

Взаимодействие исследуемых соединений с нейромедиаторными системами головного мозга. Для соединения TIM-2 было отмечено выраженное влияние на систему ГАМК: при введении коразола и пикротоксина (антагонистов ГАМК-А) у живот-

Таблица 1. Взаимодействие соединения ТИМ-2 с агонистами/антагонистами различных нейромедиаторных систем *in vivo*

Группа	<i>n</i>	Регистрируемый показатель
ГАМКергическая система		
Латентный период гибели при введении коразола (в течение часа), мин		
Контроль	10	20.0 ± 2.3
ТИМ-2	8	34.4 ± 6.6*
Диазепам	8	60.0 ± 0.0*
Латентный период гибели при введении пикротоксина (в течение часа), мин		
Контроль	10	12.1 ± 0.8
ТИМ-2	8	23.0 ± 2.7*
Диазепам	8	56.5 ± 3.5*
Дофаминергическая система		
Продолжительность катаlepsии при введении галоперидола, с		
Контроль	8	105.3 ± 5.1
ТИМ-2	8	109.9 ± 3.9
Продолжительность апоморфиновой вертикализации, с		
Контроль	8	35 ± 2.2
ТИМ-2	8	35.8 ± 1.8
Холинергическая система		
Продолжительность тремора, вызванного введением никотина, мин		
Контроль	8	5 ± 0.1
ТИМ-2	8	5.1 ± 0.1
Продолжительность тремора, вызванного введением ареколина, мин		
Контроль	8	8.4 ± 0.2
ТИМ-2	8	8.4 ± 0.1
Серотонинергическая система		
Количество кивательных движений (гиперкинез), после введения 5-окситриптофана		
Контроль	8	17.0 ± 1.0
ТИМ-2	8	15.8 ± 1.6

Примечание: исследование проводили на мышах линии СВА; *n* – число животных в группе.

* Различия достоверны относительно группы “Контроль” при $p < 0.05$ (критерий Данна).

ных, которым вводили ТИМ-2, отмечалось значимое повышение латентного периода гибели по сравнению с контрольной группой (табл. 1). Учитывая связь судорожного действия коразола и пикротоксина с подавлением тормозящей функции ГАМК, можно предположить, что выявленные психотропные свойства соединения ТИМ-2 обусловлены активацией ГАМКергической системы. В ходе дальнейшего исследования для соединения ТИМ-2 не было обнаружено взаимодействие с дофаминергической (не влиял на продолжительность катаlepsии при введении галоперидола и продолжительность вертикализации при введении апоморфина), холинергической (не влиял на продолжительность тремора после введения ареколина или никотина) и серотонинергической системами (не влиял на интенсивность гиперкинеза при введении 5-окситриптофана) (табл. 1).

Молекулярный докинг исследуемых соединений. Для объяснения действия синтезированных соединений на ГАМКергическую систему проводили их докинг к рецептору ГАМК (4ms4 для активированного сайта связывания и 4mqf для дезактивированного сайта из базы данных RCSB) в программном обеспечении AutoDock Vina. Используемые модели белка содержали в качестве лигандов молекулу баклофена в структуре 4ms4 и саклофена в структуре 4mqf. Для оценки корректности процедуры докинга использовали оптимизированные модели баклофена и 2-гидрокси-саклофена, в результате докинга которых расположение лигандов в сайте связывания белка, определенные методом рентгеноструктурного анализа (РСА), практически полностью воспроизводилось (рис. 7).

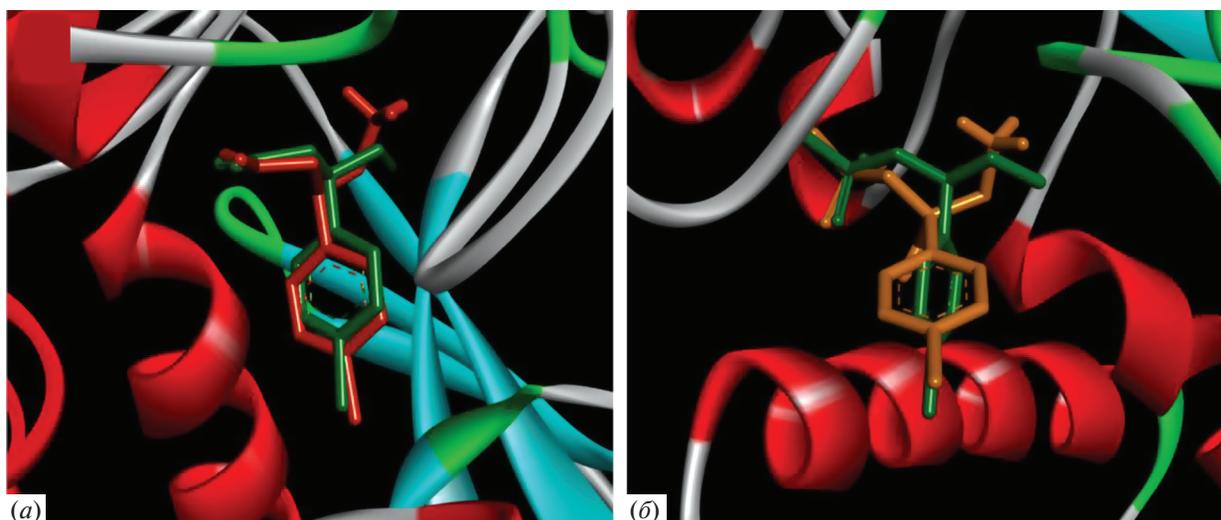


Рис. 7. Расположение молекул баклофена в сайте связывания ГАМК-рецептора 4ms4 (а) и 2-гидроксисаклофена в сайте 4mqf (б), определенные экспериментально при помощи РСА-экспериментов (зеленые) и докинга (оранжевые).

Молекулярный докинг тестируемых соединений выявил достаточно близкие энергии связывания, однако набор аминокислотных остатков, обеспечивающих нахождение лиганда в активном центре рецептора, оказался различным (табл. 2).

Данные молекулярного докинга позволяют утверждать, что препарат сравнения фенибут, соединения ТИМ-2, IЕ-1 и ANR-10 обладают похожим влиянием на рецептор, в то время как соединение ТИМ-1 не связывается с сайтом ГАМК-рецептора.

Анализ литературных данных позволил спрогнозировать высокую перспективность поиска среди адамантовых производных ГАМК и пирролидин-2-она соединений с выраженной психотропной и нейропротекторной активностью. Проведенное исследование подтвердило обоснованность поиска веществ с анксиолитической, антидепрессантной и ноотропной активностью в ряду производных ГАМК. В рамках настоящей работы среди исследованных производных было выявлено соединение с высокой анксиолитической активностью в сочетании с антидепрессантным и ноотропным действием, представляющее собой 1-(адамантан-1-ил)пирролидин-2-он (ТИМ-2). Анксиолитическая активность производного ТИМ-2 была выраженной как в условиях переменной стрессогенности (ПКЛ), так и в условиях конфликтной ситуации по Vogel и была сопоставима с таковой у референтного препарата фенибута и незначительно уступала таковой у сильного транквилизатора диазепам. Антидепрессантное действие соединения ТИМ-2 было сопоставимо по выраженности с флуоксетином из группы СИОЗС при оценке поведения отчаяния в условиях выученной беспомощности в двух тестах (“Прину-

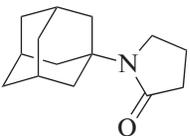
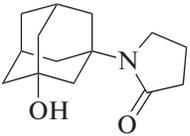
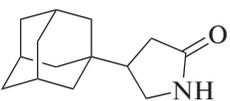
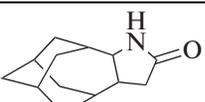
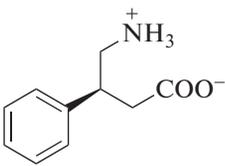
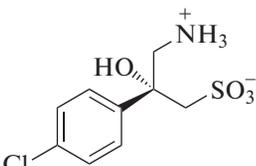
дительное плавание по Porsolt” и “Подвешивание мышшей за хвост”). Ноотропная активность соединения ТИМ-2 была выявлена по положительному влиянию на процесс запоминания и воспроизведения обученного навыка в тестах УРПИ и ТЭИ. Для уточнения возможного механизма действия соединения-лидера было проведено исследование взаимодействия с рядом нейромедиаторных систем головного мозга *in vivo*, в ходе которого было выявлено выраженное влияние производного ТИМ-2 на ГАМКергическую систему (при введении коразола и пикротоксина), а данные молекулярного докинга также подтверждают возможное взаимодействие соединения ТИМ-2 с системой ГАМК.

Также было обнаружено соединение с психостимулирующей, антидепрессантной и умеренной анксиолитической активностью – 1-(3-гидроксиадамантан-1-ил)пирролидин-2-он (IЕ-1).

Введение адамантового заместителя в 4-е положение пирролидона привело к получению вещества с низкой психотропной активностью (ANR-10). Каркасное соединение под лабораторным шифром ТИМ-1 ((3aS*,10aS*)-декагидро-4,8:6,10-диметаноциклононан[b]пиррол-2(1H)-он) также не проявляло психотропной активности во всех используемых поведенческих моделях.

Различное влияние соединений на ГАМК-систему, вероятно, вызвано их различным взаимодействием с ГАМК-рецептором. В статье [17] описано исследование методом РСА связывания ряда соединений с ГАМК-B-рецептором. Авторы пришли к заключению, что связывание лигандов данного рецептора осуществляется при помощи ряда взаимодействий с аминокислотными остатками серина 130 и 153, гистидина 170, глутамино-

Таблица 2. Результаты молекулярного докинга соединений TIM-2, IE-1, ANR-10 и TIM-1, а также препаратов сравнения фенибута и 2-гидроксисаклофена

Формула	Энергия связывания 4ms4, ккал/моль	Связанные аминокислотные остатки	Энергия связывания 4mqf, ккал/моль	Связанные аминокислотные остатки
 TIM-2	-6.2	Trp65 Trp278	-6.0	Trp65 Cys129 Ser130 Ser131
 IE-1	-6.5	Trp65 His170 Tyr250 Trp278	-6.5	Trp65 Cys129 Ser130 Ser131 Ser153
 ANR-10	-7.2	Trp65 Val201 Thr205 Tyr250 Trp278	-6.0	Trp278
 TIM-1	-5.4	Thr199	-6.1	Ser153 Trp278
 Фенибут	-8.4	Trp65 Ser130 Ser153 Gly151 Phe202 Tyr250 Ile276 Tyr279 Glu349	-5.8	Ser153 Ala173 His176 Val201 Leu248 Tyr250 Ile276
 2-Гидроксисаклофен	-8.0	Trp65 Ser130 Ser153 Gly151 Phe202 Tyr250 Ile276 Trp278 Tyr279 Glu349	-5.5	Trp65 Ser130 Gly151 Ser153 Glu349

вой кислоты 349. Однако наиболее значимыми оказались взаимодействия с остатками триптофана на 65 и 278, поскольку именно они вызывают перестройку третичной структуры рецептора. Сравнение карт связывания тестируемых соединений (рис. 8) показывает, что соединения TIM-2, IE-1, ANR-10, фенибут и баклофен образуют контакты

с ключевыми аминокислотами, в то время как TIM-1 не удерживается в сайте связывания ГАМК-рецептора и, по всей видимости, не оказывает влияния на ГАМКергическую систему.

Учитывая широкое распространение у населения тревожно-депрессивных расстройств, сочетающихся с дементными нарушениями, наличие

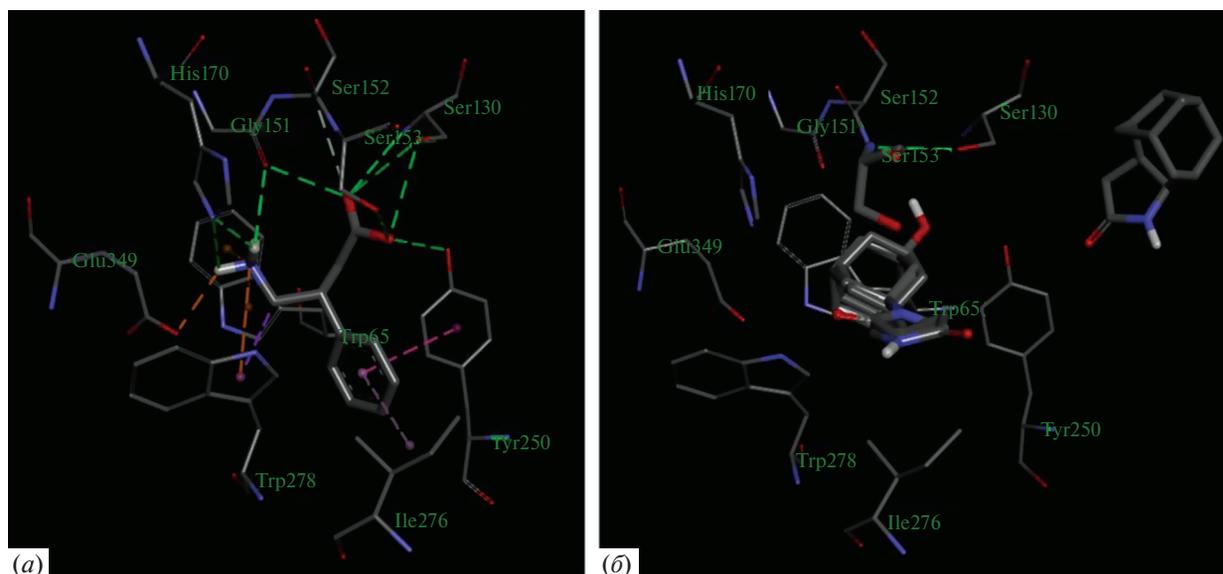


Рис. 8. Карты связывания фенибута (а) и соединений TIM-2, IE-1, ANR-10 и TIM-1 в наложении (б), полученные при помощи молекулярного докинга к ГАМК-рецептору 4ms4.

у соединения TIM-2 антидепрессантной, анксиолитической и ноотропной активности может свидетельствовать о его терапевтическом потенциале. Было отмечено, что анксиолитическая активность соединения TIM-2, в отличие от диазепема, не сопровождается амнезирующим действием.

ЭКСПЕРИМЕНАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и оборудование. Строение соединений подтверждено данными ИК- и масс-спектров, а также одномерных и двумерных экспериментов ЯМР. ИК-спектры зарегистрированы на спектрометре Shimadzu IRAffinity-1 (Япония) с помощью приставки НПВО Specac DiamondATR GS 10800-B. Контроль за ходом реакции и проверку на индивидуальность соединений проводили с помощью ТСХ (пластинки Merck M60 F₂₅₄; проявление парами йода, УФ-облучением или разбавленной серной кислотой). Спектры ¹H- и ¹³C-ЯМР, DEPT, HMBSC, HMQC, NOESY зарегистрированы с использованием спектрометра JEOL JNM-ECX400 (Япония) в CDCl₃ и DMSO-d₆. Внутренний стандарт – сигнал остаточного растворителя. Химические сдвиги сигналов определены в шкале δ, м.д., КССВ определены в Гц. Температуры плавления определены капиллярным методом на приборе SRS OptiMelt MPA100. Использовали коммерчески доступные реагенты (Sigma-Aldrich) и растворители (ООО “Реактив”). Очистку растворителей и реагентов проводили в соответствии с литературными методами [18]. Исходные соединения: этил-4-(2-этоксикарбонилметил)-5-оксотрицикло[4.3.1.1^{3,8}]ундекан-4-карбоксилат, этил-4-(цианометил)-5-оксотри-

цикло[4.3.1.1^{3,8}]ундекан-4-карбоксилат, 2-(5-(этоксикарбонил)-4-оксогемоадамantan-5-ил)уксусная кислота были получены в соответствии с методами, представленными в работе [19].

1-(Адамтан-1-ил)пирролидин-2-он (TIM-2). Раствор 5.00 г (0.023 моль) 1-бромадамтана в 15 мл (16.7 г, 0.197 моль) пирролидин-2-она нагревали в запаянной ампуле при 140°C в течение 20 ч, охлаждали, выливали в 100 мл ледяной воды. Выпавший осадок отфильтровывали, перекристаллизовывали из ацетона. Выход 4.16 г (82%). Серые кристаллы с т. пл. 98–99°C (лит. т. пл. 93°C [20]). ИК (НПВО) ν: 2906, 2848, 1660, 1406, 1259 см⁻¹. Спектр ¹H-ЯМР: 1.55–1.67 (м, 6H, 2CH₂ + 2CH), 1.82 (псевдопентет, 2H, J = 7.5, CH₂), 2.00–2.12 (м, 9H, 4CH₂ + CH), 2.27 (т, 2H, ³J = 8.2, CH₂), 3.38 (т, 2H, ³J = 6.8, CH₂N). Спектр ¹³C-ЯМР: 18.2 (CH₂), 29.6 (3CH), 33.6 (2CH₂), 39.6 (4CH₂), 44.8 (2CH₂), 55.1 (C), 175.5 (C=O).

2-(5-Оксотрицикло[4.3.1.1^{3,8}]ундекан-4-ил)уксусная кислота. Метод 1. К раствору 1.00 г (3.11 ммоль) этил-4-(2-этоксикарбонилметил)-5-оксотрицикло[4.3.1.1^{3,8}]ундекан-4-карбоксилата или 1.00 г (3.63 ммоль) этил-4-(цианометил)-5-оксотрицикло[4.3.1.1^{3,8}]ундекан-4-карбоксилата в безводном THF (20 мл) добавляли NaNH₂ (98%, 5 экв.), затем выдерживали при ультразвуковом облучении в атмосфере аргона в течение 40 ч, растворитель отгоняли, остаток разбавляли 20 мл воды, полученный раствор промывали петролейным эфиром (2 × 5 мл), доводили до pH 3 с помощью 10 М HCl, полученную эмульсию экстрагировали CHCl₃ (5 × 3 мл), органические

вытяжки объединяли, сушили над Na_2SO_4 , растворитель отгоняли на роторном испарителе. Остаток очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле (элюент – CHCl_3 : EtOH , 20 : 1), перекристаллизовывали из воды. Выход 0.33 (48%) из этил-4-(2-этоксикарбонилметил)-5-оксотрицикло[4.3.1.1^{3,8}]ундекан-4-карбоксилата или 1.00 г (3.63 ммоль) и 0.42 г (52%) из этил-4-(цианометил)-5-оксотрицикло[4.3.1.1^{3,8}]ундекан-4-карбоксилата, бесцветные кристаллы с т. пл. 118–120°C. ИК (НПВО) ν : 3100, 2906, 2852, 1724, 1660, 1444 cm^{-1} . Спектр ^1H -ЯМР: 1.40–1.43 (м, 2H, $2\text{CH}^{\text{HomoAd}}$), 1.53–1.61 (м, 3H, $3\text{CH}^{\text{HomoAd}}$), 1.73–1.90 (м, 7H, $7\text{CH}^{\text{HomoAd}}$), 1.97–2.02 (м, 1H, $\text{CH}^{\text{HomoAd}}$), 2.04–2.12 (м, 1H, $\text{CH}^{\text{HomoAd}}$), 2.57–2.65 (м, 2H, CH_2COOH), 2.85–2.88 (м, 1H, $\text{CH}^{\text{HomoAd}}$), 12.05 (с, 1H, OH). Спектр ^{13}C -ЯМР: 26.6 (CH), 26.7 (CH), 30.4 (CH_2), 31.0 (CH_2), 31.5 (CH), 34.4 (CH_2), 35.5 (CH_2), 36.4 (CH_2), 40.2 (CH_2), 48.0 (CH), 53.8 (CH), 174.3 (COOH), 216.5 (C=O).

Метод 2. Раствор 0.31 г (1.05 ммоль) 2-(5-(этоксикарбонил)-4-оксогомоадамтан-5-ил)уксусной кислоты в смеси 3 мл H_2SO_4 (3%) и 1 мл ледяной CH_3COOH нагревали при кипении в течение 50 ч, концентрировали с использованием роторного испарителя, остаток разбавляли 1 мл воды, оставляли кристаллизоваться. После выпадения осадка маточный раствор доводили до pH 3 с помощью NaHCO_3 , экстрагировали CHCl_3 (2×5 мл), экстракт промывали водой (2×2 мл), сушили над Na_2SO_4 , отгоняли растворитель, полученное масло кристаллизовали из воды, осадки объединяли. Выход 0.09 г (31%), бесцветные кристаллы с т. пл. 118–120°C.

(3aS*, 10aS*)-Декагидро-4,8:6,10-диметаноциклононан[b]пиррол-2(1H)-он (ТМ-1). Раствор 1.00 г (4.50 ммоль) 2-(5-оксотрицикло[4.3.1.1^{3,8}]ундекан-4-ил)уксусной кислоты в 14 мл (15.82 г, 0.352 моль) формамида и 2.5 мл (3.05 г, 0.066 моль) муравьиной кислоты нагревали при 110°C в течение 20 ч. Далее реакционную смесь выливали в 20 мл воды, выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой. Очищали перекристаллизацией из ацетона. Выход 0.50 г (54%), бесцветные кристаллы с т. пл. 135–136°C. ИК-спектр, ν cm^{-1} : 3400, 2900, 2845, 1658, 1448. Спектр ^1H -ЯМР: 1.34–1.43 (м, 2H, $\text{CH}_2^{\text{HomoAd}}$), 1.44–1.63 (м, 6H, $2\text{CH}_2^{\text{HomoAd}}$, $2\text{CH}^{\text{HomoAd}}$), 1.72–2.00 (м, 7H, $2\text{CH}_2^{\text{HomoAd}}$, $\text{CH}_2\text{-C=O}$, $\text{CH}^{\text{HomoAd}}$), 2.33–2.52 (м, 1H, $\text{CH}^{\text{HomoAd}}$), 2.60–2.70 (м, 1H, $\text{CH-CH}_2\text{-C=O}$), 3.70–3.78 (д.д, 1H, CH-NH , $^3J = 9.9$, $^3J = 4.4$), 7.47 (с, 1H, NH). Спектр ^{13}C -ЯМР: 26.8 (CH), 26.9 (CH), 30.5 (CH_2), 31.3 (CH_2), 34.6 (CH_2), 35.3 (CH), 35.5 (CH), 36.6 (CH_2), 36.7

(CH_2), 38.6 ($\text{CH}_2\text{-C=O}$), 41.8 (CH), 62.6 (CH-NH), 176.1 (C=O).

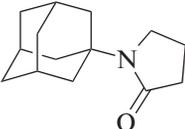
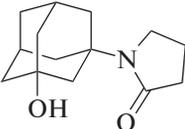
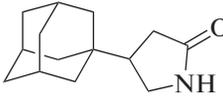
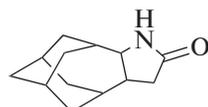
Психотропная активность исследуемых соединений. Экспериментальное исследование психотропного действия каркасных производных альфа-пирролидона проведено на 158 крысах-самцах линии Wistar, массой 260–280 г (возраст 6 мес.) и 174 мышах-самцах линии СВА, массой 20–25 г (возраст 5 мес.). Животные содержались в условиях вивария (ГОСТ Р 51849-2001) со свободным доступом к питьевой воде и пище (ООО “Лабораторкорм”, Москва).

Соединения вводили в эквимолярных (1/20 от M_r) наиболее активных (по результатам предыдущих исследований) дозах перорально за 60 мин до выполнения поведенческих тестов (табл. 3). Препараты сравнения фенибут, фенотропил и флуоксетин вводили аналогичным образом, в дозах 20, 25 и 25 мг/кг соответственно. Препарат сравнения диазепам вводили внутривентриально в дозе 1 мг/кг. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме.

Влияние исследуемых соединений на психоэмоциональное состояние оценивали в тестах “Открытое поле” (ОП) и “Приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ). Анксиолитическую активность оценивали в тесте “Конфликтная ситуация в варианте Vogel”. Антидепрессантное действие изучали в тестах “Принудительное плавание по Porsolt” и “Подвешивание мышей за хвост” (ПМХ). Когнитивную функцию определяли в тестах формирования условной реакции пассивного избегания (УРПИ) и тесте экстраполяционного избегания (ТЭИ) [21–23].

Для уточнения возможного механизма действия соединения-лидера было проведено исследование его взаимодействия с рядом нейромедиаторных систем головного мозга *in vivo* (исследуемое соединение вводили за 1 ч до введения анализаторов). Взаимодействие с системой ГАМК оценивали по антагонизму с судорожной активностью коразола (80 мг/кг) и пикротоксина (3 мг/кг) (наблюдение продолжали в течение часа). Для оценки взаимодействия с дофаминергической системой было изучено влияние на продолжительность катаlepsии, вызванной введением галоперидола (1 мг/кг, внутривентриально) (наблюдение продолжали в течение 2 мин). После введения апоморфина (3 мг/кг, подкожно) регистрировали продолжительность вертикализации мышей, которую оценивали в течение часа после введения апоморфина. Влияние на холинергическую систему оценивали по продолжительности тремора, вызванного введением никотина (0.2 мг/кг, подкожно) и ареколина (25 мг/кг, подкожно) при наблюдении в течение 60 мин. Взаимодействие с серотонинергической системой оценивали по выраженности гиперкинеза (количеству ки-

Таблица 3. Исследуемые каркасные производные альфа-пирролидона

№	Структура	M_r	Химическое название	Доза, мг/кг
1		219	TIM-2 1-(адамантан-1-ил)пирролидин-2-он	11
2		235	IE-1 1-(3-гидроксиадамантан-1-ил)пирролидин-2-он	12
3		219	ANR-10 4-(адамантан-1-ил)пирролидин-2-он	11
4		205	TIM-1 (3aS*,10aS*)-декагидро-4,8:6,10-диметаноциклоно- нан[<i>b</i>]пиррол-2(1 <i>H</i>)-он	10

вательных движений) в течение 60 мин после введения 5-окситриптофана (300 мг/кг, внутривенно) [22].

Статистическую обработку данных проводили в MS Excel 2019 и Prism 6, сравнение осуществляли по критериям Краскела–Уоллиса и Данна. Данные представлены в виде среднего значения \pm ошибка среднего.

Молекулярный докинг. Молекулярный докинг проводили на модели рецептора ГАМК (код 4ms4 для сайта агонистов и 4mqf для сайта антагонистов, база PDB RCSB). Предварительно из модели удаляли имеющиеся лиганды и молекулы воды и добавляли полярные атомы водорода. Структуры баклофена, саклофена, TIM-2, IE-1, ANR-10 и TIM-1 оптимизировали при помощи молекулярной механики в силовом поле MMFF94s с применением программного пакета Avogadro 1.2.0 и использовали для докинга при помощи программного пакета AutoDock Vina. Результаты молекулярного докинга анализировали и визуализировали при помощи программы Discovery Studio 2019.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе впервые получены новые производные пирролидин-2-она, содержащие структурные фрагменты адамантана и гомоада-

мантана, и изучены их психотропные свойства на крысах линии Wistar и мышцах линии CBA.

Присоединение адамантана в 1-м положении цикла альфа-пирролидона (TIM-2) приводит к появлению у полученного соединения выраженной антидепрессантной активности в условиях поведения отчаяния (ПМХ и Porsolt), выраженной анксиолитической активности в условиях переменной стрессогенности (ПКЛ) и в условиях конфликтной ситуации (Vogel), а также ноотропной активности (ускорение решения задачи в стрессовой ситуации и при повторных тестированиях – ТЭИ).

Наличие 3-гидрокси-1-адамантильного фрагмента в 1-м положении цикла альфа-пирролидона (IE-1) приводит к появлению у полученного соединения психостимулирующей (в условиях теста “Открытое поле”), выраженной антидепрессантной активности в условиях поведения отчаяния (ПМХ и Porsolt) и анксиолитической активности в условиях переменной стрессогенности (ПКЛ).

Возможный механизм психотропного действия производного альфа-пирролидона с 1-адамантильным заместителем в 1-м положении (TIM-2) – взаимодействие с системой ГАМК, поскольку при введении коразола и пикротоксина (антагонистов ГАМК-А) у животных, получив-

ших ТИМ-2, отмечалось значимое повышение латентного периода гибели.

Выявленное соединение ТИМ-2 представляет интерес для дальнейших исследований с целью разработки на его основе средства для коррекции тревожных и депрессивных расстройств.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Синтетическая часть работы выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках проектной части государственного задания (№ 0778-2020-0005).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проведены в соответствии с законодательством и техническими стандартами Евразийского экономического союза по надлежащей лабораторной практике (ГОСТ 53434-2019, ГОСТ D 51000.4-2011, Директивой 2010/63/ЕС, Европейского парламента и Совета Европейского союза, межгосударственного стандарта (ГОСТ 33044-2014). Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом (Региональный исследовательский этический комитет Волгоградской области) № 2010-2019 от 02 апреля 2019 года.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nuss P. // *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2015. V. 11. P. 165–175.
<https://doi.org/10.2147/NDT.S58841>
2. Тюренков И.Н., Перфилова В.Н. // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2011. Т. 74. № 2. С. 47–52.
<https://doi.org/10.30906/0869-2092-2011-74-2-47-52>
3. Boonstra E., Kleijn R., Colzato L.S., Alkemade A., Forstmann B.U., Nieuwenhuis S. // *Front. Psychol.* 2015. V. 6. P. 1520.
<https://doi.org/10.3389/fpsyg.2015.01520>
4. Берестовицкая В.М., Тюренков И.Н., Васильева О.С., Перфилова В.Н., Остроглядов Е.С., Багметова В.В. Рацетамы: методы синтеза и биологическая активность. Санкт-Петербург: Астерион, 2016. 287 с.
5. Spasov A.A., Yakovlev D.S., Brigadirova A.A., Maltsev D.V., Agatsarskaya Y.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 76–88.
<https://doi.org/10.1134/S1068162019020146>
6. Литвин Е.А., Колыванов Г.Б., Жердев В.П. // Фармакокинетика и фармакодинамика. 2012. № 1. С. 18–24.
7. Štímac A., Šekutor M., Mlinarić-Majerski K., Frkanec L., Frkanec R. // *Molecules.* 2017. V. 22. № 2. P. 297.
<https://doi.org/10.3390/molecules22020297>
8. Wanka L., Iqbal K., Schreiner P.R. // *Chem. Rev.* 2013. V. 113. № 5. P. 3516–3604.
<https://doi.org/10.1021/cr100264t>
9. Morozov I.S., Ivanova I.A., Lukicheva T.A. // *Pharm. Chem. J.* 2001. V. 35. № 5. P. 235–238.
<https://doi.org/10.1023/A:1011905302667>
10. Artavia G., Lamoureux G. // *Curr. Med. Chem.* 2010. V. 17. № 26. P. 2967–2978.
<https://doi.org/10.2174/092986710792065027>
11. Spilovska K., Zemek F., Korabecny J., Nepovimova E., Soukup O., Windisch M., Kuca K. // *Curr. Med. Chem.* 2016. V. 23 № 29. P. 3245–3266.
<https://doi.org/10.2174/0929867323666160525114026>
12. Spasov A.A., Khamidova T.V., Bugaeva L.I., Morozov I.S. // *Pharm. Chem. J.* 2000. V. 34. № 1. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1007/bf02524549>
13. Shokova É.A., Kovalev V.V. // *Pharm. Chem. J.* 2016. V. 50. № 2. P. 63–75.
<https://doi.org/10.1007/s11094-016-1400-7>
14. Liu J., Obando D., Liao V., Lifa T., Codd R. // *Eur. J. Med. Chem.* 2011. V. 46. № 6. P. 1949–1963.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.01.047>
15. Sibiryakova A.E., Shiryayev V.A., Reznikov A.N., Kabanova A.A., Klimochkin Y.N. // *Synthesis.* 2019. V. 51. № 2. P. 463–469.
<https://doi.org/10.1055/s-0037-1610824>
16. Лаврова Л.Н., Шальминова Ю.А., Климова Н.В., Арцимович Н.Г. // *Химико-фармацевтический журнал.* 1982. Т. 16. № 10. P. 1197–1201.
17. Geng Y., Bush M., Mosyak L., Wang F., Fan Q.R. // *Nature.* 2013. V. 504. № 7479. P. 254–259.
<https://doi.org/10.1038/nature12725>
18. Armarego W.L.F. *Chemical Methods Used in Purification // Purification of Laboratory Chemicals / Butterworth Heinemann Books – Elsevier – Oxford, 2017. Ed. 8. P. 71–94. ISBN 9780128054574.*
19. Tkachenko I.M., Mankova P.A., Rybakov V.B., Golovin E.V., Klimochkin Y.N. // *Org. Biomol. Chem.* 2020. V. 18. № 3. P. 465–478.
<https://doi.org/10.1039/c9ob02060h>
20. No B.I., Mokhov V.M., Vishnevetskii E.N. // *Rus. J. Org. Chem.* 2003. V. 39. № 8. P. 1193–1194.
<https://doi.org/10.1023/b:rujo.0000010194.16138.0b>
21. Куркин Д.В., Морковин Е.И., Осадченко Н.А., Кнышова Л.П., Бакулин Д.А., Абросимова Е.Е., Горбунова Ю.В., Тюренков И.Н. // *Фармация и фармакология.* 2019. Т. 7. № 5. С. 291–299.
<https://doi.org/10.19163/2307-9266-2019-7-5-291-299>
22. Spasov A.A., Zhukovskaya O.N., Maltsev D.V., Miroshnikov M.V., Skripka M.O., Sultanova K.T., Morkovnik A.S. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. P. 107–114.
<https://doi.org/10.1134/S1068162020010124>
23. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. Миронова А.Н. М.: Гриф и К, 2013. 994 с.

Synthesis and Psychotropic Activity Assessment of Adamantane Derivatives of Pyrrolidine-2-One

Yu. N. Klimochkin*, I. M. Tkachenko*, A. N. Reznikov*, A. K. Shiryaev*, M. S. Kazachkova*, N. S. Kovalev**, D. A. Bakulin**,#, E. E. Abrosimova**, D. V. Kurkin**, and I. N. Tyurenkov**

#Phone: +7 (919) 545-33-67; e-mail: mbfdoc@gmail.com

*Samara Polytech, Department of Organic Chemistry, ul. Molodogvardeyskaya 244, Samara, 443100 Russia

**Volgograd State Medical University, Scientific Center of Innovative Medicine, pl. Pavshikh Bortsov 1, Volgograd, 400131 Russia

Derivatives of 2-pyrrolidinone and some derivatives of adamantane have a wide spectrum of psychotropic activity. Derivatives of 2-pyrrolidinone are characterized by nootropic, anticonvulsant, anxiolytic and psychostimulating activity, and some derivatives of adamantane have a nootropic and antidepressant effect. The aim of the study was to synthesize and evaluate the psychotropic activity of adamantane and homoadamantane derivatives of 2-pyrrolidinone – *cis*-decahydro-4,8:6,10-dimethanocyclononan[*b*]pyrrol-2(1*H*)-one (TIM-1). Synthesis of such compounds with pyrrolidine-2-one moiety in side chain or into cage system was performed for that purpose. The heating of 1-bromoadamantane with pyrrolidine-2-one in the sealed vessel gave *N*-[adamant-1-yl]pyrrolidine-2-one (TIM-2). Homoadamantane-fused pyrrolidine-2-one was synthesized using β -dicarbonyl derivatives of homoadamantane. The synthesis of parent 2-(5-oxohomoadamantyl)acetic acid was performed by cleavage of corresponding keto diester or cyano-ketoester using Holler–Bauer reaction conditions with sonication. Leuckart–Wallach reductive amination of resulting γ -ketoacid gave target TIM-1 as exclusive diastereomer. Stereochemical result of this reaction is determined by steric hindrance of carboxyl group according. The assessment of the psychotropic activity of the compounds was carried out on experimental animals (Wistar rats and CBA mice) in standard behavioral tests. The TIM-2 compound was found to exhibit pronounced anxiolytic (elevated plus maze test and Vogel conflict drinking test), antidepressant (Porsolt forced swimming test and tail suspension test) and nootropic (passive avoidance task) activity. An increase in the time of death of mice after administration of picrotoxin and corazole indicates the effect of TIM-2 on the GABA-ergic system. Compound binding assays were performed by molecular docking of the synthesized compounds to the GABA-B receptor, which also showed high binding energies for TIM-2.

Keywords: pyrrolidin-2-one, adamantane, homoadamantane, anxiolytics, antidepressants, nootropics



УДК 577.113.6

ИНТЕРКАЛИРОВАННЫЕ МОТИВЫ ДНК С НЕНУКЛЕОЗИДНЫМИ ВСТАВКАМИ

© 2021 г. Н. А. Петрунина*, В. В. Лебедев**, Ю. Г. Кириллова**, А. В. Аралов***,
А. М. Варижук*, М. В. Сардушкин****, #

*ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет),
Россия, 141701 Долгопрудный, Московская область, Институтский пер., 9

**ФГБОУ ВО МИРЭА – Российский технологический университет, Институт тонких химических технологий
имени М.В. Ломоносова, Россия, 119571 Москва, просп. Вернадского, 86

***ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Макляя, 16/10

****ФГБОУ ВО Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева,
Россия, 125047 Москва, Миусская площадь, 9

Поступила в редакцию 31.03.2021 г.

После доработки 10.04.2021 г.

Принята к публикации 15.04.2021 г.

Исследована цитозин-богатая последовательность из генома человека, предположительно участвующая в регуляции экспрессии гена *SHANK1* за счет формирования интеркалированного мотива (iM). Показано, что модификация, имитирующая отщепление гетероциклических оснований в петлях iM, существенно ускоряет конформационные переходы, индуцированные малыми изменениями рН. Эти результаты дополняют представления о связи репарации ДНК и формирования неклассических вторичных структур, а также открывают новые возможности в разработке олигонуклеотидных рН-сенсоров с быстрым откликом.

Ключевые слова: модификация ДНК, интеркалированные мотивы, кинетика

DOI: 10.31857/S013234232106021X

ВВЕДЕНИЕ

В промоторах ряда генов, включая гены семейства *SHANK*, не так давно были обнаружены С-богатые последовательности, которые формируют устойчивые С-квадруплексные структуры – интеркалированные мотивы (iM) [1–3]. Поскольку для образования ядра iM, представляющего собой параллельные дуплексы с гемипротонированными цитозиновыми парами, необходимо протонирование атома N3 остатков цитозина, большинство структур данного типа существует исключительно в слабокислой среде [4]. Однако последовательности общей формулы $C_{5+}N_xC_{5+}N_yC_{5+}N_z$, где $N_{x/y/z}$ – петли между С-блоками, могут образовывать стабильные iM и в нейтральной среде [2]. Теоретически iM, имеющие точку перехода (рН_{1/2} – значение рН, при котором половина молекул структурирована) около 7 и отличающиеся высокой кооператив-

ностью складывания/расплетания, чувствительны к малейшим изменениям рН в ядре; их можно назвать встроенными в геном рН-сенсорами. Поскольку промоторные iM рассматриваются как вероятные участники регуляции транскрипции [5, 6], их исследование актуально для прояснения связи изменений генной экспрессии с дисбалансом рН при нейродегенерации или онкотрансформации [7].

Целью данной работы была оценка влияния модификации на рН-чувствительность и кинетические параметры iM на примере С-богатого олигонуклеотида *SHA* из промотора гена *SHANK1*, ассоциированного с нейродегенерацией и нейропластичностью.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Была рассмотрена модификация iM из промотора гена *SHANK1*, которая имитирует апуринизацию/эксцизию азотистых оснований в петлях iM (рис. 1а). Модификация представляет собой замену нуклеозидных остатков остатком 1',2'-дидезоксирибозы (далее – X). Анализ рН-чувстви-

Сокращения: ОДН – олигодезоксирибонуклеотид; оцОДН – одноцепочечный ОДН; FAM – 6-карбоксифлуоресцеин; iM – интеркалированный мотив; TAMRA – 5,6-карбокситетраметилродамин.

Автор для связи: (тел.: +7 (499) 972-44-38; эл. почта: s_makar@mail.ru).

Таблица 1. Последовательности iM-образующих олигодезоксирибонуклеотидов, рН перехода и кинетические характеристики

Шифр	Последовательность, 5'→3'*	$pH_{1/2} \pm 0.1$	$K_{набл. pH 7.2 \rightarrow 6.6}, c^{-1**}$	$T_{1/2, pH 7.2 \rightarrow 6.6}, c$
SHA	d(CCCCCCTCCCCC ACCCCCACCCCC)	7.0	0.065 ± 0.001 (эксп. 1: $54 \pm 3\%$) 0.38 ± 0.02 (эксп. 2: $46 \pm 3\%$)	4.2 ± 0.2
SHA-1	d(CCCCCCTCCCCC XCCCCCACCCCC)	7.1	0.65 ± 0.02 (эксп. 1: $53 \pm 3\%$) 0.093 ± 0.002 (эксп. 2: $47 \pm 3\%$)	2.3 ± 0.1
SHA-2	d(CCCCCCXCCCCC ACCCCCXCCCCC)	7.1	0.065 ± 0.001 (эксп. 1: $66 \pm 10\%$) 0.12 ± 0.01 (эксп. 2: $54 \pm 10\%$)	1.5 ± 0.1
SHA-3	d(CCCCCCXCCCCC XCCCCCXCCCCC)	7.1	1.16 ± 0.001 (эксп. 1: $68 \pm 3\%$) 0.153 ± 0.004 (эксп. 2: $32 \pm 3\%$)	1.0 ± 0.1

* X – остаток 1',2'-дидезоксирибозы.

** Поскольку кинетические кривые представляют собой биэкспоненты, для каждого iM приведены два значения $K_{набл.}$, соответствующие двум экспонентам (эксп. 1 и эксп. 2). Относительные вклады этих экспонент (в процентах) приведены в скобках. Средние значения и погрешности рассчитаны по трем повторностям.

тельности iM (SHA) и его аналогов (SHA-1–SHA-3) выполняли методом флуориметрии. Для этого по 3'- и 5'-концам олигодезоксирибонуклеотидов (ОДН) вводили флуоресцентные метки – остатки 5,6-карбокситетраметилродамина (TAMRA) и 6-карбоксифлуоресцеина (FAM) соответственно. В сложном iM наблюдали FRET-эффект за счет сближения FAM и TAMRA. При этом флуоресценция обеих меток частично гасилась в составе iM за счет стекинг-взаимодействий флуорофоров с гемипротонированными цитозиновыми парами, и данный эффект тушения доминировал. Собственная рН-зависимость флуоресценции метки была незначительна на фоне тушения в iM. Разрушение iM при переходе от рН 6 к рН 8 сопровождалось увеличением интенсивности флуоресценции, и по полученным кривым методом регрессионного анализа определяли $pH_{1/2}$ (рис. 1б). Как видно из данных табл. 1, модификации в одной, двух или трех петлях практически не оказывали влияния на $pH_{1/2}$. Таким образом, удаление гетероциклических оснований в петлях не препятствует формированию iM при физиологических значениях рН.

Для оценки влияния модификации на кинетику конформационных переходов оОДН–iM при изменении рН использовали метод остановленного потока. Кинетические кривые изменения флуоресценции FAM в ответ на скачки рН $6.6 \leftrightarrow 7.2$ (рис. 1в) имели вид биэкспонент, что можно объяснить наличием двух изоформ iM: 5'E (в образовании наружной цитозиновой пары принимает участие 5'-концевой цитозин) и 3'E (наружная пара содержит 3'-концевой цитозин). Модификация iM не меняла кинетику отклика на скачок рН $6.6 \rightarrow 7.2$, но заметно увеличивала наблюдаемые константы скорости обратных процессов (соответственно, сокращалось время сворачивания iM – $T_{1/2, pH 7.2 \rightarrow 6.6}$). Мы предполагаем, что данный эффект обусловлен стерическим фактором. Эффект нарастал при переходе от единич-

ной модификации к модификации всех петель. Сходного результата можно ожидать при эксцизии гетероциклических оснований в возможных сайтах образования iM геномной ДНК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

С-богатая последовательность SHA из промотора гена *SNAH1* (Gene ID: 50944) была выбрана как пример последовательности, формирующей термодинамически устойчивый iM в условиях, близких к физиологическим [1]. Природный ОДН SHA и его модифицированные аналоги SHA-1–SHA-3 получали твердофазным методом на автоматическом синтезаторе MerMade 6/12 DNA Synthesizer (BioAutomation, Германия) с использованием стандартных коммерческих реагентов, а также фосфорамидита d-spacer для введения остатка 1',2'-дидезоксирибозы (Glen Research, США), фосфорамидита FAM-производного (5'-концевое мечение ОДН) и модифицирующей смолы Алкин CPG для 3'-концевого мечения (Lumiprobe, Россия). Мечение по 3'-концу остатком TAMRA с аминопропильным линкером осуществляли методом клик-химии с использованием соответствующего азиды (Lumiprobe, Россия). ОДН выделяли хроматографически (чистота не менее 95% по данным ВЭЖХ), структуру и чистоту подтверждали методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии.

Для получения кривой рН-зависимости получали растворы ОДН (2 мкМ) в 140 мМ калий-фосфатном буфере заданного рН. Спектры флуоресценции FAM/TAMRA при возбуждении 490/560 нм регистрировали на флуоресцентном ридере Infinite 200 Pro (Tecan, Швеция) при комнатной температуре. Экспериментальную зависимость значения флуоресценции от рН аппроксимировали моделью Хилла, $pH_{1/2}$ определяли методом регрессионного анализа. Для получения кинетических кривых регистрировали изменения флуоресценции FAM после изменения значения рН

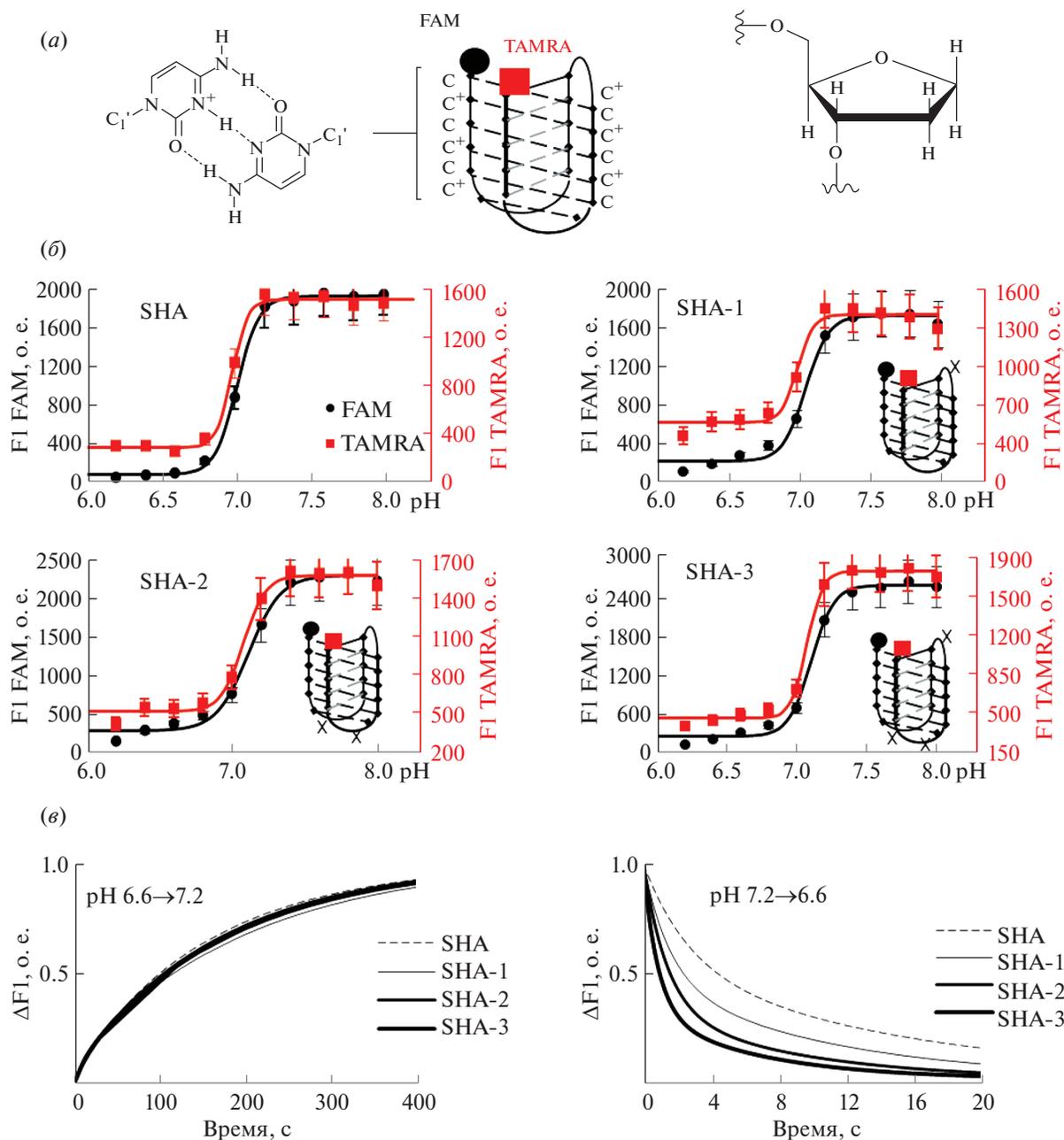


Рис. 1. pH-чувствительность и кинетика формирования/расплетения интеркалированного мотива (iM) SHA из промотора гена *SHANK1* и его аналогов (SHA-1–SHA-3). (a) – Схематическое представление iM и формирующей ядро гемипротонированных цитозиновых пар (слева), а также модификация, вводимая в петлю iM – остаток 1',2'-дидезоксирибозы (справа); (б) – кривые pH-зависимости iM, полученные при регистрации флуоресценции FAM (черный) и TAMRA (красный); (в) – кинетические кривые расплетения (pH 6.6→7.2) и формирования (pH 7.2→6.6) iM, полученные путем регистрации изменений флуоресценции FAM при скачках pH.

буферного раствора на спектрофотометре Chirascan (Applied Photophysics, Великобритания), оборудованном модулем остановленного потока, при возбуждении 490 нм с применением фильтра 515 нм. Для определения наблюдаемых констант скорости конформационного перехода экспериментальные кривые аппроксимировали биэкспонентами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследовано влияние модификации, имитирующей отщепление гетероциклических оснований в петлях iM, на кинетические характеристики и pH-зависимость iM на примере фрагмента промотора гена *SHANK1*. Показано, что модификация существенно ускоряет конформационные переходы, индуцированные малыми изменения-

ми рН. Полученные данные позволяют предположить, что повреждающие ДНК агенты и работа системы репарации облегчают формирование неканонических структур в С-богатых участках. Вторым важным следствием представленных результатов является возможность оптимизации кинетических параметров оптических рН-сенсоров на основе iM: введение остатков дидезоксирибозы в петли позволяет уменьшить время отклика сенсоров, что значимо для исследования протонных токов в клетке. Предложенная модификация может использоваться для получения сенсоров на основе iM, пригодных для исследования быстрых рН-зависимых процессов в клетке.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева (проект № К-2020-024).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wright E.P., Huppert J.L., Waller Z.A.E. // *Nucleic Acids Res.* 2017. V. 45. P. 2951–2959. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx090>
2. Mir B., Serrano I., Buitrago D., Orozco M., Escaja N., Gonzalez C. // *J. Am. Chem. Soc.* 2017. V. 139. P. 13985–13988. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b07383>
3. Turaev A., Isaakova E., Severov V., Bogomazova A., Zaitsepin T., Sardushkin M., Aralov A., Lagarkova M., Pozmogova G., Varizhuk A. // *Biosensors & Bioelectronics.* 2021. V. 175. P. 112864. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112864>
4. Abou Assi H., Garavis M., Gonzalez C., Damha M.J. // *Nucleic Acids Res.* 2018. V. 46. P. 8038–8056. <https://doi.org/10.1093/nar/gky73>
5. Miglietta G., Cogoi S., Pedersen E., Xodo L. // *Sci. Rep.* 2016. V. 5. P. 18097. <https://doi.org/10.1038/srep18097>
6. Niu K., Zhang X., Deng H., Wu F., Ren Y., Xiang H., Zheng S., Liu L., Huang L., Zeng B., Li S., Xia Q., Song Q., Palli S.R., Feng Q. // *Nucleic Acids Res.* 2018. V. 46. P. 1710–1723. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1207>
7. Majdi A., Mahmoudi J., Sadigh-Eteghad S., Golzari S.E.J., Sabermarouf B., Reyhani-Rad S. // *J. Neurosci. Res.* 2016. V. 94. P. 879–887. <https://doi.org/10.1002/jnr.23757>

DNA Intercalated Motifs with Non-Nucleoside Inserts

N. A. Petrunina*, V. V. Lebedev**, Yu. G. Kirillova**, A. V. Aralov***, A. M. Varizhuk*, and M. V. Sardukshkin****, #

#Phone: +7 (499) 972-44-38; e-mail: s_makar@mail.ru

*Moscow Institute of Physics and Technology, Institutsky per. 9, Dolgoprudny, 141701 Russia

**MIREA – Russian Technological University, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, prosp. Vernadskogo 86, Moscow, 119571 Russia

***Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

****Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Miusskaya pl. 9, Moscow, 125047 Russia

A cytosine-rich sequence from the human genome that is presumably involved in the regulation of *SHANK1* gene expression through the formation of an intercalated motif (iM), has been investigated. A modification that imitates base excision in the iM loops was shown to significantly accelerate the conformational transitions induced by small pH changes. These results supplement the understanding of the relation between DNA repair and the formation of noncanonical secondary structures. Moreover, they open up new possibilities in the development of oligonucleotide pH sensors with a fast response.

Keywords: DNA modification, intercalated motifs, kinetics



УДК 577.2:577.113.4

ВЛИЯНИЕ ДЛИНЫ СПЕЙСЕРОВ НА СВОЙСТВА ДНК-ЗОНДОВ В ГИБРИДИЗАЦИОННОМ АНАЛИЗЕ

© 2021 г. Р. А. Мифтахов*, С. А. Лапа*, В. Е. Кузнецова*, А. М. Золотов*, В. А. Василисков*,
В. Е. Шершов*, С. А. Суржиков*, А. С. Заседателев*, А. В. Чудинов*^{*,#}

*ФГБУН “Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта” РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32

Поступила в редакцию 20.12.2020 г.

После доработки 26.12.2020 г.

Принята к публикации 29.12.2020 г.

Разработан метод иммобилизации олигонуклеотидов на поверхности полиэтилентерефталатной (ПЭТ) подложки. Исследована эффективность комплементарного связывания олигонуклеотидами мишени с олигонуклеотидами-зондами в зависимости от длины спейсеров, связывающих олигонуклеотиды-зонды с ПЭТ-подложкой. Показано, что увеличение длины спейсера приводит к возрастанию гибридационного сигнала.

Ключевые слова: активация поверхности ПЭТ, иммобилизация олигонуклеотидов, гибридационный анализ

DOI: 10.31857/S013234232106018X

ВВЕДЕНИЕ

При анализе нуклеиновых кислот используется формат выполнения анализа на поверхности твердой подложки, когда олигонуклеотиды, участвующие в анализе, ковалентно связаны с поверхностью подложки. В методе биочипов (англ. microarray) проводится анализ по связыванию анализируемой ДНК с набором олигонуклеотидов (зондов), закрепленных в матрице ячеек, каждая из которых содержит олигонуклеотид известного строения [1]. По пространственному распределению зондов на подложке можно классифицировать существующие технологические платформы биочипов на две основные группы: двумерные (2D), полученные на поверхности [2], и трехмерные (3D) – в гидрогелевых ячейках, закрепленных на поверхности подложки [3]. Вместимость пробы в гидрогелевых 3D-ячейках в ~100 раз больше, чем в 2D-ячейках [4, 5]. Олигонуклеотиды, непосредственно иммобилизованные в 2D-ячейке, менее доступны для взаимодействия с комплементарной ДНК из-за пространственных затруднений со стороны твердой подложки. Кинетика реакции гибридализации ДНК с олигонуклеотидами, иммобилизованными в 2D-ячейках за 3'- или 5'-конец, близка к кинетике реакции в растворе, в то время как в гидрогелевой ячейке она существенно осложнена

диффузией анализируемой ДНК внутрь гидрогелевой ячейки, особенно для длинных молекул ДНК [4]. Использование спейсеров, отдаляющих иммобилизованные олигонуклеотиды от поверхности, позволяет увеличивать гибридационный сигнал [6].

Хорошо отработаны методы иммобилизации для кремний-содержащих подложек [7] и подложек, покрытых тонким слоем золота [8]. Иммобилизация на полимерных подложках требует проведения подбор материала, совместимого с процедурами и компонентами, используемыми при анализе ДНК, и дает возможность получить на поверхности подложки функциональные химические группы, необходимые для иммобилизации олигонуклеотидов.

Цель данного исследования – разработка метода иммобилизации олигонуклеотидов на поверхности полиэтилентерефталатной подложки и изучение влияния длины используемых спейсеров на уровень гибридационного сигнала.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В разработанном методе иммобилизация олигонуклеотидов осуществляется на поверхности полиэтилентерефталатной (ПЭТ) подложки. ПЭТ прозрачен в видимом и ближнем ИК-свете, биосовместим, термо- и химостоек в условиях проведения анализа ДНК [9].

Сложноэфирные группы на поверхности ПЭТ гидролизуются спиртовым раствором КОН, на по-

Сокращения: ПЭТ – полиэтилентерефталат.

[#] Автор для связи (тел.: +7 (499) 135-98-00; эл. почта: chud@imb.ru; chudhome@rambler.ru).

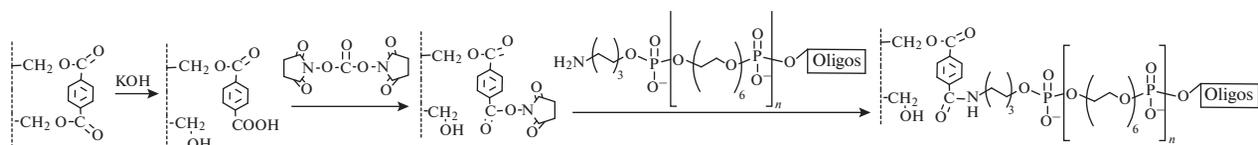


Рис. 1. Схема иммобилизации олигонуклеотидов-зондов на полиэтилентерефталатной подложке. Oligos – соответствующая последовательность олигонуклеотида; $n = 0, 1, 2, 4, 8$.

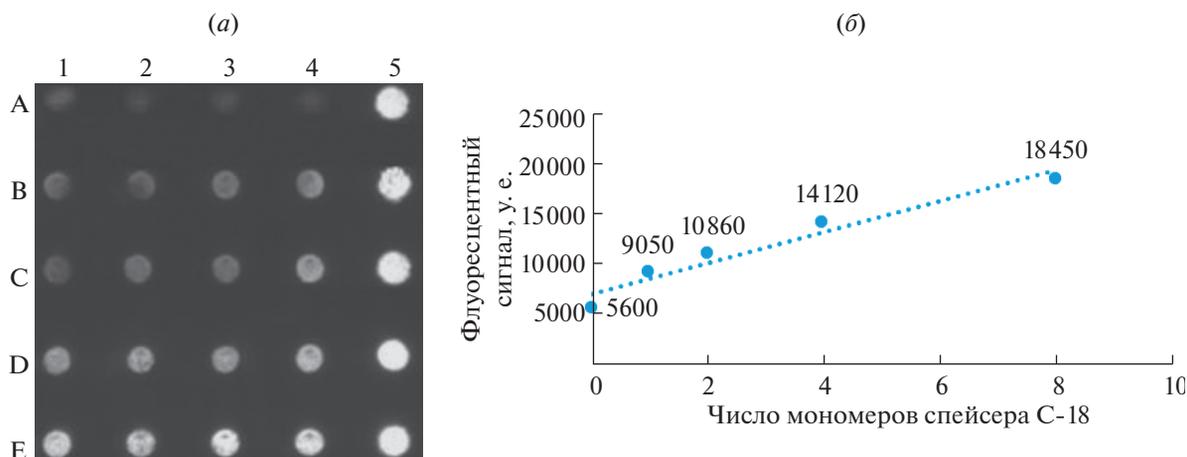


Рис. 2. (а) – Флуоресцентная картина гибридизации олигонуклеотида-мишени с олигонуклеотидами-зондами с различным числом (n) мономеров спейсера C-18. Горизонтальные ряды А–Е: $n = 0, 1, 2, 4, 8$ соответственно; вертикальные ряды: 1–4 – повторы олигонуклеотидов, 5 – контрольные ячейки с красителем Cy5; (б) – график зависимости средних значений гибридизационных сигналов в четырех повторах от числа мономерных звеньев спейсера C-18 на олигонуклеотидах-зондах.

верхности получали карбоксильные группы. Карбоксильные группы активировали дисукцинимидкарбонатом. Поверхностную концентрацию доступных активированных карбоксильных групп определяли по связыванию с индикаторным веществом, цианиновым красителем Cy5, несущим первичную алифатическую аминогруппу, по ранее опубликованному методу [10]. Поверхностная концентрация составила 12 пмоль/см².

Иглой робота-манипулятора на подложку нанесли микрокапли раствора олигонуклеотидов [3]. Олигонуклеотиды соответствуют фрагменту гена *rhoB* *Mycobacterium tuberculosis*, содержат первичную аминогруппу и спейсеры различной длины на 5'-конце (рис. 1). Спейсеры C-18 на основе гексаэтиленгликоля вводили в олигонуклеотиды при автоматическом синтезе. После инкубации и отмывки проверяли продуктивность иммобилизованных олигонуклеотидов в гибридизационном анализе с комплементарным олигонуклеотидом-мишенью, маркированным флуоресцентным красителем Cy5. Интенсивность флуоресценции ячеек измеряли методом цифровой флуоресцентной спектроскопии на канале красителя Cy5 [11].

Полученные результаты представлены на рис. 2. Видно, что увеличение длины спейсера C-18 по-

вторением мономерной части 1, 2, 4 и 8 раз приводит к увеличению гибридизационных сигналов. Наибольший относительный эффект наблюдается для первого спейсера, сигнал увеличивается в 1.8 раза. Дальнейшее увеличение длины спейсера приводит к увеличению сигнала в ~1.2 раза на каждую мономерную часть спейсера. Общее увеличение сигнала составляет ~3.3 раза. График зависимости гибридизационных сигналов от длины спейсера далек от выхода на плато. Твердая поверхность затрудняет связывание иммобилизованных олигонуклеотидов-зондов с комплементарным олигонуклеотидом-мишенью даже при длине спейсера >144 атомов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали образцы бесцветной пленки полиэтилентерефталата ПЭТ Э (ГОСТ 24234-80, плотность 1.39 г/см³, $M_r = 20\,000\text{--}40\,000$, размер 25 × 75 мм, толщина 200 мкм). Карбоксильные группы на поверхности ПЭТ получали выдерживанием пленки в 0.5 М растворе КОН в 96%-ном этаноле в течение 60 мин при комнатной температуре. Карбоксильные группы активировали 0.1 М раствором дисукцинимидкарбоната в диме-

тилсульфоксиде в течение ночи при комнатной температуре.

Синтезировали набор олигонуклеотидов-зондов: 5'-NH₂-Sp_n-TTGTTCTGGTCCATGAAT-3' ($n = 0, 1, 2, 4, 8$; Sp – спейсеры C-18 на основе гексаэтиленгликоля); олигонуклеотид-мишень: 5'-ATTTCATGGACCCAGAACA-Cy5-3'. Твердофазный синтез олигонуклеотидов осуществляли с помощью автоматического синтезатора ABI 394 DNA/RNA (Applied Biosystems, США) по стандартному регламенту с использованием коммерческих растворителей и реагентов. Последовательность олигонуклеотида-зонда описана ранее [12], последовательность олигонуклеотида-мишени полностью комплементарна зонду. Спейсеры синтезировали по амидофосфитной технологии из коммерческих реагентов Glen Research (США).

Микрокапли растворов олигонуклеотидов-зондов в буферном растворе Na₂CO₃/NaHCO₃ (pH 10.2) наносили иглой робота-манипулятора на активированную поверхность ПЭТ-подложки. После инкубации и отмывки в ультразвуковой ванне на подложку наносили раствор олигонуклеотида-мишени в гибридационном буфере. После инкубации подложку промывали SSPE-буфером (Invitrogen, США). Флуоресцентные сигналы ячеек на подложке регистрировали на портативном анализаторе (ООО “БИОЧИП-ИМБ”, Россия) с лазерным возбуждением при 650 нм, запирающим фильтром 716 ± 43 нм (Semrock, США) и цифровой ПЗС-камерой. Изображения анализировали с помощью программы ImaGeWare (ООО “БИОЧИП-ИМБ”, Россия). В спектральном диапазоне флуоресценции красителя Cy5 полимерная подложка из ПЭТ-пленки практически не флуоресцирует и не влияет на регистрируемые сигналы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан метод иммобилизации олигонуклеотидных зондов на поверхности ПЭТ-подложки. Показано, что увеличение длины спейсера, связывающего зонд с подложкой, способствует увеличению гибридационного сигнала. Максимальный гибридационный сигнал достигнут при использовании спейсера, содержащего восемь гексаэтиленгликолевых фрагментов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-04-00680) и стипендии Президента Российской Федерации для молодых ученых и аспирантов, осуществляющих перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики на 2018–2020 гг. (регистрационный номер СП-274.2018.4).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gryadunov D., Dementieva E., Mikhailovich V., Nasedkina T., Rubina A., Savvateeva E., Fesenko E., Chudinov A., Zimenkov D., Kolchinsky A., Zasedatelev A. // *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2011. V. 11. P. 839–853. <https://doi.org/10.1586/erm.11.73>
2. Naidu C.K., Suneetha Y. // *Trop. J. Pharm. Res.* 2012. V. 11. P. 153–164. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2016.17.4.2199>
3. Rubina A.Y., Pan'kov S.V., Dementieva E.I., Pen'kov D.N., Butygin A.V., Vasiliskov V.A., Chudinov A.V., Mikheikin A.L., Mikhailovich V.M., Mirzabekov A.D. // *Anal. Biochem.* 2004. V. 325. P. 92–106. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.10.010>
4. Zubtsov D.A., Savvateeva E.N., Rubina A.Y., Pan'kov S.V., Konovalova E.V., Moiseeva O.V., Chechetkin V.R., Zasedatelev A.S. // *Anal. Biochem.* 2007. V. 368. P. 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.04.040>
5. Brittain W.J., Brandstetter T., Prucker O., Rühle J. // *ACS Appl. Mat. Int.* 2019. V. 11. P. 39397–39409. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b06838>
6. Halperin A., Buhot A., Zhulina E.B. // *Langmuir.* 2007. V. 22. P. 11290–11304. <https://doi.org/10.1021/la0616606>
7. Oh S.J., Cho S.J., Kim C.O., Park J.W. // *Langmuir.* 2002. V. 18. P. 1764–1769. <https://doi.org/10.1021/ma0020032>
8. Zhi Z.L., Powell A.K., Turnbull J.E. // *Anal. Chem.* 2006. V. 78. P. 4786–4793. <https://doi.org/10.1021/ac060084f>
9. Dimitrievska S., Maire M., Diaz-Quijada G.A., Robitaille L., Aji A., Yahia L., Moreno M., Merhi Y., Rureau M. // *Macromol. Biosci.* 2011. V. 11. P. 493–502. <https://doi.org/10.1002/mabi.201000390>
10. Мифтахов Р.А., Лана С.А., Шериов В.Е., Заседателева О.А., Гусейнов Т.О., Спицын М.А., Кузнецова В.Е., Мамаев Д.Д., Лысов Ю.П., Барский В.Е., Тимофеев Э.Н., Заседателев А.С., Чудинов А.В. // *Биофизика.* 2018. Т. 63. С. 661–668. <https://doi.org/10.1134/S000630291804004X>
11. Lysov Y., Barsky V., Urasov D., Urasov R., Cherepanov A., Mamaev D., Yegorov Y., Chudinov A., Surzhikov S., Rubina A., Smoldovskaya O., Zasedatelev A. // *Biomed. Optics Exp.* 2017. V. 8. P. 4798–4810. <https://doi.org/10.1364/BOE.8.004798>
12. Mikhailovich V., Lapa S., Gryadunov D., Sobolev A., Strizhkov B., Chernyh N., Skotnikova O., Irtuganova O., Moroz A., Litvinov V., Vladimirovskii M., Perelman M., Chernousova L., Erokhin V., Zasedatelev A., Mirzabekov A. // *J. Clin. Microbiol.* 2001. V. 39. P. 2531–2540. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.7.2531-2540.2001>

Effect of Spacers on DNA Probe Properties in Hybridization Analysis

R. A. Miftakhov*, S. A. Lapa*, V. E. Kuznetsova*, A. M. Zolotov*, V. A. Vasiliskov*, V. E. Shershov*,
S. A. Surzhikov*, A. S. Zasedatelev*, and A. V. Chudinov*.[#]

[#]Phone: +7 (499) 135-98-00; e-mail: chud@eimb.ru; chudhome@rambler.ru

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

A method of immobilizing oligonucleotides on the surface of a polyethylene terephthalate (PET) substrate has been developed. Effectiveness of complementary binding of target oligonucleotide to oligonucleotides-probes depending on long spacers of binding oligonucleotides-probes to substrate was investigated. It was shown that an increase of the spacer length leads to an increase of the hybridization signal.

Keywords: PET surface activation, oligonucleotide immobilization, hybridization analysis



УДК 577.29

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХИМЕРНОГО ТРАНСКРИПТА *NUP98-NSD1* ПРИ ОСТРОМ МИЕЛОИДНОМ ЛЕЙКОЗЕ У ДЕТЕЙ

© 2021 г. А. А. Бессонова*, Л. Г. Гукасян*, Л. В. Байдун**, А. В. Чудинов*, Т. В. Наседкина*.*

*ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32

**Российская детская клиническая больница ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Россия, 119117 Москва, Ленинский просп., 117

Поступила в редакцию 09.12.2020 г.

После доработки 20.12.2020 г.

Принята к публикации 26.12.2020 г.

Разработан и оптимизирован метод анализа на основе обратной транскрипции, полимеразной цепной реакции и аллель-специфичной гибридизации на биологическом микрочипе для определения химерного транскрипта *NUP98-NSD1* в образцах костного мозга при остром миелоидном лейкозе у детей.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, химерный ген *NUP98-NSD1*, биологический микрочип, диагностика

DOI: 10.31857/S0132342321060051

ВВЕДЕНИЕ

Образование химерного гена *NUP98-NSD1* происходит в результате транслокации t(5;11) (q35.2;p15.4), которая встречается при остром миелоидном лейкозе у детей в 3.8% случаев [1]. Данная транслокация – криптогическая, пациенты с такой перестройкой, как правило, относятся к группе острого миелоидного лейкоза с нормальным кариотипом [2]. При экспрессии перестроенного гена образуется химерный транскрипт *NUP98-NSD1*, в котором 12-й экзон гена *NUP98* N-концом соединяется с 6-м экзоном C-конца гена *NSD1*. Образуется химерный белок, в котором одна часть аминокислотной последовательности относится к белку нуклеопорину 98 (*NUP98*), а другая часть – к белку 1 с доменом SET, связывающим ядерный рецептор (*NSD1*), который входит в семейство гистоновых метилтрансфераз [3]. Считается, что наличие химерного гена *NUP98-NSD1* – неблагоприятный фактор течения заболевания, еще более ухудшает прогноз присутствие реципрокной транслокации *NSD1-NUP98* [4].

Сложность обнаружения перестройки t(5;11) *NUP98-NSD1* заключается в том, что данная транслокация не может быть выявлена при стандартном цитогенетическом исследовании. Для определения *NUP98-NSD1* используют, как пра-

вило, молекулярные методы анализа, такие как FISH, обратная транскрипция с полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР), ПЦР в реальном времени [5]. Однако данная транслокация – не частое событие, и она, как правило, не входит в число мишеней в диагностических наборах для скрининга транслокаций при лейкозах. В то же время постановка дополнительных индивидуальных реакций ОТ-ПЦР на редкие транслокации, выявляемые у небольшого количества пациентов, требует затрат времени, реагентов и самого образца.

Параллельное выявление множества молекулярных мишеней с помощью гидрогелевых биологических микрочипов показало себя эффективным для анализа 22 наиболее известных клинически значимых хромосомных транслокаций при лейкозах у детей [6]. Поэтому данный подход был применен для определения транслокации *NUP98-NSD1* в настоящей работе. Разработанный метод выявления химерного гена *NUP98-NSD1* позволит расширить панель анализируемых хромосомных перестроек и повысить специфичность молекулярной диагностики острого миелоидного лейкоза у детей [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для разработки метода использовали контрольные образцы РНК с ранее выявленным химерным транскриптом *NUP98-NSD1* (положительный контроль) и образец, не содержащий известных перестроек (отрицательный контроль).

Сокращения: *NUP98* – нуклеопорин 98; *NSD1* – белок 1 с доменом SET, связывающим ядерный рецептор.

* Автор для связи: (тел.: +7 (495) 135-98-46; эл. почта: nased@biochip.ru).

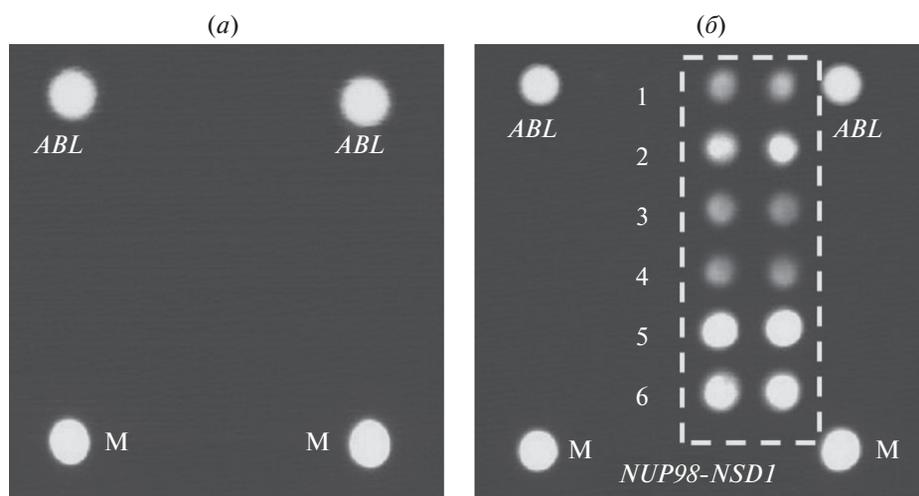


Рис. 1. Картины гибридизации на биологическом микрочипе: (а) – образец без транслокации, наблюдаются флуоресцентные сигналы от ячеек, содержащих маркер (М) и зонды для контрольного гена *ABL*; (б) – образец, содержащий транслокацию *NUP98-NSD1*, 1, 2 – ячейки с зондом, комплементарным месту слияния двух генов (12-й экзон гена *NUP98* и 6-й экзон гена *NSD1*; 3, 4 и 5, 6 – ячейки с зондами, комплементарными последовательностям генов *NUP98* и *NSD1* соответственно; номера ячеек соответствуют номерам зондов в табл. 1.

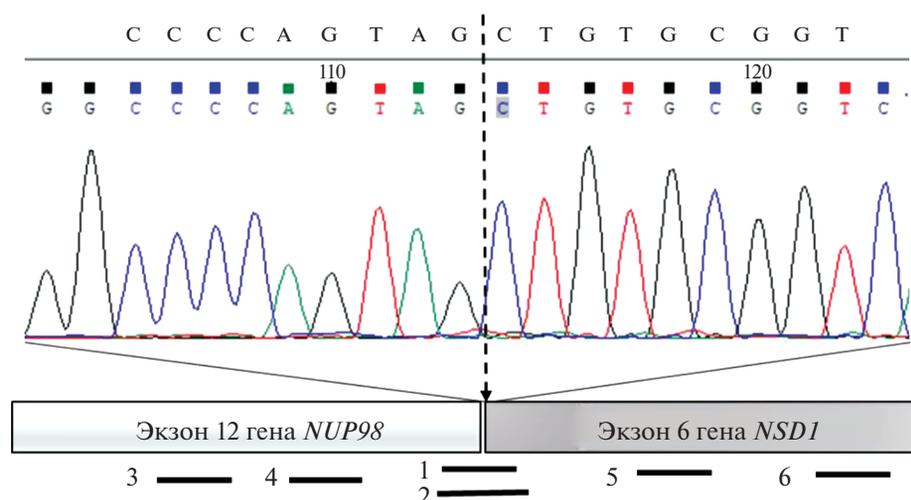


Рис. 2. Результаты секвенирования химерного ПЦР-продукта *NUP98-NSD1*. Пунктирной линией обозначено место слияния 12-го экзона гена *NUP98* и 6-го экзона гена *NSD1*. Схематично представлено распределение зондов 1–6 по длине химерного ПЦР-продукта.

Методика анализа включала обратную транскрипцию с праймерами, специфичными для транслокаций, далее кДНК была использована в качестве матрицы в двухэтапной ПЦР. На втором этапе в ПЦР-смесь добавляли *Sy5-dUTP* и получали флуоресцентно-меченый ПЦР-продукт, который гибридизовали на биочипе с иммобилизованными зондами. Картины гибридизации для различных образцов представлены на рис. 1. Секвенирование ПЦР-продукта показало, что при образовании химерного транскрипта происходит слияние экзона 12 гена *NUP98* и экзона 6 гена *NSD1*

(рис. 2). Это соответствует картине гибридизации на биочипе. Последовательности зондов представлены в табл. 1. Наиболее яркое свечение наблюдается для зондов 2, 5 и 6, в дальнейшем эти зонды будут использованы для включения в расширенную панель для анализа транслокаций при лейкозах у детей.

Разработанный метод был использован для поиска химерного транскрипта *NUP98-NSD1* в образцах пациентов с острым миелоидным лейкозом (всего 36 образцов). Среди них для шести образцов были получены положительные флуо-

Таблица 1. Последовательности зондов, иммобилизованных на биочипе

№	Название	Последовательность (5'–3')	Длина, нт
1	NUP98j_1	CCCAGTAGCTGTGCGGTCA–NH ₂	19
2	NUP98j_2	CCCCAGTAGCTGTGCGGTCAAG–NH ₂	21
3	NUP98_1	CGACAGCCACTTTGGGCTTTGG–NH ₂	22
4	NUP98_2	GCCACTTTGGGCTTTGGAGCC–NH ₂	21
5	NSD1_1	TAGGAAGCCAAGCAAGTGGCT–NH ₂	21
6	NSD1_2	GAGAAGAAACGCCTTAGGAAGC–NH ₂	24
7	ABL1	TAATGGTACACCCTCCCTTC–NH ₂	20

ресцентные сигналы с *NUP98-NSD1*-зондами. Наличие химерного транскрипта также проверяли методом ОТ-ПЦР с последующим электрофорезом в 2%-ном агарозном геле. Длина выявленного продукта в *NUP98-NSD1*-положительных образцах составила 550 нт, что соответствует расчетной длине химерного ПЦР-продукта, содержащего перестройку *NUP98-NSD1*.

Для определения аналитической чувствительности метода РНК с *NUP98-NSD1* смешивали в пропорциях 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10000 с РНК, не содержащей данную перестройку, далее проводили анализ с использованием биочипа. Нижний предел обнаружения специфичных флуоресцентных сигналов для *NUP98-NSD1* соответствовал разведению исходной РНК в 1000 раз.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали 36 образцов костного мозга пациентов с острым миелоидным лейкозом. Возраст пациентов от 1 года до 18 лет. Фракцию лейкоцитов выделяли в результате гемолиза образцов костного мозга в 0,8%-ном растворе NH₄Cl и центрифугирования при 1500 g в течение 10 мин.

В ходе обратной транскрипции была синтезирована кДНК на матрице мРНК, выделенной из лейкоцитов костного мозга пациентов, с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия). Для получения кДНК химерного гена были подобраны праймеры, комплементарные участку экзона гена, расположенного на 3'-стороне химерного транскрипта. В качестве контроля выделения РНК и прохождения ОТ-ПЦР использовали ген домашнего хозяйства *ABL* (*ABL1*), который кодирует белок тирозин-протеинкиназу и экспрессируется во всех клетках. Реакцию обратной транскрипции проводили в объеме 25 мкл с использованием набора РЕВЕРТА-L (АмплиСенс, Россия): 10 мкл RT-mix (АмплиСенс, Россия), 10 мкл РНК, 1 мкл ревертазы MMlv (АмплиСенс, Россия), 5 пмоль специфичного праймера и 20 пмоль праймера *ABL*. Для наработки одноце-

почечного меченого фрагмента ДНК для гибридизации на гидрогелевом микрочипе использовали метод “гнездовой” ПЦР в два этапа, как описано ранее [8]. ПЦР проводили в термоциклере T100 (Bio-Rad, США) по следующей программе: 95°C – 5 мин; далее 35 циклов: 95°C – 20 с, 62°C – 20 с, 72°C – 30 с; 72°C – 3 мин. В ходе первого этапа происходила наработка двухцепочечного продукта на основе кДНК, на втором этапе в реакционную смесь добавляли 1 мкл ПЦР-продукта первого этапа и проводили асимметричную ПЦР и флуоресцентное маркирование конечного ПЦР-продукта.

Последовательности праймеров для обратной транскрипции: *ABL1* ОТ 5'-GGACACACCATAG-ACAGT-3', *NSD1* ОТ 5'-CAAGAACTGGAGGC-3'.

Последовательности праймеров ПЦР этапа 1: *ABL1* Fex 5'-CAATGCCGCTGAGTATCTGCT-3', *NUP98* Fex 5'-GCTTGGTGACAGGAT-3' и *ABL1* Rex 5'-GCGTTCATCTCCCACTTGT-3', *NSD1* Rex 5'-GCTAGAAGGCTTTCCCTCTTC-3'.

Последовательности праймеров ПЦР этапа 2: *ABL1* F 5'-AGCTTCTTGGTGCGTGAGAGT-3', *NUP98* F 5'-TGCTGGACAGGCATCT-3' и *ABL1* R 5'-GCCACCGTTGAATGATGATGA-3', *NSD1* R 5'-CTTACCTTGTGCACCTGCTC-3'.

Флуоресцентно-меченый продукт второго этапа ПЦР гибридизовали на биочипе. Биочипы изготавливали методом фотоиндуцируемой совместной полимеризации олигонуклеотидов и компонентов акриламидного геля, как описано ранее [6, 8]. Последовательности зондов приведены в табл. 1. Гибридизационная смесь с общим объемом 35 мкл содержала 6× SSPE (Promega, США), 2 M раствор гуанидин-изотиоцианата и амплификат. Гибридизационную смесь полностью денатурировали при 95°C, быстро охлаждали на льду, наносили на биочип и инкубировали в течение 10–12 ч при 37°C. Затем биочип отмывали в растворе 1× SSPE в течение 10 мин при комнатной температуре и высушивали.

Флуоресцентные сигналы регистрировали с помощью анализатора биочипов (ООО “БИОЧИП-ИМБ”, Россия), анализ изображения проводи-

ли с помощью программы ImageWare (ООО “БИОЧИП-ИМБ”, Россия). Секвенирование по Сэнгеру проводили на автоматическом секвенаторе 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием ПЦР-продукта первого этапа и праймера NUP98_Fex или NSD1_Rex в концентрации 5 пмоль.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанный метод анализа с помощью биологического микрочипа специфично выявляет химерный транскрипт *NUP98-NSD1* в образцах костного мозга пациентов с острым миелоидным лейкозом. Чувствительность метода такова, что позволяет обнаруживать одну лейкоэмическую клетку среди 1000 нормальных клеток, что позволяет проводить не только молекулярно-генетическую диагностику в острый период заболевания, но и мониторинг минимальной остаточной болезни в ходе лечения. Далее планируется включить разработанные наборы праймеров и зондов в состав диагностической тест-системы для определения клинически значимых транслокаций при лейкозах у детей.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-15-00398).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От родителей пациентов получено письменное добровольное информированное согласие на использование результатов исследования в обезличенной форме в научных целях.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Struski S., Lagarde S., Bories P., Puisieux C., Prade N., Cucchini W., Pages M.-P., Bidet A., Gervais C., Lafage-Pochitaloff M., Roche-Lestienne C., Barin C., Penther D., Nadal N., Radford-Weiss I., Collonge-Rame M.-A., Gaillard B., Mugneret F., Lefebvre C., Petit A., Leverger G., Broccardo C., Luquet I., Pasquet M., Delabesse E.* // *Leukemia*. 2017. V. 31. P. 565–572. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.267>
2. *Shiba N., Ichikawa H., Taki T., Park M.-J., Jo A., Mitani S., Kobayashi T., Shimada A., Sotomatsu M., Arakawa H., Adachi S., Tawa A., Horibe K., Tsuchida M., Hanada R., Tsukimoto I., Hayashi Y.* // *Genes Chromosomes Cancer*. 2013. V. 52. P. 683–693. <https://doi.org/10.1002/gcc.22064>
3. *Bennett R.L., Swaroop A., Troche C., Licht J.D.* // *Cold Spring Harb. Perspect. Med*. 2017. V. 7. P. a026708. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026708>
4. *Niktoreh N., Walter C., Zimmermann M., von Neuhoff C., von Neuhoff N., Rasche M., Waack K., Creutzig U., Hanenberg H., Reinhardt D.* // *J. Oncol*. 2019. V. 2019. P. 1609128. <https://doi.org/10.1155/2019/1609128>
5. *Nebral K., König M., Schmidt H.H., Lutz D., Sperr W.R., Kalwak K., Brugger S., Dworzak M.N., Haas O.A., Strehl S.* // *Haematologica*. 2005. V. 90. P. 746–752. <https://doi.org/10.3324/haematol.2005.90.7.746>
6. *Gryadunov D.A., Shaskolskiy B.L., Nasedkina T.V., Rubina A.Y., Zasedatelev A.S.* // *Acta Naturae*. 2018. V. 10. P. 4–18. <https://doi.org/10.32607/20758251-2018-10-4-4-18>
7. *Kivioja J.L., Thanasopoulou A., Kumar A., Kontro M., Yadav B., Majumder M.M., Javarappa K.K., Eldfors S., Schwaller J., Porkka K., Heckman C.A.* // *Leukemia*. 2019. V. 33. P. 1360–1372. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0327-2>
8. *Наседкина Т.В., Иконникова А.Ю., Цаур Г.А., Каратеева А.В., Аммуру Ю.И., Авдоница М.А., Карачунский А.И., Заседателев А.С.* // *Мол. биология*. 2016. Т. 50. С. 968–977. <https://doi.org/10.7868/S0026898416060148>

Detection of Chimeric Transcript *NUP98-NSD1* in Pediatric Acute Myeloid Leukemia

A. A. Bessonova*, L. G. Ghukasyan*, L. V. Baidun**, A. V. Chudinov*, and T. V. Nasedkina*, #

#Phone: +7 (495) 135-98-46; e-mail: nased@biochip.ru

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

**Russian Children's Clinical Hospital, Leninsky prosp. 117, Moscow, 119117 Russia

The method for identification of chimeric transcript *NUP98-NSD1* in acute myeloid leukemia in children has been developed and optimized based on combination of reverse transcription-polymerase chain reaction and allele-specific hybridization on biological microchip.

Keywords: acute myeloid leukemia, chimeric gene NUP98-NSD1, biochip, diagnostics



УДК 547.782

КОНФОРМАЦИОННО-ФИКСИРОВАННЫЙ 5-БЕНЗИЛИДЕН-4Н-ИМИДАЗОЛТИОН КАК ФЛУОРОГЕННЫЙ КРАСИТЕЛЬ

© 2021 г. И. Н. Мяснянко*, **, М. А. Сычева*, А. С. Гавриков*,
Н. С. Балеева*, **, #, М. С. Баранов*, **

*ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

**Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова,
Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Поступила в редакцию 22.03.2021 г.

После доработки 10.04.2021 г.

Принята к публикации 12.04.2021 г.

Синтезирован конформационно-фиксированный 5-(4-(диэтиламино)бензилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-тион. Установлено, что производное хромофоров флуоресцентных белков, содержащее серу вместо кислорода в имидазолоновом фрагменте, характеризуется смещенными в длинноволновую область спектра поглощением и испусканием и более высоким коэффициентом экстинкции в сравнении с соответствующим производным, содержащим атом кислорода. Показано, что данное соединение может быть использовано во флуоресцентной микроскопии в качестве флуорогенного красителя для флуороген-активирующих белков на основе липокалина.

Ключевые слова: GFP, хромофоры, флуорогенные красители, флуоресценция

DOI: 10.31857/S0132342321060208

ВВЕДЕНИЕ

Производные хромофоров флуоресцентных белков – перспективная основа для разработки систем флуоресцентного мечения. Удобные методы синтеза и модификаций позволяют получать вещества с самой разной окраской и разными оптическими свойствами. Такие соединения могут быть использованы для визуализации в качестве флуорогенных лигандов для РНК и белков [1–3], а также для окрашивания отдельных клеточных органелл [4, 5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что конформационно-фиксированный аминный аналог хромофора GFP (соединение **(I)**, схема 1) может быть использован в качестве флуорогенного красителя для некоторых мутантных форм белка B1c семейства липокалинов [6]. Позднее мы также синтезировали ряд аналогов этого соединения, характеризующихся смещенными в длинноволновую область спектра поглощением и испусканием [7]. Разработка таких красителей – важная задача,

т.к. поглощение света биологическими объектами в области 700–900 нм минимально. Настоящая работа – продолжение этого исследования. Известно, что введение в молекулу красителя атомов серы может привести к смещению спектральных максимумов в длинноволновую область [8, 9]. Мы исследовали эффективность такой модификации на примере аминопроизводного хромофора GFP (**(I)**). С помощью известного тионирующего реагента Лавессона мы синтезировали тиопроизводное (**(II)**) (схема 1).

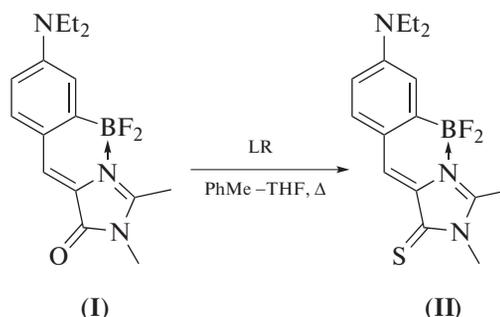


Схема 1. Схема синтеза производного (**(II)**). LR – реагент Лавессона (Lawesson's Reagent), PhMe – толуол, THF – тетрагидрофуран.

Исследование оптических свойств полученного соединения (**(II)**) и сравнение их со свойствами предшественника (**(I)**) показало, что замена кисло-

Сокращения: GFP – зеленый флуоресцирующий белок (Green Fluorescent Protein).

Автор для связи: (тел.: +7 (926) 704-13-72; эл. почта: nsbaleeva@gmail.com).

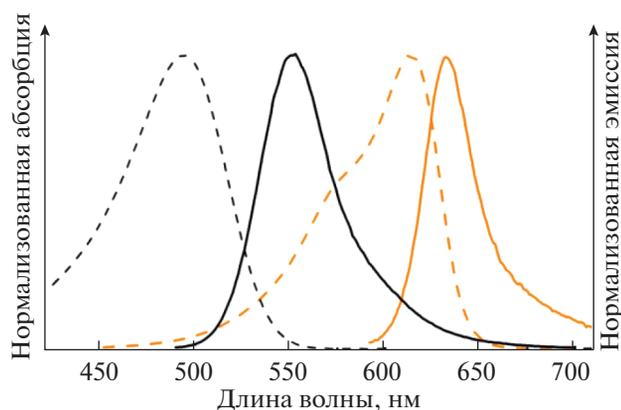


Рис. 1. Спектры абсорбции (пунктир) и эмиссии (сплошная) соединений (I) (черный) и (II) (оранжевый) в ацетонитриле.

рода на серу привела к заметным изменениям. Наблюдается батохромный сдвиг спектральных максимумов на 80–120 нм (рис. 1). Величина квантового выхода флуоресценции соединения (II) варьирует в диапазоне ~10–20% и в меньшей степени зависит от используемого растворителя (табл. 1). Также было обнаружено двух-трехкратное увеличение коэффициента экстинкции (табл. 1).

На следующем этапе работы мы продемонстрировали, что новое тиопроизводное (II) может быть использовано как лиганд для мутанта B1c-A36C/L141N (названного ранее DiB1) [7] для окрашивания живых клеток линии HeLa Kyoto, трансфицированных конструкцией H2B-TagBFP-DiB1. Использование такой конструкции позволило не только оценить возможность применения соединения (II) в качестве флуорогена белка DiB1, но и исследовать селективность окрашивания этой метки. Так, при добавлении тиопроизводного (II) в

клеточную среду наблюдалось появление флуоресцентного сигнала в красном канале (от пары DiB1–соединение (II)), который полностью соответствовал сигналу в синем канале (от белка BFP) (рис. 2), что говорит о селективности окрашивания предложенной нами пары белок–флуороген и отсутствии нецелевого окрашивания.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование. Спектры ЯМР (δ , м.д.; J , Гц) регистрировали на приборе Fourier 300 (300 МГц; Bruker, США) при 303 К в $CDCl_3$ (внутренний стандарт – Me_4Si), спектры поглощения – на спектрофотометре Cary 100 Bio (Varian, США), спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США). Температуры плавления определяли на приборе SMP 30 (Stuart Scientific, Великобритания) и не исправляли. Масс-спектры высокого разрешения записывали на приборе micrOTOF II (Bruker, США), ионизация электрораспылением.

Синтез. Соединение (*Z*)-5-(4-(диэтиламино)-2-(дифторборанил)бензилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он (I) синтезировали согласно описанной ранее методике [10].

(*Z*)-5-(4-(Диэтиламино)-2-(дифторборанил)бензилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-тион (II). К раствору соединения (I) (150 мг, 0.5 ммоль) в 8 мл смеси толуол–тетрагидрофуран (1 : 1) добавляли 2,4-бис(4-метоксибензил)-1,3,2,4-дифосфетан-2,4-дисульфид (реагент Лавессона) (405 мг, 1 ммоль) и кипятили в течение 10 мин. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и упаривали на ротационном испарителе. Полученный продукт дополнительно очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент хлористый метилен–эта-

Таблица 1. Оптические свойства соединений (I) и (II) в разных растворителях

Растворитель	Соединение	Максимум абсорбции, нм	Коэффициент экстинкции, $M^{-1} cm^{-1}$	Максимум эмиссии, нм	Квантовый выход флуоресценции, %
Вода	(I)	520	54000	563	3
	(II)	611	98000	627	9
Метанол	(I)	505	48000	557	22
	(II)	613	137000	630	8
Ацетонитрил	(I)	494	46000	554	31
	(II)	614	114000	632	10
Этилацетат	(I)	492	47000	538	63
	(II)	609	105000	631	16
Диоксан	(I)	497	51000	538	72
	(II)	610	98000	630	23

Примечание: данные для соединения (I) взяты из статьи Varanov et al. [10].

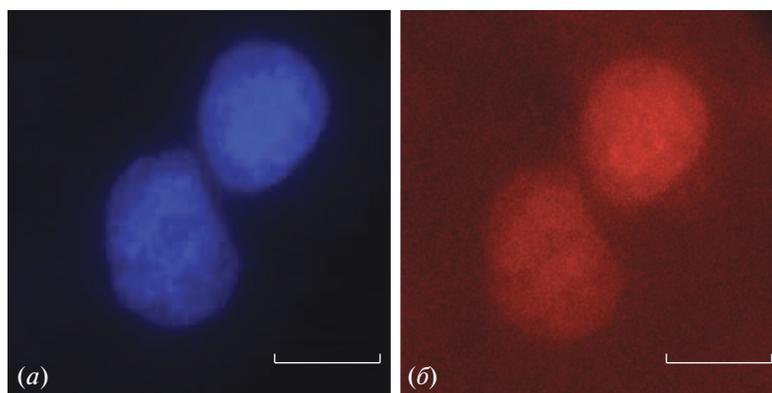


Рис. 2. Флуоресцентная микроскопия живых клеток HeLa Kyoto, временно трансфицированных конструкцией, кодирующей H2B-TagBFP-DiB1, в синем (а) и красном (б) каналах. Конечная концентрация соединения (II) в растворе – 5 мкМ. Масштабный отрезок – 10 мкм.

нол, 97 : 3). Фиолетовый порошок (85 мг, 50%); т. пл. ~ 250°C с разложением; ^1H -ЯМР: 7.78 (с, 1 H), 7.43 (д, J_2 8.9, 1 H), 7.13 (с, 1 H), 6.63 (дд, J_2 8.9, 2.7, 1 H), 3.62 (с, 3 H), 3.56 (кв, J_2 7.0, 4 H), 2.83 (с, 3 H), 1.29 (т, J_2 7.0, 6 H); ^{13}C -ЯМР: 177.2, 156.3, 153.1, 137.9, 135.3, 134.4, 124.1, 115.6, 111.9, 45.2, 30.3, 29.7, 12.8; HRMS (ESI) m/z : найдено M 316.1478; рассчитано для $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{BFN}_3\text{S}^+$, $[M]^+$ 316.1450.

Флуоресцентная микроскопия. Клеточную линию HeLa Kyoto выращивали в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с 50 ед./мл пеницилина, 50 мг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия), 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия) и 10% бычьего сывороточного альбумина (HyClone, Thermo Scientific, США) при 37°C и 5% CO_2 . Для временной трансфекции конструкцией H2B-TagBFP-DiB1 использовали трансфекционный агент FuGENE 6 (Promega, США). Непосредственно перед съемкой среду DMEM заменяли на раствор Хэнкса (ПанЭко, Россия) с 20 мМ HEPES (Sigma, США).

Широкопольную флуоресцентную микроскопию проводили с помощью микроскопа Leica 6000 (Leica, Германия) с объективом HCX PL APO 100×/1.40-0.70NA. Микроскоп оснащен камерой Zyla sCMOS (Andor, Oxford Instruments, Великобритания) и источником света CoolLED pE-300. При съемке использовали фильтры BFP и mCherry. Концентрация флуорогена в среде составляла 5 мкМ, мощность облучения – 2 В/см² в синем канале (фильтр BFP) и 3.4 В/см² в красном канале (фильтр mCherry).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

5-Бензилиден-4Н-имидазолтионы – высокоперспективная основа для создания флуорогенных красителей, характеризующаяся смещенными в длинноволновую область спектра поглоще-

нием и испусканием. Такие соединения могут быть использованы в качестве лигандов флуороген-активирующих белков для окрашивания живых клеток во флуоресцентной микроскопии.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-73-10105).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Paige J.S., Wu K.Y., Jaffrey S.R. // *Science*. 2011. V. 333. P. 642–646. <https://doi.org/10.1126/science.1207339>
2. Filonov G.S., Moon J.D., Svensen N., Jaffrey S.R. // *J. Am. Chem. Soc.* 2014. V. 136. P. 16299–16308. <https://doi.org/10.1021/ja508478x>
3. Myasnyanko I.N., Gavrikov A.S., Zaitseva S.O., Smirnov A.Yu., Zaitseva E.R., Sokolov A.I., Malyshchinskaya K.K., Baleeva N.S., Mishin A.S., Baranov M.S. // *Chem. Eur. J.* 2020. V. 27. P. 3986–3990. <https://doi.org/10.1002/chem.202004760>
4. Li X., Zhao R., Wang Y., Huang C. // *J. Mater. Chem. B*. 2018. V. 6. P. 6592–6598. <https://doi.org/10.1039/C8TB01885E>
5. Ermakova Y.G., Bogdanova Y.A., Baleeva N.S., Zaitseva S.O., Guglya E.B., Smirnov A.Yu., Zagudaylova M.B.,

- Baranov M.S.* // *Dyes Pigm.* 2019. V. 170. P. 107550.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107550>
6. *Bozhanova N.G., Baranov M.S., Klementieva N.V., Sarkisyan K.S., Gavrikov A.S., Yampolsky I.V., Zagaynova E.V., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A., Mishin A.S.* // *Chem. Sci.* 2017. V. 8. P. 7138–7142.
<https://doi.org/10.1039/C7SC01628J>
7. *Bozhanova N.G., Baranov M.S., Baleeva N.S., Gavrikov A.S., Mishin A.S.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. P. 3778.
<https://doi.org/10.3390/ijms19123778>
8. *Ohulchansky T.Y., Donnelly D.J., Detty M.R., Prasad P.N.* // *J. Phys. Chem. B.* 2004. V. 108. P. 8668–8672.
<https://doi.org/10.1021/jp0370674>
9. *Grimm J.B., Tkachuk A.N., Xie L., Choi H., Mohar B., Falco N., Schaefer K., Patel R., Zheng Qi., Liu Z., Lippincott-Schwartz J., Brown T.A., Lavis L.D.* // *Nat. Methods.* 2020. V. 17. P. 815–821.
<https://doi.org/10.1038/s41592-020-0909-6>
10. *Baranov M.S., Solntsev K.M., Baleeva N.S., Mishin A.S., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A., Yampolsky I.V.* // *Chem. Eur. J.* 2014. V. 20. P. 13234–13241.
<https://doi.org/10.1002/chem.201403678>

Conformationally Locked 5-Benzylidene-4*H*-Imidazolthion as Fluorogenic Dye

I. N. Myasnyanko^{*, **}, M. A. Sycheva^{*}, A. S. Gavrikov^{*}, N. S. Baleeva^{*, **, #}, and M. S. Baranov^{*, **}

[#]Phone: +7 (926) 704-13-72; e-mail: nsbaleeva@gmail.com

^{*}Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^{**}Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovitianova 1, Moscow, 117997 Russia

We report novel conformationally locked 5-(4-(diethylamino)benzylidene)-2,3-dimethyl-3,5-dihydro-4*H*-imidazole-4-thion. Derivatives of conformationally locked chromophores of the fluorescent protein containing sulfur instead of oxygen in the imidazolone fragment are characterized by red-shifted spectra and higher extinction coefficient relative to the corresponding derivative containing an oxygen atom. That compound can be used as fluorogenic dyes for lipocalin-based fluorogen-activating proteins in fluorescent microscopy.

Keywords: GFP, chromophores, fluorogenic dyes, fluorescence