

СОДЕРЖАНИЕ

Том 48, номер 4, 2022

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.

АТР-зависимые Lon-протеазы в системе контроля качества клеточных белков (обзорная статья)

А. М. Куджаев, А. Г. Андрианова, А. Е. Гущина, И. В. Смирнов, Т. В. Ротанова 381

Флуоресцентные зонды для обнаружения хлорноватистой кислоты в живых клетках (обзорная статья)

В. Е. Реут, И. В. Горудко, Д. В. Григорьева, А. В. Соколов, О. М. Панасенко 415

Влияние состава липидной матрицы на микроокружение левофлоксацина в липосомальных формах

И. М. Ле-Дейген, А. С. Сафронова, И. М. Колмогоров, А. А. Скуредина, Е. В. Кудряшова 442

Влияние липидных компонентов на иммуногенность синтетического фрагмента антигена NS4A вируса гепатита С

А. Н. Белявцев, Н. С. Шастина, В. В. Куприянов, Л. И. Николаева, М. В. Мельникова, Е. Ф. Колесанова, М. Ю. Шимчишина, И. В. Капустин 453

Биологически активный фрагмент рецептора конечных продуктов гликирования (RAGE) способен ингибировать олигомеризацию бета-амилоида

Т. Д. Волкова, А. В. Аветисян, Д. О. Короев, А. В. Камынина, С. М. Баласанянц, Р. А. Симонян, О. М. Вольпина 461

Окислительная модификация и протеолиз белков печени садковой радужной форели при воздействии средовых факторов

Н. П. Канцерова, Е. Д. Тушина, И. В. Суховская, Л. А. Лысенко 470

Нитроазолопиримидины: влияние на аденозиновый рецептор A1 и внутриглазное давление у крыс

К. В. Саватеев, В. Л. Русинов, С. К. Котовская, А. А. Спасов, Л. В. Науменко, А. С. Таран, А. А. Бригадирова, Д. С. Яковлев, К. Т. Султанова, Н. М. Щербакова 479

Новые гибридные молекулы на основе серосодержащих никотинонитрилов: синтез, анальгетическая активность *in vivo* в тесте уксуснокислых корчей и молекулярный докинг

Д. С. Кривоколыско, В. В. Доценко, Е. Ю. Бибик, А. А. Самокиш, Ю. С. Венедиктова, К. А. Фролов, С. Г. Кривоколыско, А. А. Панков, Н. А. Аксенов, И. В. Аксенова 486

ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

Цианиновые красители в качестве флуорогенов для белков FAST и nanoFAST

А. А. Хрулев, Н. С. Балеева, П. Н. Камзеева, М. С. Баранов, А. В. Аралов 495

Циркулярные пермутанты белка BrUSLEE как флуоресцентные индикаторы pH

А. В. Мамонтова, Т. Р. Симонян, К. А. Лукьянов, А. М. Богданов 500



УДК 577.151.3;577.152.34

АТР-ЗАВИСИМЫЕ Lon-ПРОТЕАЗЫ В СИСТЕМЕ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА КЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ

© 2022 г. А. М. Куджаев*, А. Г. Андрианова*, А. Е. Гушина**, И. В. Смирнов*, Т. В. Ротанова*.*

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

**Protein Structure Section, Center for Structural Biology, National Cancer Institute, Frederick, MD 21702, USA

Поступила в редакцию 09.11.2021 г.

После доработки 19.11.2021 г.

Принята к публикации 24.11.2021 г.

Система контроля качества белков (СКК) играет ведущую роль в поддержании сохранности клеточного протеома во всех природных царствах. В обзоре обобщены сведения о строении и структурных особенностях молекулярных шаперонов и энергозависимых протеаз, формирующих СКК, показана важная роль белков, принадлежащих к AAA⁺-суперсемейству, дана развернутая характеристика АТР-зависимых Lon-протеаз как особого семейства в СКК, обсуждены различия между ферментами отдельных подсемейств Lon-протеаз, приведены современные данные о структуре и уникальных механизмах функционирования AAA⁺-белков — представителей СКК.

Ключевые слова: контроль качества клеточного протеома, AAA⁺-белки, молекулярные шапероны, АТР-зависимый протеолиз, Lon-протеазы, 3D-структура, крио-ЭМ

DOI: 10.31857/S0132342322040133

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	381
Система контроля качества белков в клетках бактерий и эукариот.....	382
Молекулярные шапероны системы контроля качества белков.....	382
Внутриклеточные АТР-зависимые протеазы и мультисубъединичные протеолитические комплексы.....	387
Lon-протеазы как особое семейство в системе контроля качества клеточных белков.....	395
Общая характеристика семейства Lon. Подсемейства Lon-протеаз.....	395
LonA-протеазы — уникальный подкласс AAA ⁺ -белков.....	396
Современные представления о структурных особенностях и механизмах функционирования LonA-протеаз и других AAA ⁺ -белков системы контроля качества.....	401
Спиральная организация гексамеров AAA ⁺ -белков — базовое условие транслокации белковых мишеней/субстратов.....	401

Крио-ЭМ-структуры EcLon и других LonA-протеаз.....	403
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	408
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	409

ВВЕДЕНИЕ

Поддержание гомеостаза клеточных белков имеет первостепенное значение для роста и выживания клеток. Существование внутриклеточных белков в нативном состоянии — необходимое условие для выполнения клеткой самых разнообразных функций. Однако вследствие возможных ошибок в транскрипции и трансляции, мутаций генома и различных стрессовых воздействий в клетках накапливаются поврежденные и мутантные белки, а также белки с нарушенной структурой, которые не только утрачивают функции, свойственные нативным белкам, но и могут формировать токсичные для клетки неупорядоченные агрегаты. Известно также, что до 30% вновь синтезированных белков никогда не достигают нативного состояния, что создает серьезную угрозу функционированию и жизнеспособности клеток. Кроме того, нарушение сворачивания (фолдинга) клеточных белков и их агрегация — основные причины развития как возрастных дегенеративных заболеваний, так и различных других патологий.

Сокращения: СКК — система контроля качества; крио-ЭМ — криоэлектронная микроскопия; АТР-γ-S — аденозин-5'-[γ-тио]трифосфат; СС — конформация coiled-coil.

* Автор для связи: (тел.: +7 (495) 335-42-22; эл. почта: tatiana.rotanova@ibch.ru).

Для преодоления нарушений протеостаза в клетках сформировались мощные сети системы контроля качества (СКК) белков, которая играет ведущую роль в поддержании сохранности клеточного протеома во всех природных царствах. Семейство АТР-зависимых Lon-протеаз – один из ключевых участников СКК.

белков с нарушенной структурой и их последующий рефолдинг, а также осуществляют выборочное удаление из клетки избыточных и поврежденных белков путем их деградации энергозависимыми протеазами (в бактериях, а также в митохондриях и хлоропластах эукариот) или мультикомпонентной убиквитин-протеасомной системой (в цитозоле эукариот) [4–7].

СИСТЕМА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА БЕЛКОВ В КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ И ЭУКАРИОТ

Система контроля качества внутриклеточных белков состоит из молекулярных шаперонов и энергозависимых протеаз (рис. 1) [1–3]. Компоненты СКК контролируют сворачивание вновь синтезированных полипептидов и их сборку в функциональные комплексы, обеспечивают распознавание и высокоэффективное связывание

Молекулярные шапероны системы контроля качества белков

Сообщество молекулярных шаперонов СКК [2, 8, 9] наряду с триггер-фактором (ТФ, 48 кДа), связанным с рибосомой и участвующим в ко-трансляционном сворачивании новосинтезированных белков [10], включает целый ряд семейств белков теплового шока (Heat shock proteins, Hsps), различающихся молекулярными массами (от 12–

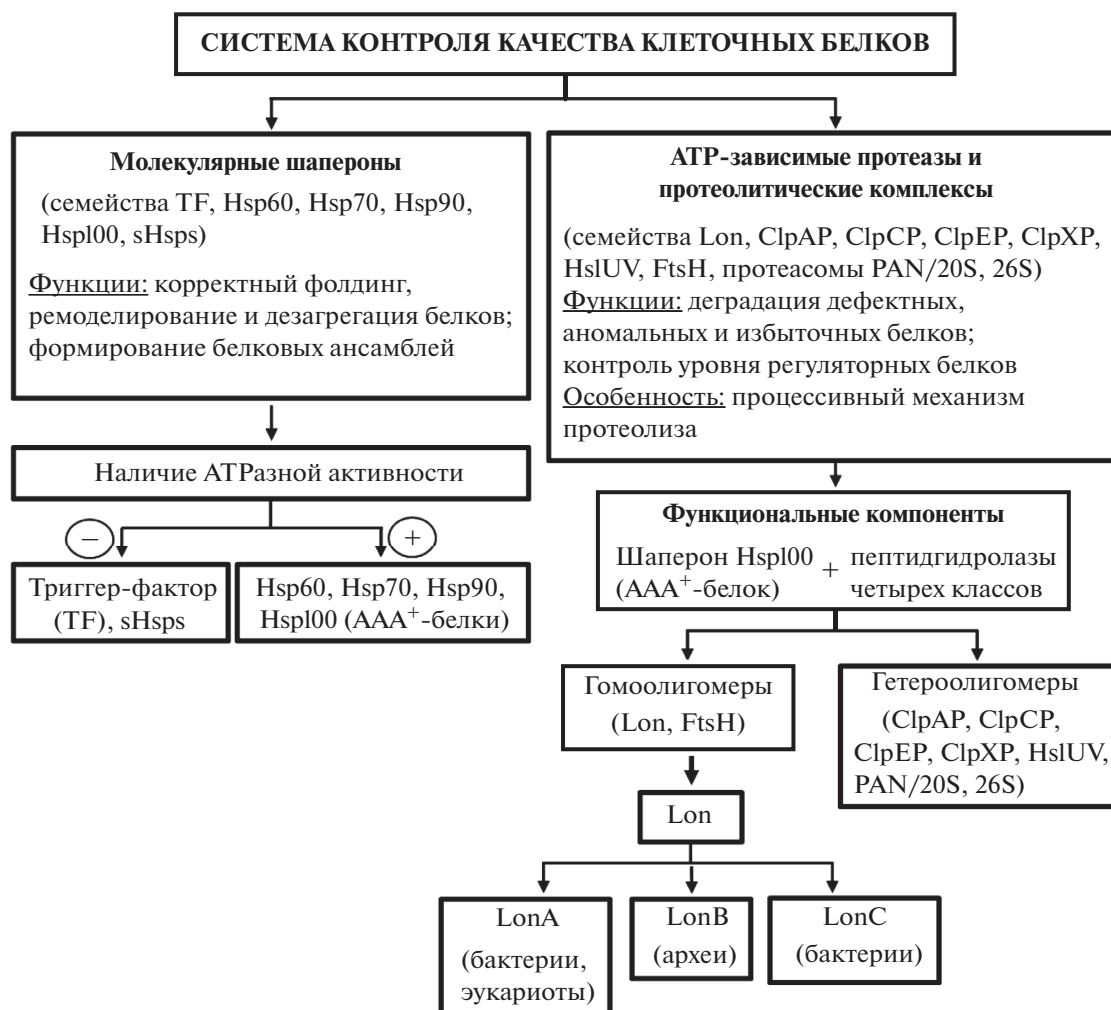


Рис. 1. Компоненты системы контроля качества клеточных белков.

43 кДа у sHsps (small Hsps, малые белки теплового шока) до 100 кДа у белков семейства Hsp100) (рис. 1) [2, 9, 11–15]. При этом белки Hsp60, Hsp70, Hsp90 и Hsp100 (табл. 1) обладают АТФ-зависимой активностью, что определяет динамический характер их существования и обеспечивает высокую конформационную гибкость. Условно молекулярные шапероны разделяются на группы фолдеров, холдеров и анфолдеров [16]. Фолдеры (семейства Hsp60, Hsp70 и Hsp90) участвуют в сворачивании белковых мишеней, предотвращая нежелательные взаимодействия между белками, еще не достигшими нативного состояния; холдеры (sHsps) удерживают частично фолдированные мишени, не влияя на их конформацию; анфолдеры (Hsp100), обладающие транслоказной активностью, разворачивают белковые субстраты [9, 16]. Для большинства семейств шаперонов получены данные рентгеноструктурного анализа их представителей [17].

Высококонсервативное семейство шаперонов Hsp70, участвующее в большом количестве разнообразных биологических процессов, сформировано, главным образом, каноническими белками DnaK у бактерий и подобными им белками Hsp70 у эукариот [12, 18]. Сверх того, эукариоты содержат также ряд неканонических шаперонов Hsp70, таких как белки Grp78, Grp170 и Hsp110 [19]. Представители семейства локализованы как в цитозоле, так и в различных органеллах (мито-

хондрии, эндоплазматический ретикулум, хлоропласты) [12, 18].

В физиологических условиях шапероны Hsp70 способствуют фолдингу белковых мишеней, а при стрессе они предотвращают агрегацию развернутых белков и, кроме того, совместно с шаперонами семейства Hsp100 проводят сольюбилизацию и рефолдинг агрегированных белков [20]. В структуре Hsp70 различают три домена: N-концевой АТФ-зависимый, центральный субстрат-связывающий и вариабельный C-концевой, который участвует как в связывании мишеней, так и во взаимодействии с различными партнерскими белками и модулировании шапероновой функции [9, 18].

Функционирование Hsp70 основано на изменении сродства шаперона к белковым мишеням в зависимости от природы связанного нуклеотида — АТФ-форма Hsp70 проявляет пониженную по сравнению с ADP-формой аффинность к белкам. Регуляторами АТФ-зависимой и шапероновой активностей Hsp70 служат кошапероны группы Hsp40/J-домен-содержащих белков и факторы нуклеотидного обмена (NEF) (табл. 1) [9, 21]. Связывание белков-мишеней с шапероном опосредуется предварительным образованием комплексов субстрат–кошаперон с участием C-концевого домена Hsp40, после чего комплекс доставляется к Hsp70. Взаимодействие АТФ-зависимого домена шаперона с N-концевым J-доменом Hsp40 стимулирует гидролиз связанного

Таблица 1. Системы АТФ-зависимых шаперонов СКК (по данным работы Saibil [13])

Шапероны	Кофакторы	Основные функции
Система Hsp60 (шаперонины)		
GroEL (<i>Escherichia coli</i>), HSP60/CPN60, CCT (млекопитающие), thermosome (археи)	GroES, HSP10/CPN10, prefoldin	Фолдинг и предотвращение агрегации белков
Система Hsp70		
DnaK (<i>E. coli</i>), HSP70, Ssa, Ssb (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>), BiP/GRP78 (млекопитающие, растения)	DnaJ, GrpE, NEF, HSP40, Sis1, Hdj1, Hsp110, Grp170, Sil1	Разворачивание, дезагрегация и фолдинг белков, стабилизация полипептидов, регуляция ответа на тепловой шок, отбор субстратов для деградации
Система Hsp90		
Hsp70 (<i>E. coli</i>), GRP94, TRAP1 (эукариоты), Hsc82, Hsp82 (дрожжи)	HOP, p50, ANA1, AIP, FKBP52, p23, UNC45	Связывание, стабилизация и созревание стероидных рецепторов и протеинкиназ, регуляция отбора и превращений субстратов, сборка миозина
Система Hsp100 (AAA ⁺ -белки)		
ClpA, ClpB, ClpC, ClpE, ClpX, HslU (бактерии, эукариоты), PAN (археи), p97, Hsp104, Hsp101, Hsp78, RPT1–RPT6 (эукариоты)	DnaK/HSP70, ClpS	Разворачивание и ремоделирование белков, термотолерантность, сольюбилизация белковых агрегатов

АТР, а действие фактора NEF ускоряет последующие стадии высвобождения нуклеотида (в ADP-форме) и связывания новой молекулы АТР, сопровождающиеся диссоциацией белкового субстрата.

В недавних исследованиях установлено, что и эукариотические шапероны Hsp70, и бактериальные DnaK существуют не только в мономерной форме, но и как димеры, тримеры и более высокие олигомеры. На равновесие в таких смесях влияет присутствие нуклеотида и его природа (АТР или ADP) [22].

Шапероны Hsp60 или шаперонины оказались первым идентифицированным семейством шаперонов, для которого была выявлена важная роль в биогенезе клеточных белков и которое широко распространено в бактериях и в митохондриях, пластах и цитоплазме эукариот (табл. 1) [12, 18]. Функциональными структурами шаперонинов служат тетрадекамеры, образованные двумя гептамерными кольцами, в каждом из которых сформирована центральная полость. Эти структуры способны в своих противоположных полостях попеременно связывать и инкапсулировать белки, подлежащие рефолдингу [9].

Наиболее изученный представитель семейства Hsp60 – шаперонин GroEL из *Escherichia coli*, функционирующий в комплексе с кошаперонином GroES – белком теплового шока семейства Hsp10 (табл. 1) [9, 12, 18, 23, 24]. Момеры GroEL построены из трех доменов: апикального (Ap), шарнирного промежуточного (Hinge) и С-концевого экваториального (Eq), несущего АТР-разный центр [23–25]. Кольцевые гептамеры GroEL, состыкованные своими Eq-доменами, образуют зеркально симметричные тороиды с двумя изолированными гидрофобными полостями, способными в АТР-связанном состоянии размещать развернутые полипептиды размером до 60 кДа [9, 12]. Кошаперонины GroES, которые также образуют циклические куполообразные гептамеры, поочередно прикрывают торцы тороида GroEL, взаимодействуя с его входными отверстиями, сформированными Ap-доменами. Эти превращения в сопряжении с гидролизом АТР вызывают значительные конформационные изменения шаперонина, которые приводят к увеличению размеров и гидрофиллизации полости, содержащей инкапсулированный субстрат, а это способствует фолдингу мишени, последующему ее высвобождению вместе с ADP и кошаперонином из комплекса с GroEL и началу нового цикла рефолдинга белкового субстрата [9, 12].

Следует отметить, что при фолдинге крупных субстратов, в том числе мультидоменных белковых мишеней, инкапсулирование которых в полость комплекса GroEL/GroES невозможно, реализуется альтернативный механизм, согласно которо-

му связывание определенного фрагмента белка-мишени и кошаперонина GroES происходит на противоположных кольцах тетрадекамера GroEL [9, 26].

Шапероны Hsp90 присутствуют в высоких концентрациях в бактериях и эукариотах и не обнаруживаются в археях. У бактерий обычно выявляется единственный Hsp90-шаперон, в то время как эукариоты содержат по два шаперона в цитозоле, и, кроме того, белки Hsp90 локализованы в митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме и в хлоропластах [27–29]. Эукариотические шапероны Hsp90 функционируют в составе комплексных систем, включающих как другие шапероны (в частности, Hsp70), так и сеть разнообразных кошаперонов (табл. 1) [9, 12, 27–30]. Семейство Hsp90 вовлечено в процессы созревания ключевых сигнальных белков, а также участвует в сборке и разборке различных белковых комплексов. Белками-клиентами для Hsp90 служат различные протеинкиназы, факторы транскрипции, рецепторы стероидных гормонов и др. Интересно, что бактериальные шапероны Hsp90 не имеют собственных кошаперонов, и их ремоделирующая функция обеспечивается исключительно путем взаимодействия с системой шаперона Hsp70 [31].

По структурной организации Hsp90 – это гомодимеры, протомеры которых включают N-концевой нуклеотид-связывающий (N) и центральный (M) домены, формирующие АТР-разный модуль, а также С-концевой домен, ответственный за димеризацию шаперона [28, 29]. Частично развернутые клиентские белки зачастую доставляются к Hsp90 посредством системы шаперона Hsp70 и связываются с М- и С-доменами Hsp90. Регуляция функциональной активности Hsp90-белков эукариот осуществляется с помощью набора кошаперонов, которые в определенном порядке связываются с разными доменами шаперона, включая специфический С-концевой мотив MEEVD, отсутствующий у бактериальных Hsp90. Апо-форма Hsp90, представляющая собой “раскрытый” V-образный димер, образует сложный комплекс с белком-клиентом и необходимыми кошаперонами. Взаимодействие этого комплекса с АТР приводит к возникновению контактов между N-доменами с образованием “закрытой” формы шаперона и к ремоделированию связанной на его поверхности белковой мишени. В результате гидролиза АТР происходит диссоциация N-доменов с образованием ADP-связанного “полуоткрытого” V-димера, из которого высвобождаются белок-клиент, ADP и неорганический фосфат, а Hsp90 вновь принимает открытую конформацию [28, 29]. Следует отметить, что для достижения нативного состояния освобожденный субстрат обычно нуждается в дополнительных стадиях рефолдинга [12, 28].

В то время как рассмотренные выше семейства Hsp60, Hsp70 и Hsp90 составляют группу шаперонов-фолдеров, малые белки теплового шока (sHsps) выполняют роль холдеров в системе контроля качества клеточных белков. Шапероны sHsps образуют прочные долгоживущие комплексы с широким набором клеточных белков в их ненативных конформациях и тем самым предотвращают агрегацию субстратов [32–35]. Белки sHsps представляют собой наиболее распространенное, но низкоконсервативное семейство шаперонов. Их общим отличительным признаком служит наличие в центральной части последовательности домена размером ~100 а.о. со структурой α -кристаллина хрусталика глаза млекопитающих, который фланкирован неструктурированными N- и C-концевыми фрагментами протяженностью 24–247 а.о. и <20 а.о. соответственно [9, 12, 32–36].

Характерная особенность sHsp-шаперонов – полидисперсность их четвертичных структур, что отражается в формировании ансамблей из крупных олигомеров с изменяющимся числом субъединиц. В частности, в клетках человека олигомеры могут включать 12–32 субъединицы sHsp-шаперона [36], а в клетках растений – до 40 [37]. Такие олигомеры часто имеют консервативную структурную организацию в виде сферического или дискообразного комплекса с пронизывающим его центральным каналом [33–36].

В противоположность другим семействам шаперонов, каждый олигомер sHsp способен удерживать по несколько молекул белковых мишеней, высвобождение которых из комплексов с sHsps происходит в кооперации с АТФ-зависимыми шаперонами. На этом основании sHsp-белки рассматриваются в качестве “резервуаров” ненативных белков, сохраняющих их для последующего рефолдинга с помощью других семейств шаперонов, в частности системы шаперона Hsp70 [9, 12, 33–35].

В то же время следует заметить, что несмотря на значительный прогресс в понимании механизмов функционирования sHsp-шаперонов, достигнутый за последнее время, вопросы их специфичности, связанные с разнообразием последовательностей и структур шаперонов, остаются малоизученными и требуют дальнейшего исследования.

Семейство Hsp100/Clp, вовлеченное во множество важнейших клеточных процессов (в том числе в мембранный транспорт, регуляцию цитоскелета, биогенез органелл, инициацию репликации ДНК и активацию транскрипции), занимает особое место в системе контроля качества клеточных белков. Шапероны Hsp100 представляют группу “анфолдеров”, которые, с одной стороны, осуществляют разворачивание белковых мишеней перед последующими стадиями фол-

динга, а с другой – служат АТФ-зависимыми компонентами всех протеаз и мультисубъединичных комплексов СКК, деградирующих белки-субстраты. Эти шапероны принадлежат к широко распространенному суперсемейству AAA⁺-белков (АТФаз, ассоциированных с различными клеточными активностями) (рис. 1), которые функционируют как кольцевые гексамерные структуры, использующие энергию гидролиза АТФ для ремоделирования своих белковых мишеней [38–41]. Hsp100-семейство в бактериях представлено белками ClpA, ClpB, ClpC, ClpE, ClpX, ClpY (HslU) и некоторыми другими (в частности, АТФ-зависимыми составляющими Lon- и FtsH-протеаз) (табл. 1) [2, 9, 12, 41]. У эукариот подобные белки, относящиеся к семействам Hsp104, Hsp101 и Hsp78, встречаются в митохондриях клеток млекопитающих, а также в растениях и дрожжах [12, 42, 43].

По количеству АТФ-зависимых составляющих представители семейства Hsp100 делятся на два класса: к классу I относятся белки, включающие два так называемых AAA⁺-модуля (D1 и D2, рис. 2), а к классу II – белки, содержащие только один такой модуль D (рис. 2) [9, 41]. Кроме АТФ-зависимых модулей AAA⁺-белки содержат также структурно независимые вспомогательные домены (экстрадомены), которые либо расположены перед AAA⁺-модулями (N-концевые (N) и Zn-связывающие (ZBD) домены), либо локализованы внутри AAA⁺-модулей (инсерционные (I) домены) (рис. 2) [9, 41]. Представленные на рис. 2 белки Hsp104, ClpB и Hsp78 функционируют исключительно как шапероны, в то время как белки ClpA, ClpC, ClpE, ClpX и HslU в комплексах с протеолитическими составляющими (белками ClpP или HslV, см. ниже) осуществляют селективную деградацию внутриклеточных белков. Шапероны Hsp104 отличаются от других представителей семейства наличием небольшого C-концевого домена (рис. 2), участвующего в формировании функционально активной структуры шаперона и во взаимодействии с белками-субстратами [44, 45].

Ремоделирование белков-мишеней шаперонами Hsp100/Clp включает ряд последовательных стадий. Отбор субстратов происходит путем взаимодействия шаперонов с неструктурированными участками мишеней, содержащими специфические мотивы узнавания (дегроны), причем в некоторых случаях связывание субстратов опосредуется участием дополнительных адаптерных белков [41]. Связывание нуклеотидов способствует стабилизации бочкообразной гексамерной структуры шаперона, а разворачивание мишеней осуществляется путем их “принудительного” перемещения (транслокационная активность шаперона) через центральный канал гексамера Hsp100/Clp за счет энергии гидролиза АТФ. На следующей стадии развернутые белки высвобож-

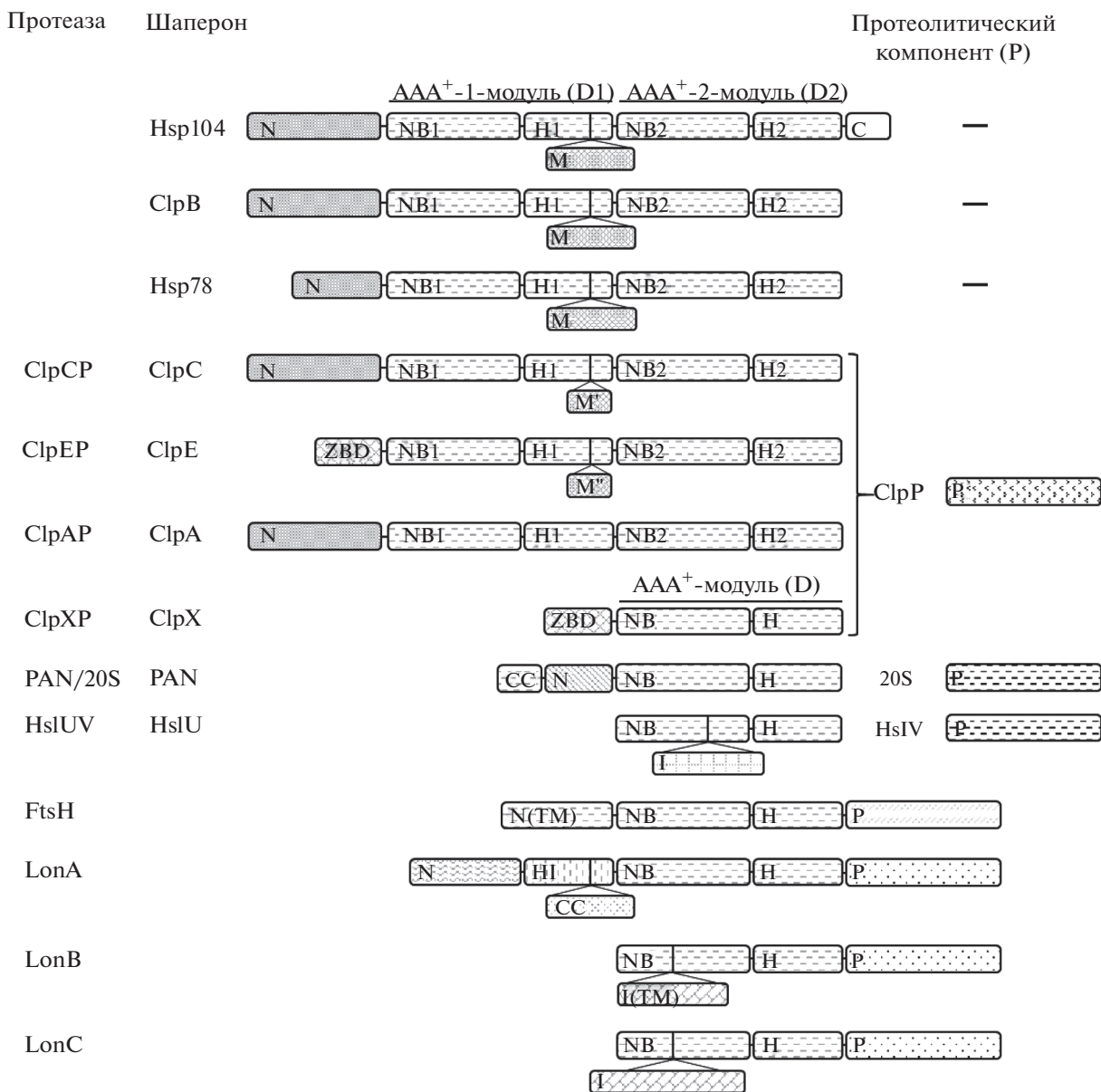


Рис. 2. Доменная организация молекулярных шаперонов семейства Hsp100 и АТФ-зависимых протеаз системы контроля качества белков. N — N-концевые домены; ZBD — цинк-связывающие домены; NB, NB1 и NB2 — нуклеотид-связывающие домены; M, M' и M'' — вставочные (middle) домены; I — инсерционные домены; H, H1 и H2 — α -спирализованные домены; C — C-концевой домен; P — протеазные субъединицы/домены; CC — coiled-coil-область; TM — трансмембранные фрагменты.

даются из комплексов с шаперонами благодаря конформационным изменениям последних, обусловленным преобразованием АТФ в АДФ, и подвергаются рефолдингу — либо спонтанному, либо с участием молекулярных шаперонов других семейств, что определяется специфичностью субстрата [44–47].

Наиболее изученные представители семейства Hsp100 — бактериальные шапероны ClpB и белок Hsp104 из дрожжей, которые вместе с менее исследованным шапероном Hsp78 отличаются от

шаперонов других семейств СКК проявлением дезагрегационной функции наряду с транслокационной и анфолдазной [48]. Это свойство шаперонов ClpB/Hsp104, относящихся к AAA^+ -белкам класса I, обусловлено наличием в их первом AAA^+ -модуле (D1) вставочного пропеллерообразного домена (“сердинный” или middle (M) domain) с конформацией coiled-coil (CC) (рис. 2) [49]. Следует отметить, что шапероны-деагрегаторы семейства Hsp100 обнаруживаются в бактери-

ях, дрожжах и растениях и не встречаются в клетках теплокровных животных [50, 51].

Дезагрегирующая функция ClpB и Hsp104 реализуется совместно с белками системы шаперона Hsp70/DnaK (табл. 1) [52], роль которых заключается в изменении физических свойств белковых агрегатов, что приводит к высвобождению отдельных полипептидов из агрегированных субстратов и перемещению их к AAA⁺-шаперону. Подвижный М-домен, локализующийся на внешней стороне гексамерного кольца ClpB, регулирует как АТФазную активность самого шаперона, так и DnaK-зависимое связывание мишени с аксиальным каналом ClpB [53]. Далее происходят транслокация и разворачивание полипептида с последующим высвобождением его в среду для рефолдинга [47].

Внутриклеточные АТФ-зависимые протеазы и мультисубъединичные протеолитические комплексы

Все АТФ-зависимые протеазы и протеолитические комплексы СКК относятся к суперсемейству AAA⁺-белков (рис. 1 и 2) и выступают критическими регуляторами состава клеточного протеома [2, 54–59]. Показано, что энергозависимый протеолиз отвечает за деградацию более чем 90% белков внутри клетки [55]. Этот процесс исключительно важен для устранения дефектных, неправильно свернутых или агрегированных белков, накопленных в результате стрессовых ситуаций, а также для регуляции внутриклеточного протеолиза при обычных условиях путем контроля концентрации большинства короткоживущих регуляторных белков [54–56, 59].

В клетках прокариот и в органеллах эукариот бифункциональные энергозависимые протеазы представлены пятью семействами гетероолигомерных ферментов (ClpAP, ClpCP, ClpEP, ClpXP, HslUV (ClpYQ)) и двумя семействами гомоолигомерных ферментов (FtsH и Lon – подсемейства LonA и LonC) [56, 57] (рис. 2). В археях аналогичные функции выполняются Lon-протеазами (подсемейство LonB) и мультисубъединичной архейной протеасомой (PAN/20S), которая представляет собой комплекс протеасомоактивирующей нуклеотидазы (proteasome-activating nucleotidase, PAN) с протеолитическим компонентом – 20S-протеасомой [58]. В цитоплазме и ядрах эукариот функционируют 26S-протеасомы – мультисубъединичные ансамбли, которые состоят из 20S-протеасом (протеолитические коры) и регуляторных 19S-комплексов, включающих AAA⁺-АТФазы [59, 60]. При этом все гетероолигомерные протеазы и протеолитические комплексы СКК характеризуются общей архитектурой: их бочкообразные гепта- или гексамеры, образованные

двухъярусными кольцами пептидгидролаз, активные сайты которых изолированы внутри центральной деградационной камеры, формируют комплексы с кольцевыми гексамерами AAA⁺-АТФаз регуляторных компонентов, которые проявляют анфолдазную активность, направленную на разворачивание белков-мишеней для последующей их транслокации в деградационную камеру [55–57].

АТФазные составляющие протеаз СКК, преобразующие энергию АТФ в механическую работу, выполняют важнейшую роль в деградации белковых субстратов. Весь процесс превращения белка-субстрата можно разделить на отдельные этапы, при этом распознавание белковой мишени, ее разворачивание и транслокация в деградационную камеру осуществляются АТФазным компонентом AAA⁺-протеазы, а собственно гидролиз белка-субстрата – пептидазным.

Этап узнавания и связывания мишени, как правило, не зависит от АТФ и может быть либо прямым, либо “косвенным”, т.е. опосредованным адаптерными белками. Специфическими мотивами узнавания часто служат упомянутые выше дегроны – пептидные фрагменты, локализованные вблизи (или внутри) неструктурированных N- или C-концевых областей белка, или даже N-концевые аминокислоты [54, 56, 57]. Известны также дегроны, представляющие собой “прикрепленные” пептидные последовательности (тэги). Один из ярких примеров тэга – фрагмент SsrA-tag – AAXXXXALAA (где X – любая аминокислота), который узнается протеазами ClpAP, ClpXP, FtsH, Lon и архейной протеасомой [54, 56].

В отличие от АТФ-зависимых протеаз бактерий и протеасом архей, функционирование 26S-протеасом эукариот обычно опосредовано предварительной селективной модификацией белков-мишеней, подлежащих деградации, путем ковалентного присоединения специфической метки – цепочки из нескольких молекул убиквитина (белок из 76 а.о.) [59–61]. Вследствие этого дегроны мишеней 26S-протеасом представлены двумя частями: универсальным полиубиквитиновым тэгом, обеспечивающим связывание мишени с регуляторным компонентом каталитического комплекса, и неструктурированным фрагментом, который служит областью инициации протеолиза [60, 61]. Вместе с тем показано, что возможен также убиквитин-независимый путь деградации белков 26S-протеасомой. Его реализации способствует ряд так называемых прямых протеасомных сигналов, к которым относятся либо специфические фрагменты последовательности, либо посттрансляционные модификации мишеней, либо их конъюгация с химическими веществами, приводящая к связыванию с протеасомой по принципу заряд-зарядовых взаимодействий [62].

АТР-зависимые протеазы отличаются от классических протеолитических ферментов следующими уникальными характеристиками: 1) высокой селективностью взаимодействия с белковыми мишенями при отсутствии выраженной специфичности по отношению к аминокислотам, образующим расщепляемые связи; 2) наличием транслоказной активности; 3) сопряжением протеолитической активности с гидролизом АТР; 4) процессивным механизмом деградации белков-субстратов (с образованием 10–15-членных пептидных продуктов без высвобождения высокомолекулярных интермедиатов); 5) мультисубъединичной (гомо- или гетероолигомерной) организацией [54, 56, 57].

AAA⁺-модули — характеристические компоненты АТР-зависимых протеаз. Выступая представителями суперсемейства AAA⁺-белков, АТР-зависимые протеазы содержат в своей структуре как высококонсервативные AAA⁺-модули, состоящие из 200–250 а.о., так и дополнительные N-концевые (N) или инсерционные (I) экстрадомены (рис. 2). АТР-разные модули формируются большими нуклеотид-связывающими (NB или α/β) и малыми α -спирализованными (H или α) доменами. Любая АТР-зависимая протеаза содержит либо один AAA⁺-модуль, либо два топологически подобных AAA⁺-модуля, включающих наборы различных консенсусных элементов (рис. 2 и 3) [39, 56, 63–66].

В NB-доменах AAA⁺-модулей локализованы консервативные мотивы Уолкера А и В. Мотив А (WA, называемый также Р-петлей, Р-loop), играющий важную роль как в связывании нуклеотида и координации иона металла, так и в формировании гексамерного АТР-разного кольца, представлен последовательностью GX₂GZGK[T/S], где X и Z — любые аминокислоты, но хотя бы один из X-остатков — это остаток пролина. Мотив В (WB) представляет собой гексапептид Φ_4 DE, где Φ — остатки гидрофобных аминокислот. Наряду с координацией иона металла, мотив WB принимает участие в гидролизе АТР, при этом консервативный остаток глутамата активирует молекулу воды для нуклеофильной атаки на γ -фосфат нуклеотида. Кроме мотивов Уолкера, AAA⁺-модули содержат ряд других консервативных участков, включая мотив межсубъединичного сигналинга (inter-subunit signaling, ISS), область вторичной гомологии (second region of homology, SRH), а также остатки sensor-1 (s1), sensor-2 (s2) и “аргининовый палец” (Arg-finger, Rf) (рис. 3) [39, 56, 63–68].

Мотив ISS, представленный α -спиралью из нескольких консервативных остатков (рис. 3), имеет большое значение для координации связывания и гидролиза АТР в соседних субъединицах кольцевого AAA⁺-гексамера. Взаимодействие С-концевой аспарагиновой (или глутаминовой) кислоты ISS-мотива с Rf-остатком собственной субъединицы, который воспринимает статус нуклеотида, связанного в соседней субъединице, за-

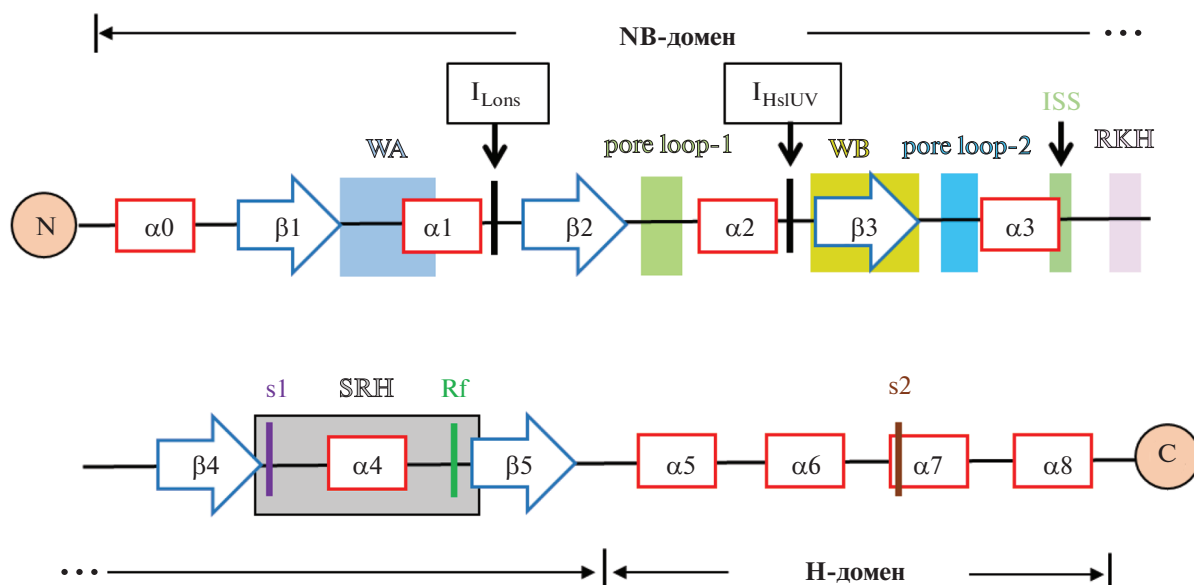


Рис. 3. Вторичная структура и консенсусные элементы AAA⁺-модулей шаперонов Hsp100 и АТР-зависимых протеаз системы контроля качества белков (по данным работ Puchades et al. [39], Chang et al. [65] и Miller et al. [66]). Прямоугольники — α -спирали, стрелки — β -тяжи, NB-домен — нуклеотид-связывающий домен, H-домен — α -спирализованный домен, показаны мотивы Уолкера А и В (WA и WB), петли pore loop-1 (GYVG), pore loop-2 и RfH, мотив межсубъединичного сигналинга (ISS), область вторичной гомологии (SRH), остатки сенсор-1 (s1), сенсор-2 (s2) и “аргининовый палец” (Rf). Обозначены сайты включения экстрадоменов в протеазах LonB, LonC (I_{Lons}) и HslUV (I_{HslUV}).

пускает цикл гидролиза АТФ, необходимый для транслокации субстрата [65].

Остаток Rf локализован в SRH-области (фрагмент полипептидной цепи из 15–20 а.о.), расположенной в С-концевой части NB-домена (рис. 3) [56, 64–68]. К этой же области относится остаток s1 (обычно аспарагин, реже – серин, треонин или гистидин), также взаимодействующий с γ -фосфатом молекулы АТФ соседней субъединицы и координирующий взаимодействие атакующей молекулы воды с остатками WB-мотива.

Совокупность консенсусных мотивов SRH-области критически важна для передачи между субъединицами AAA⁺-комплекса сигналов конформационных изменений, сопровождающих акт гидролиза нуклеотида. Вследствие своей функциональной значимости и в силу отсутствия SRH-фрагмента в других нуклеотидтрифосфатазах, эта область служит отличительной характеристикой для белков AAA⁺-суперсемейства [64–66].

Кроме рассмотренных консенсусных элементов, NB-домены AAA⁺-белков содержат специфические фрагменты последовательности, которые формируют петли трех типов, обращенные внутрь аксиального (осевого) канала гексамера белка [69]. Это так называемые петли pore loop-1 (или GYVG), pore loop-2 и RKN, которые участвуют в связывании, разворачивании и перемещении молекулы белка-мишени внутри полости канала вплоть до протеолитической камеры (в случае AAA⁺-протеаз) (рис. 3). Петля RKN локализуется у входа в осевой канал, наиболее консервативная петля pore loop-1 – в его центральной части, а петля pore loop-2 – на выходе из канала. При этом ведущую роль в разворачивании белков-субстратов и обеспечении транслоказной активности AAA⁺-протеаз играют петли pore loop-1.

В малом Н-домене AAA⁺-модуля, сформированном четырьмя α -спиралями, локализован мотив sensor-2 (рис. 3). Он содержит консервативный остаток аргинина (иногда – лизина) (s2), который взаимодействует с α -фосфатом АТФ и опосредует конформационные изменения, сопряженные с циклом связывания/гидролиза нуклеотида, а также участвует в межсубъединичных взаимодействиях [64, 66]. Следует упомянуть, что в противоположность членам AAA⁺-суперсемейства у представителей классических AAA-АТРаз в положении s2 обычно содержится остаток аланина [64, 66].

Особенности доменной и структурной организации АТФ-зависимых протеаз и мультисубъединичных комплексов. Известно, что подавляющее большинство AAA⁺-белков взаимодействует с функциональными белковыми партнерами, образуя комплексные гетероолигомерные структуры, АТРазные составляющие которых – самостоятельные субъединицы [64]. В редких случаях АТРазный и функциональный компоненты AAA⁺-белка лока-

лизованы в единой полипептидной цепи [56, 64, 70]. С другой стороны, как упоминалось выше, суперсемейство AAA⁺-белков делится на классы I и II [41]. В первом случае AAA⁺-белки содержат два AAA⁺-модуля (D1 и D2), разделенных вставками разной длины, а во втором – единственный AAA⁺-модуль (D), подобный D2-модулю белков класса I [41]. В этом отношении сообщество АТФ-зависимых протеаз системы контроля качества белков объединяет представителей обоих классов AAA⁺-белков: к классу I относятся АТРазные компоненты ClpAP/CP/EP-протеаз, а к классу II – протеаз ClpXP, HslUV, FtsH, Lon и комплексов архейных PAN/20S-протеасом и эукариотических 26S-протеасом [56, 70]. Доменное строение протеаз СКК показано на рис. 2, а их структурная организация охарактеризована в табл. 2.

АТРазные и протеазные составляющие семейств Lon и FtsH локализованы в единой полипептидной цепи, и эти ферменты функционируют как гомоолигомеры. Однако большинство AAA⁺-протеаз – это гетероолигомерные комплексы, в которых АТРазный и протеазный компоненты представлены индивидуальными субъединицами (рис. 2).

Особенность протеаз ClpCP и ClpEP – наличие в α -спирализованных доменах H1 их D1-модулей вставочных “серединных” (middle) доменов (M' и M''), обладающих СС-конформацией, но различающихся своими размерами. Показано, что эти домены участвуют во взаимодействии протеаз со специфическими адаптерными белками, которые опосредуют связывание и деградацию белковых мишеней [70, 71]. Подобные им вставочные домены (M), также имеющие СС-конформацию, обнаружены в шаперонах ClpB, Hsp104 и Hsp78 (рис. 2, см. подраздел “Молекулярные шапероны СКК”) [49, 72]. Однако M-домены более чем вдвое превышают M'- и M''-домены по размеру и выполняют другие функции – они обеспечивают дезагрегазную активность шаперонов [72].

Разнообразие протеазных компонентов АТФ-зависимых протеаз и протеасом, вовлеченных в селективный АТФ-зависимый протеолиз, отражено в табл. 2, из которой видно, что внутриклеточная деградация белков осуществляется ферментами, представляющими четыре разных клана в классификации пептидгидролаз MEROPS: каталитический центр протеолитической субъединицы ClpP, общей для гетероолигомерных протеаз ClpAP, ClpCP, ClpEP и ClpXP, представлен классической триадой Ser–His–Asp, у протеаз HslUV, а также в β -субъединицах 20S-протеасом архей и эукариот каталитически активны N-концевые остатки треонина, мембраносвязанная протеаза FtsH – Zn-зависимая металлопротеаза, а в активных центрах Lon-протеаз функционирует каталитическая диада Ser–Lys [73].

Таблица 2. Характеристика АТР-зависимых протеаз и протеолитических комплексов, осуществляющих селективный внутриклеточный протеолиз

Функциональные компоненты (ФК)											
Протеаза/ комплекс		ФК в четв. структуре*	АТРазные компоненты					пептидгидролазные компоненты			
			название	n**	AAA ⁺ -модули		экстра- домен	название	остатки каталитических центров	MEROPS	
					количес- тво***	MD				Clan	Family
AAA ⁺ -протеазы I класса											
ClpCP	Su	ClpC	6/12	2	M'	N	ClpP	14	Ser, His, Asp	SK	S14
ClpEP	Su	ClpE	6/12	2	M''	N	ClpP	14	Ser, His, Asp	SK	S14
ClpAP	Su	ClpA	6/12	2	—	N	ClpP	14	Ser, His, Asp	SK	S14
AAA ⁺ -протеазы и протеолитические комплексы II класса											
ClpXP	Su	ClpX	6/12	1	—	N	ClpP	14	Ser, His, Asp	SK	S14
PAN/20S	Su	PAN	6/12	1	—	N	β-Su в 20S	14	Thr	PB	T1B
26S-протеасома	Su	Rpt(1–6) в 19S	6/12	1	—	N	β-Su(1,2,5) в 20S	6 из 14	Thr	PB	T1B
HslUV	Su	HslU	6/12	1	—	I	HslV	12	Thr	PB	T1B
FtsH	Dom	FtsH	6	1	—	N	FtsH	6	His, Glu, His, Asp	MA	M41
LonA	Dom	LonA	6	1	—	N	LonA	6	Ser, Lys	SJ	S16
LonB	Dom	LonB	6	1	—	I	LonB	6	Ser, Lys	SJ	S16
LonC	Dom	LonC	6	1	—	I	LonC	6	Ser, Lys	SJ	S16

Примечание: Su — субединица; Dom — домен; MD — наличие инсерционного M-домена в D1-модуле; 20S — 20S-протеасома (протеолитические коры архейной (PAN/20S) и эукариотической (26S) протеасом); PAN — Proteasome Activating Nucleotidase (регуляторная составляющая PAN/20S-протеасомы); 19S — регуляторный комплекс 26S-протеасомы; Rpt — Regulatory particle triphosphatase (AAA⁺-АТРаза).

* Функциональные компоненты в четвертичной структуре протеазы или протеолитического комплекса.

** Количество субъединиц/доменов в ФК.

*** Количество AAA⁺-модулей в субединице.

Функционально активными формами бактериальных гетероолигомерных АТФ-зависимых протеаз (ClpAP, ClpCP, ClpEP, ClpXP и HslUV) выступают бочкообразные комплексы из состыкованных колец, в которых два центральных пептидазных кольца (гептамерных в случае ClpP или гексамерных в случае HslV) с каталитическими центрами, обращенными внутрь аксиальной полости (деградационная камера), фланкированы с одной или с обеих сторон гексамерными кольцами регуляторных АТФазных субъединиц (ClpA, ClpC, ClpE, ClpX или HslU), выполняющих функции узнавания, разворачивания и транслокации субстрата [56, 57, 70, 74]. Показано, что ассоциация АТФаз ClpA, ClpC, ClpE и ClpX с пептидазой ClpP происходит с участием специальных “стыковочных петель”, локализованных в AAA⁺-модулях шаперонов между остатками sensor-1 NB-доменов и H-доменами [75]. Гомоолигомерные протеазы Lon и FtsH собираются в бочкообразные структуры из шести идентичных субъединиц.

Аналогично бактериальным AAA⁺-протеазам формируются более сложные мультисубъединич-

ные комплексы протеасом архей (PAN/20S) и эукариот (26S), у которых протеолитические компоненты (20S) представляют тетраэрусные гептамерные кольца из внутренних каталитических β -субъединиц и внешних регуляторных α -субъединиц, одинаковых в 20S-комплексах архей (структурная формула $\alpha_7/\beta_7/\alpha_7$) и различающихся в 20S-комплексах эукариот ($\alpha_{1-7}/\beta_{1-7}/\alpha_{1-7}$) [76].

Регуляторные комплексы протеасом (PAN и 19S), обладающие АТФазной активностью, содержат 6 субъединиц у архей и 19 субъединиц у эукариот, при этом основой обеих структур служат гексамерные кольца AAA⁺-белков (соответственно, PAN и Rpt(1–6) – Regulatory particle triphosphatases, табл. 2) [58, 60]. Эти регуляторные комплексы находятся в непосредственном взаимодействии с гептамерами α -субъединиц протеолитических коров протеасом.

На рис. 4 представлен общий принцип функционирования АТФ-зависимых протеаз и мультисубъединичных протеолитических комплексов. Распознавание и связывание белка-мишени (ТР – target protein) осуществляется регуляторными

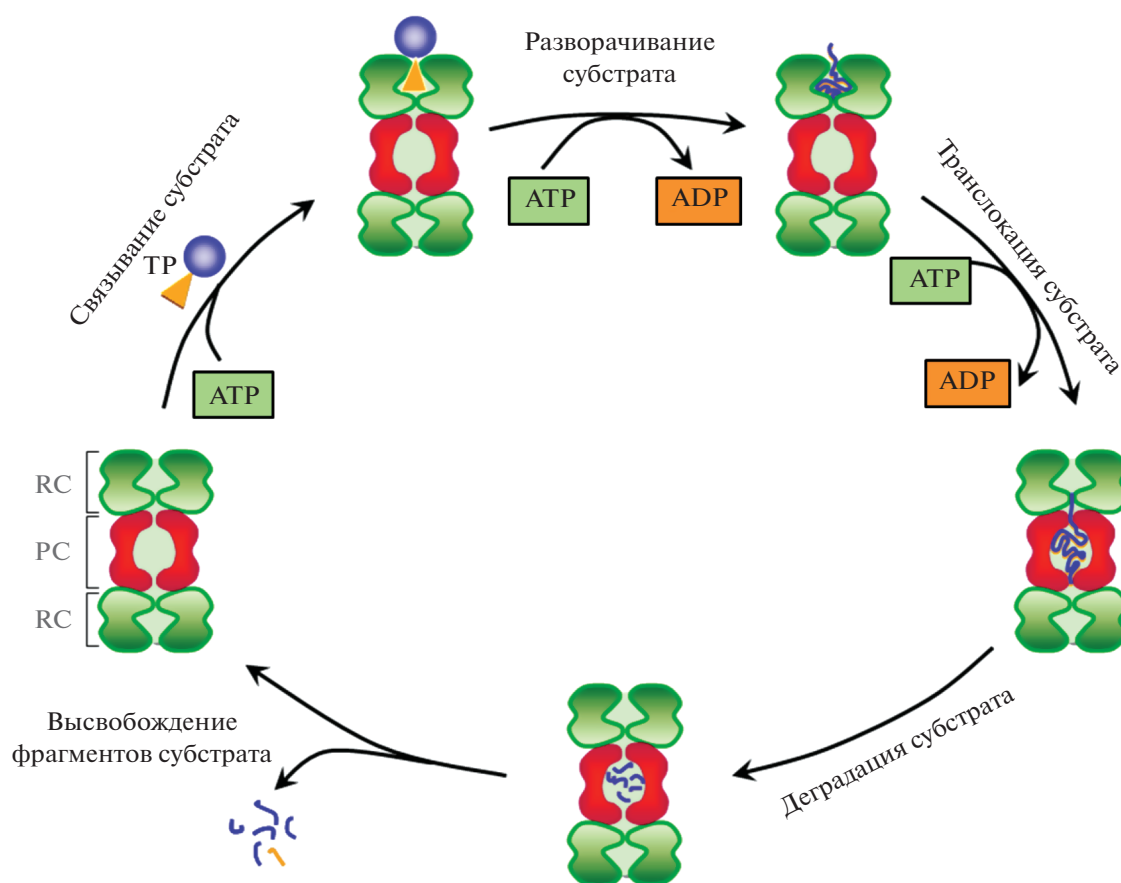


Рис. 4. Схематическое представление механизма АТФ-зависимой деградации белков в клетках бактерий, архей и эукариот (по данным работ Gottesman S. [54] и Bittner et al. [122]). RC – регуляторный АТФазный компонент (Clp(A, C, E, X), HslU, PAN или 19S-комплекс); PC – протеолитический компонент (ClpP, HslV или 20S-протеасома); ТР – белок-мишень.

AAA⁺-компонентами (RC – regulatory complexes), локализованными во внешних кольцах активного комплекса фермента. На следующих этапах происходит разворачивание молекулы субстрата и транслокация ее в область протеолитических центров. В деградационной камере, расположенной внутри ферментного комплекса, осуществляется процессивный гидролиз субстрата с последующим высвобождением продуктов. Образовавшиеся олигопептидные фрагменты могут в дальнейшем гидролизироваться АТР-независимыми протеазами до коротких пептидов и, наконец, клеточными аминопептидазами до свободных аминокислот.

Основные характеристики некаталитических экстрадоменов АТР-зависимых протеаз. Специфические для каждого семейства АТР-зависимых протеаз и протеасом экстрадомены их АТР-зависимых составляющих в большинстве случаев представлены вариabельными “не АТР-зависимыми” N-концевыми (N) доменами, предшествующими AAA⁺-модулям, и реже – вставочными (I) доменами, локализованными внутри NB-доменов между мотивами WA и WB (рис. 2) [41, 56, 67]. Обычно экстрадомены служат местами связывания субстратов [56]. Они выполняют функцию первичного распознавания субстрата-мишени, а также играют важную роль в его разворачивании и/или контролируют доступ мишеней к связывающим центрам, локализованным внутри AAA⁺-модулей. Экстрадомены протеаз LonB и FtsH включают также трансмембранные фрагменты, обеспечивающие взаимодействие ферментов с клеточными мембранами.

Вовлечение в селективный отбор субстратов белков-адаптеров, способных к специфическому взаимодействию как с мишенями, так и с AAA⁺-партнерскими белками, зачастую приводит к модулированию функциональных свойств последних [41, 77]. В качестве примера в табл. 3 представлены адаптерные белки, функционирующие в комплексе с AAA⁺-протеазами в клетках *E. coli* и *Bacillus subtilis*. При этом следует заметить, что обычно LonA-протеаза не требует никаких адаптеров, и обнаруженный в 2015 г. адаптерный

белок SmiA используется ферментом из *B. subtilis* исключительно для деградации активатора биосинтеза жгутиков SwrA [78]. Для протеаз FtsH и ClpEP из этих же организмов до настоящего времени адаптеров не обнаружено [77].

Большинство белковых адаптеров связываются с N-концевыми экстрадоменами AAA⁺-белков, что обеспечивает оптимальное взаиморасположение AAA⁺-олигомера и “заякоренной” через этот белковый линкер мишени. Обнаружено также, что некоторые адаптерные белки могут влиять на активность AAA⁺-партнеров. При этом сами белки-адаптеры также могут подвергаться регуляции (например, путем взаимодействия с небольшими белками-антиадаптерами и/или посредством фосфорилирования) [77].

N-экстрадомены Clp-шаперонов – АТР-зависимых компонентов ряда AAA⁺-протеаз. Шапероны Clp-семейств системы контроля качества характеризуются N-концевыми экстрадоменами двух типов. Прежде всего, это α-спирализованные N-домены молекулярных шаперонов ClpB и Hsp104 и родственных им АТР-зависимых субъединиц (ClpA и ClpC) гетероолигомерных протеаз ClpAP и ClpCP (рис. 2), которые проявляют высокую гомологию на уровне своих первичных и вторичных структур [79, 80]. Эти домены содержат по восемь α-спиралей, формирующих тандемы из двух структурных повторов, каждый из которых включает четыре α-спирали и имеет размер ~70 а.о. Установлено, что N-домены ClpA, ClpB и ClpC выполняют роль регуляторов специфичности своих шаперонов и обеспечивают их взаимодействие с широким набором субстратов-мишеней [80, 81]. Наряду с этим показано, что N-домен ClpA имеет также исключительное значение для образования активного комплекса с ClpP-пептидазой [82].

Для шаперона ClpA выявлен единственный адаптерный белок ClpS (табл. 3), связывание которого с N-доменом приводит к ингибированию деградации известных субстратов ClpAP – SsrA-меченых белков. В то же время комплекс ClpAP/ClpS обнаруживает способность к распознаванию и расщеплению некоторых белков, агрегированных в результате действия теплового шока. Таким образом, взаимодействие ClpS с экстрадоменом модифицирует специфичность ClpA и перенаправляет активное функционирование шаперона на деградацию агрегированных белков [83].

Для ClpC из *B. subtilis* известен целый ряд адаптерных белков (MecA, YpbH, McsB и др.) (табл. 3). Связывание N-домена ClpC с белком-адаптером MecA играет важную роль при деградации большинства субстратов протеолитическим комплексом ClpCP [70]. Показано, что в узнавании и связывании адаптерных белков ClpC-шапероном кроме N-концевого экстрадомена участвует также локализованный в AAA⁺-модуле D1 (рис. 2)

Таблица 3. AAA⁺-протеазы *E. coli* и *B. subtilis* и их адаптерные белки (по данным работ Kirstein et al. [77] и Mukherjee et al. [78])

Протеаза	Источник	Белки-адаптеры
ClpAP	<i>E. coli</i>	ClpS
ClpXP	<i>E. coli</i>	RssB, SspB, UmuD, YjbH
ClpCP	<i>B. subtilis</i>	MecA, YpbH, McsB, ClpS, NblA
LonA	<i>B. subtilis</i>	SmiA

вставочный М'-домен (58 а.о). При этом детали участия адаптерных белков в доставке субстратов к комплексу ClpCP до сих пор остаются неизвестными [71, 77, 80, 84].

Рентгеноструктурные исследования показали, что взаимодействия экстрадоменов ClpA и ClpC с их адаптерами ClpS и MecA носят сходный характер. Оба адаптера используют подобные α -спирали для взаимодействия со структурно подобными областями N-доменов шаперонов, при этом в комплексах шаперон-адаптер формируются одинаковые наборы водородных связей [84].

Вместе с тем ClpC кардинально отличается от других шаперонов семейства Clp/Hsp100, поскольку все виды его активности, включая распознавание и связывание белков-субстратов, гексамеризацию, шапероновую активность, образование функционального комплекса ClpCP и деградацию белковых мишеней, опосредованы обязательным взаимодействием шаперона с адаптерными белками. Выявлен регуляторный механизм, в соответствии с которым в отсутствие белков-субстратов происходит инактивация комплекса ClpCP за счет деградации связанного белка-адаптера [80, 81].

Несмотря на высокое подобие шаперона ClpB и регуляторных шаперонов АТФ-зависимых протеаз ClpA и ClpC, адаптерные белки для ClpB до настоящего времени не обнаружены [77]. N-экстрадомены ClpB участвуют во взаимодействии с рядом белковых мишеней, однако их роль в основной функции шаперона — ClpB-опосредованной деагрегации белков — все еще до конца не изучена. Показано, что ряд вариантов ClpB, несущих точечные мутации в экстрадоме, проявляет пониженную деагрегационную активность, однако некоторые делеционные формы ClpB из разных источников с полностью удаленным N-доменом сохраняют активность, соизмеримую с активностью полноразмерного белка [16]. Кроме того, существование в *Mycoplasma* sp. гомологов ClpB, лишенных N-домена, подтверждает необязательность наличия N-доменов в ClpB-шаперонах для деагрегации белков [16]. При этом однозначно установлено, что непосредственное участие в реализации деагрегационной функции ClpB принимает характеристический для белков ClpB/Hsp104 М-домен, внедренный в AAA⁺-модуль шаперона (рис. 2) [85, 86].

Для белков семейства Hsp104 показано, что их N-экстрадомены помимо взаимодействия с белками-мишенями вовлечены также в процессы олигомеризации самих шаперонов [87].

Другой тип N-концевых экстрадоменов Clp-шаперонов представляют гомологичные Zn-связывающие домены (ZBD) протеаз ClpXP и ClpEP, которые относятся к разным классам AAA⁺-белков (рис. 2). При этом можно отметить, что шаперон ClpE проявляет также сходство с ClpC, по-

скольку в своем D1-модуле он содержит вставочный М"-домен (53 а.о), более чем на 60% подобный М'-домеу ClpC (рис. 2). ZBD-экстрадомены ClpX и ClpE имеют размеры ~60 а.о. и включают по четыре остатка цистеина, координирующих атом Zn [88].

Показано, что ZBD-домен ClpX *E. coli* отвечает за узнавание некоторых субстратов (в частности, белков λ O и MuA) и, кроме того, связывает адаптерный SspB-белок (табл. 3), направляющий субстраты к осевому каналу ClpX для разворачивания [88]. О белке ClpE известно, что он участвует в процессе деагрегации и в последующей деградации агрегированных белков, а его N-концевой экстрадомен необходим для проявления базовой АТФазной активности шаперона *in vitro* [70, 89].

На примере ClpX установлено, что индивидуальные ZBD-экстрадомены образуют стабильные димеры, в то время как в кольцевых гексамерах полноразмерных шаперонов шесть ZBD-доменов формируют тримеры димеров, локализованные на поверхности гексамерных колец AAA⁺-модулей ClpX [88].

N-концевые экстрадомены AAA⁺-АТФаз протеасом. AAA⁺-регуляторные комплексы, активирующие протеолитические 20S-коры протеасом, в случае архей сформированы гомогексамерами протеасомоактивирующей нуклеотидазы PAN, а в случае эукариот представлены 19S-ансамблями, состоящими из 19 субъединиц, шесть неидентичных AAA⁺-белков которых (Rpt(1–6), табл. 2) образуют кольцевые гексамерные “основания”, непосредственно взаимодействующие с 20S-корами [90–92]. Топологически подобные белки PAN и Rpt, как и другие AAA⁺-АТФазы, включают N-концевые экстрадомены (PAN-N и Rpt-N соответственно), которые участвуют в формировании гексамеров, в узнавании и связывании белковых мишеней и совместно с собственными AAA⁺-модулями превращают химическую энергию в механическую работу.

Экстрадомены PAN-N и Rpt-N начинаются с α -спиральных сегментов, за которыми следуют глобулярные β -структурированные С-концевые участки, формирующие олигосахарид-связывающий (ОВ) фолд [91, 92]. Архитектурно экстрадомены PAN-N и Rpt-N представляют собой тримеры димеров, в которых на гексамерных кольцах ОВ-фрагментов располагаются три СС-участка, образованные парами N-концевых α -спиральных сегментов соседствующих субъединиц [91, 92]. Эти структуры через короткие линкеры соединяются с гексамерными кольцами AAA⁺-модулей PAN и Rpt, имеющими каноническую укладку AAA⁺-АТФаз [91].

В функционально активных протеасомах, включающих и регуляторные, и протеолитиче-

ские компоненты, кольца AAA⁺-модулей ассоциируются с протеолитическим кором 20S и управляют АТР-зависимым разворачиванием белка-субстрата, тогда как дистальные комплексы экстрадоменов образуют входные отверстия каналов транслокации субстрата [93].

Инсерционные экстрадомены HslUV-протеаз. Характерная особенность АТР-разного компонента гетероолигомерной протеазы HslUV — отсутствие N-концевого домена. Вставочные α -спирализованные экстрадомены (I-домены) HslU размером ~130 а.о., формирующие в кольцевом олигомере воронкообразную полость, расположены в NB-домене шаперона вслед за спиралью $\alpha 2$ и в непосредственной близости от мотива WB (рис. 3) [94, 95]. Гексамер, образованный I-доменами, обеспечивает отбор полипептидных субстратов для деградации, способствует транслокации субстратов в протеолитическую камеру HslUV-комплекса, а также участвует в гидролизе АТР и деградации белковых мишеней [94, 95].

N-экстрадомены FtsH-протеаз. FtsH — единственная мембраносвязанная AAA⁺-протеаза бактерий. Функционально активной формой фермента, нацеленного на деградацию мембраносвязанных белков, служит кольцевой гомогексамер [96]. N-экстрадомены FtsH-протеаз содержат трансмембранные сегменты, сформированные двумя α -спиралями [96, 97]. Показано, что N-домен влияет на олигомеризацию и стабильность FtsH [98]. Белковые адаптеры для FtsH-протеаз неизвестны, однако существует целый набор белковых модуляторов и ассоциированных факторов (HflK, HflC, HflD, MgtR, SpoVM), которые участвуют в функционировании ферментов [90]. Аналоги FtsH обнаружены в митохондриях и хлоропластах эукариот. Установлено высокое подобие N-экстрадоменов бактериальных и эукариотических FtsH-протеаз [97]. Обнаружена также особая роль FtsH как единственной AAA⁺-протеазы, имеющей критическое значение для выживаемости *E. coli* [99].

Три типа экстрадоменов протеаз семейства Lon. Lon-протеазы — это единственное семейство АТР-зависимых протеаз, которое в системе контроля качества клеточных белков представлено тремя подсемействами (LonA, LonB и LonC, см. далее подраздел “Общая характеристика семейства Lon-протеаз. Подсемейства Lon”), имеющими сходные AAA⁺-модули и протеазные домены, но кардинально различающимися строением и локализацией своих экстрадоменов (рис. 2 и 5) [100]. Согласно современной концепции, представляющая AAA⁺-модулю пролонгированная N-концевая область LonA-протеаз в действительности сформирована двумя доменами [101] — собственно N-концевым β -структурированным экстрадоменом (N) [102, 103] и следующим за ним “вста-

вочным” α -спирализованным доменом [101, 104]. При этом вставочный домен включает олигопептидный фрагмент (~100 а.о.) с СС-конформацией и носит название HI(СС) (helical inserted with СС-fragment — инсерционный спирализованный с СС-фрагментом) домен [101, 105].

Ферменты подсемейств LonB и LonC, лишенные N-экстрадоменов, содержат разные по размеру инсерционные экстрадомены (I и I*), включающие, соответственно, 124–140 и 185–191 а.о., которые внедрены, как и у HslUV, внутрь NB-доменов их собственных AAA⁺-модулей (рис. 5) [73, 100, 106–108]. Однако, в отличие от HslUV, I-домены Lon-протеаз локализованы вблизи мотива WA, непосредственно после спиралей $\alpha 1$ (рис. 3). Особенностью экстрадоменов LonB-протеаз служит наличие включенных в их последовательности трансмембранных сегментов (ТМ).

Сходство и различия экстрадоменов AAA⁺-белков СКК. Приведенные выше данные по экстрадоменам AAA⁺-белков — представителей системы контроля качества клеточного протеома — показывают, что эти некаталитические фрагменты AAA⁺-протеаз и протеолитических комплексов разнообразны по структуре: они могут быть полностью α -спирализованными (как N-домены ClpA, ClpB и ClpC, а также I-домены HslU и LonC), могут иметь α/β -структуру (ZBD-домены ClpX и ClpE), могут представлять β -структурный фолд (ОВ) с включением N-концевых СС-фрагментов (N-домены AAA⁺-АТР-регуляторных комплексов эукариотических и архейных протеасом), и, наконец, их последовательности могут содержать спиральные фрагменты, обеспечивающие взаимодействие с клеточными мембранами (N-концевой домен FtsH и I-домен LonB-протеаз). В настоящее время для большинства экстрадоменов AAA⁺-белков СКК получены рентгеноструктурные данные (в том числе для ClpA *E. coli* PDB: 1K6K; ClpB *E. coli* PDB: 1KHY; ClpB *Thermus thermophilus* PDB: 1QVR; ClpC *B. subtilis* PDB: 2Y1Q; ClpX *E. coli* PDB: 2DS7; Hsp104 *S. cerevisiae* PDB: 5U2U; Hsp104 *Candida albicans* PDB: 5U2L; HslU *E. coli* PDB: 1YYF; HslU *Haemophilus influenzae* PDB: 1G41; FtsH *E. coli* PDB: 4V0B; FtsH *Thermotoga maritima* PDB: 4M8A и др.) и выявлена их роль в связывании белков-мишеней и/или белковых адаптеров.

Практически все экстрадомены AAA⁺-белков СКК объединены одним общим свойством — их размеры не превышают 150–190 а.о. В этом отношении протеазы подсемейства LonA занимают особое место, поскольку только у них некаталитическая N-концевая область включает от 300 до более чем 400 аминокислот и состоит из двух структурно независимых доменов — N и HI(СС) (рис. 2) [100, 101]. При этом кристаллическая структура определена только для N-домена [102–

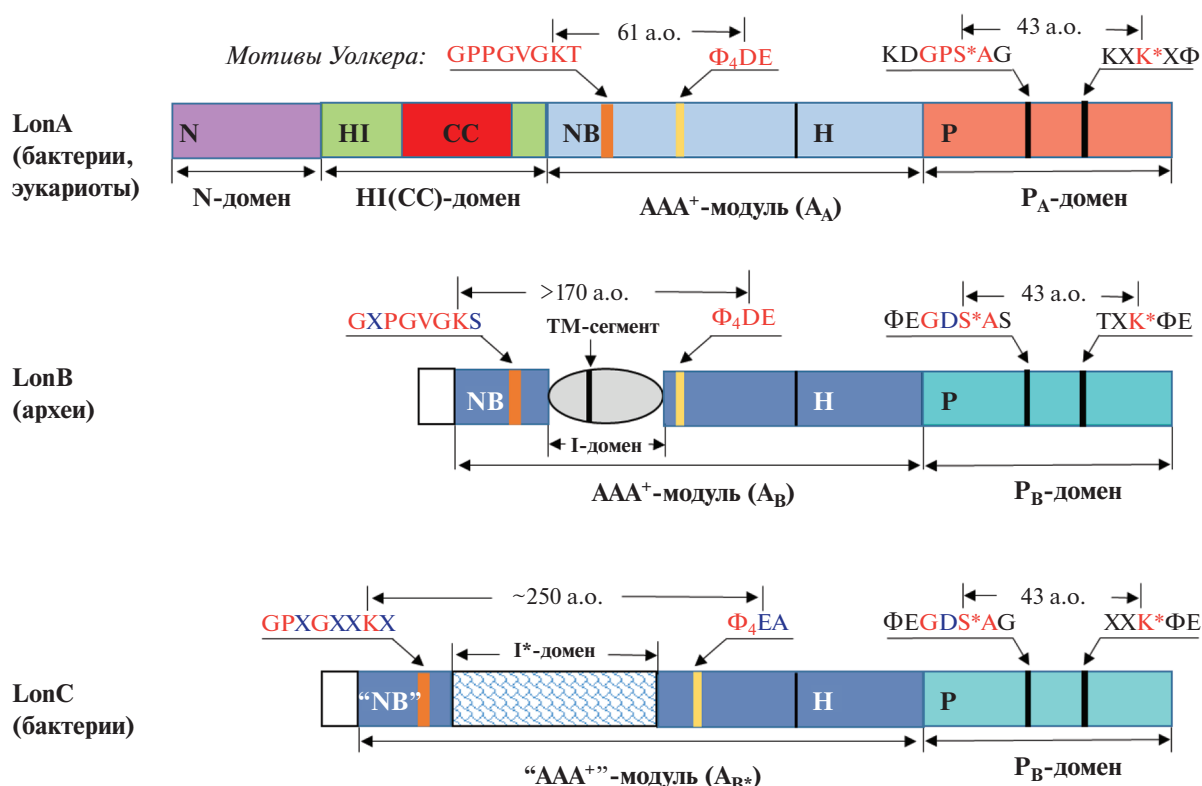


Рис. 5. Доменная организация и консенсусные элементы Lon-протеаз различных подсемейств. S* и K* – каталитически активные остатки протеолитического центра, Φ – остаток гидрофобной аминокислоты, X – остаток любой аминокислоты, P_A и P_B – протеазные домены А-типа (коралловый) и В-типа (бирюзовый), A_A, A_B и A_B* – AAA⁺-модули соответственно А-типа (голубой), В-типа и В*-типа “вырожденный” (синие), NB – нуклеотид-связывающие домены, H – α-спирализованные домены. Экстрадомены ферментов включают: N-домен (фиолетовый) и HI(CC) – вставочный α-спирализованный домен (зеленый) с участком coiled-coil (CC) (красный) у протеаз LonA, I – вставочный домен с трансмембранным (TM) сегментом (серый) у LonB и I* – вставочный α-спирализованный домен (заштрихован) у LonC; консервативные фрагменты показаны красным цветом; замены аминокислот в консервативных фрагментах выделены синим цветом.

104], а пространственная укладка инсерционного HI(CC)-домена остается невыясненной до сих пор. До последнего времени участие каждого из этих доменов в функционировании полноразмерного фермента также не было охарактеризовано в полной мере.

Вместе с тем LonA-протеазы играют ключевую роль в функционировании системы контроля качества в бактериях и эукариотах. Так, известно, что в клетках *E. coli* именно LonA-протеаза обеспечивает >50% протеолиза аномальных белков [109], а у эукариот LonA-протеазы – ведущие ферменты, расщепляющие окисленные белки митохондриального матрикса. Установлено, что многие патологии (в частности, нейродегенеративные нарушения и развитие ряда онкологических заболеваний) сопровождаются изменениями содержания LonA-протеазы в клетках [110–113]. Сведения об участии LonA-протеаз в патологических процессах и о возможности их применения в медицинских целях широко представлены в современной литературе (обзоры [114–118]). Су-

щественная биологическая роль LonA-протеаз определяет важность их структурно-функционального исследования.

Lon-ПРОТЕАЗЫ КАК ОСОБОЕ СЕМЕЙСТВО В СИСТЕМЕ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА КЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ

Общая характеристика семейства Lon. Подсемейства Lon-протеаз

Согласно современной классификации MEROPS [119], семейство Lon-протеаз S16 клана SJ формируется, главным образом, подсемействами A, B и C (табл. 2). Lon-протеаза из *E. coli* (*EcLon*), относящаяся к наиболее представительному подсемейству LonA, исторически была первой экспериментально обнаруженной АТФ-зависимой пептидгидролазой (1981 г.) [120], и до настоящего времени она остается основной моделью при изучении ферментов семейства Lon.

К 2004 г. семейство Lon-протеаз насчитывало уже более 100 ферментов из различных источников. Сравнительный анализ их первичных структур позволил выделить в общем пуле два подсемейства — крупное LonA (80 ферментов) и менее репрезентативное LonB [100] (рис. 5). На текущий момент в базе данных MEROPS [119] насчитывается ~2300 LonA-протеаз и >200 LonB-ферментов. Наряду с рассмотренными выше различиями в экстрадоменах, протеазы LonA и LonB характеризуются также разными типами протеолитических центров: окружение каталитически активных остатков в подсемействах представлено фрагментами **KDGPS*AG** и **KXK*XΦ** (у LonA) или **ΦEGDS*AS** и **TXK*ΦE** (у LonB), где **S*** и **K*** — каталитические остатки серина и лизина, в обоих случаях отстоящие друг от друга на 43 а.о., **X** — любая, а **Φ** — гидрофобная аминокислота (жирным шрифтом выделены консервативные остатки, подчеркнуты различные по природе остатки) (рис. 5). Помимо этого, присутствуют отличия и в аминокислотных сегментах AAA⁺-модулей, формирующих мотивы Уолкера и их окружение: так, мотивы **WA** представлены пептидами **GPPGVGKT** (LonA) и **GXPVGKKS** (LonB), а подобные мотивы **WB** (**Φ₄DE**) фланкированы различающимися пептидами: у LonA это **NP** и **IDK**, а у LonB — **KG** и **INT** [100].

Как упоминалось выше, LonA-протеазы преимущественно обнаруживаются в прокариотах (цитозольные ферменты) и эукариотах (ферменты митохондрий, хлоропластов и пероксисом). Между тем, несколько протеаз LonA-типа идентифицировано также у отдельных представителей архей (в том числе *Methanosarcina* sp., *Methanobacterium formicicum* и *Methanobolus psychrophilus*) [119].

Что касается протеаз LonB, то они представлены в основном в архебактериях. Однако в течение последнего десятилетия протеазы с LonB-типом протеолитического центра (окружение каталитических остатков: **ΦEGDS*AG** и **XXK*ΦE**) обнаружены и у ряда термофильных бактерий (в частности, *Marinithermus hydrothermalis*, *Meiothermus taiwanensis*, *T. thermophilus* и др.). В своих АТРазных компонентах эти ферменты также проявляют подобие с LonB-протеазами. Однако они не способны к гидролизу АТР из-за вырожденности АТРазных центров вследствие замен существенных консервативных остатков в мотивах Уолкера и их окружении: **GPXGXXKX** (**WA**) и **GGΦ₄EAXXΦ** (**WB**), а также на участках **sensor-1** и **sensor-2**. Еще одной отличительной характеристикой новой группы ферментов служит наличие дополнительного по сравнению с LonB-протеазами α-спирализованного фрагмента размером 90–91 а.о. в экстрадомене, локализованном внутри потенциального AAA⁺-модуля (рис. 5) [100, 107, 121]. Несмотря на то что такие ферменты могут только

связывать, но не гидролизовать АТР, они тоже проявляют способность к селективной деградации развернутых белковых субстратов, но по АТР-независимому механизму [121]. К настоящему времени именно это сообщество ферментов оформилось в немногочисленное (в пределах 10 представителей) третье подсемейство Lon-протеаз — LonC (рис. 5) [119].

Современные исследования протеаз семейства Lon направлены, прежде всего, на получение данных о пространственных структурах этих ферментов и механизмах их функционирования. При этом семейство Lon-протеаз достаточно полно охарактеризовано в части АТРазных и пептидгидролазных свойств представителей всех трех подсемейств [108, 122–127]. Вместе с тем вследствие особенностей организации некаталитической области структурно-функциональная характеристика самого крупного подсемейства LonA в целом остается недостаточно изученной, и для ряда научных групп она служит программой продолжающихся исследований.

LonA-протеазы — уникальный подкласс AAA⁺-белков

Индивидуальные субъединицы гомоолигомерных LonA-протеаз образованы пятью доменами (рис. 5). Функциональными выступают протеазный C-концевой домен (**P**) и центральные нуклеотид-связывающий (**NB**) и α-спирализованный (**H**) домены, которые формируют АТРазный AAA⁺-модуль. В неординарной для AAA⁺-белков СКК некаталитической N-концевой области ферментов локализованы два домена: N-концевой (**N**, включающий 110–130 а.о. у бактериальных ферментов и 165–220 а.о. у эукариотических) и инсерционный (**HI(CC)**, 178–186 а.о. у ферментов из любых источников).

Поскольку пространственные структуры полноразмерных LonA-протеаз до самого последнего времени не были известны, структурные сведения о представителях подсемейства ограничивались преимущественно 3D-данными для ряда фрагментов ферментов из различных источников: *E. coli*, *B. subtilis*, *Brevibacillus thermoruber*, *M. taiwanensis*, *Mycobacterium avium* и мозга человека (*EcLon*, *BsLon*, *BtLon*, *MtLon*, *MaLon* и *HumLon* соответственно). Эти данные полностью согласуются с предсказанными вторичными структурами LonA-протеаз и дают представление о трехмерных структурах четырех из пяти их доменов — **N**, **NB**, **H** и **P** [102–105, 128–135].

Результаты рентгеноструктурного анализа показали, что структуры доменов **NB** и **H**, составляющих AAA⁺-модуль LonA-протеаз, топологически подобны соответствующим фрагментам классических AAA⁺-белков (в частности, един-

ственным D-модулям протеаз ClpXP и HslUV, а также D2-модулям шаперонов ClpB/Hsp104 и регуляторных компонентов АТФ-зависимых протеаз ClpAP, ClpCP и ClpEP) [63, 67, 122].

Отличительными именно для LonA-протеаз оказались структуры их N-концевых и протеазных доменов. Установлено, что β -структурированные N-домены бактериальных LonA-протеаз, состоящие из семи β -тяжей и двух α -спиральных фрагментов, обнаруживают выраженное сходство с N-доменом гипотетического белка BPP1347 из *Bordetella parapertussis* [102], который относится к группе РНК-связывающих белков, обладающих РUA-подобной архитектурой [136]. N-домены эукариотических LonA-протеаз проявляют высокое подобие с N-доменами бактериальных ферментов и при этом в большинстве своем содержат крупные вставочные фрагменты размером до 100 а.о. в шпильке между шестым и седьмым β -тяжами [105].

Характеристический фолд Р-доменов, который отличает LonA-протеазы от других серин-лизиновых пептидгидролаз (в частности, от ферментов семейств S24 и S26 клана SF) [128], в 2004 г. послужил основой для выведения всего семейства Lon (S16) в индивидуальный структурный клан SJ в базе данных MEROPS [119].

И лишь упаковка индивидуального HI(CC)-домена, образованного восемью α -спиралями

($\alpha 3$ – $\alpha 10$ в субъединице LonA), четыре из которых ($\alpha 6$ – $\alpha 9$) по предсказанию могут формировать СС-участок в протомере фермента [101], до сих пор не определена. Вместе с тем известны кристаллические структуры некоторых укороченных бактериальных LonA-протеаз, которые наряду с одним или несколькими доменами фермента включают либо пять N-концевых спиралей HI(CC)-домена (форма *EcLon* (1–245) [104]), либо три его C-концевые спирали (формы *EcLon* (235–584), *BsLon* (240–774) и *MtLon* (242–793) [103, 105, 131]). Рассмотрение всех известных структурных фрагментов LonA-протеаз, полученных с помощью рентгеновской кристаллографии, показывает, что на настоящем этапе только для *EcLon* существует набор 3D-структур тех участков фермента, которые в совокупности покрывают его полную аминокислотную последовательность (рис. 6) [104, 105, 128, 129]. Это позволяет считать *EcLon*-протеазу не только базовым ферментом, но и структурной моделью для общего пула LonA-протеаз.

Различие функций доменов, формирующих N-концевую область LonA-протеаз. Однозначное подтверждение двухдоменной организации N-концевой области LonA-протеаз было получено экспериментально на примере *EcLon*-протеазы путем сравнительного исследования функционирования фермента и его модифицированных форм. При этом были использованы рекомби-

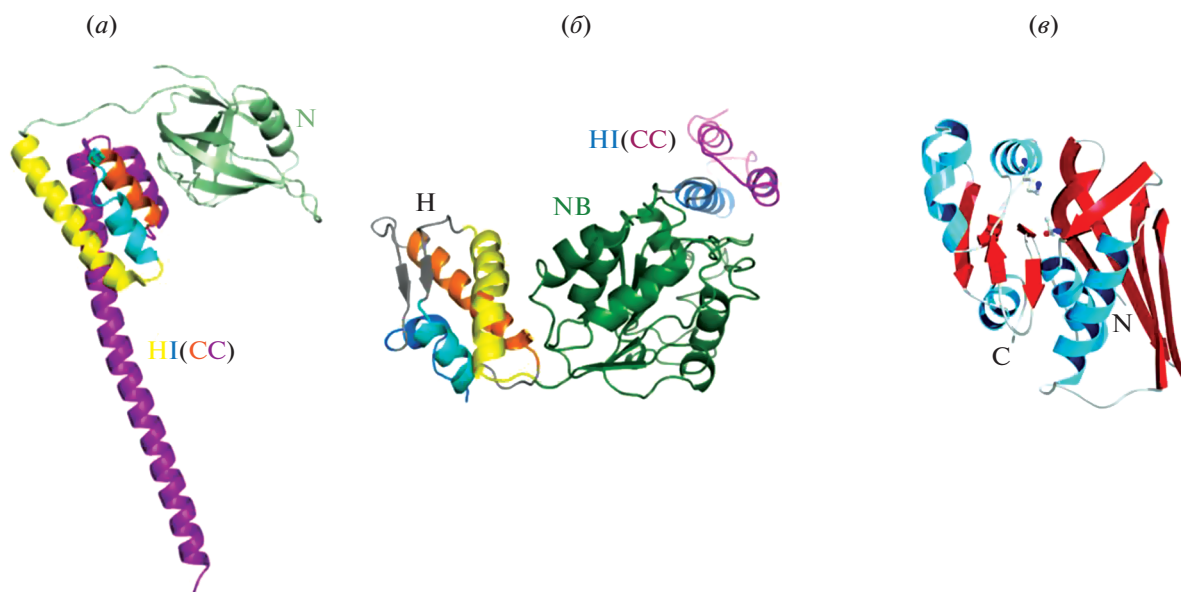


Рис. 6. Кристаллические структуры фрагментов *EcLon*-протеазы: (1–245) (а), (235–584) (б) и (585–784) (в) (по данным работ Li et al. [104], Rotanova et al. [105] и Botos et al. [128]). (а) – N-домен (M^1 – Y^{116}) показан оливковым цветом, спирали HI(CC)-домена показаны желтым ($\alpha 3$), голубым ($\alpha 4$), оранжевым ($\alpha 5$) и фиолетовым ($\alpha 6$ и $\alpha 7$, СС-участок) цветами; (б) – спирали HI(CC)-домена показаны фиолетовым ($\alpha 8$, $\alpha 9$, СС-участок) и темно-синим ($\alpha 10$) цветами, NB-домен – зеленым, спирали Н-домена окрашены так же, как спирали $\alpha(3$ – $5)$ и $\alpha 10$ HI(CC)-домена; (в) – спирали Р-домена показаны синим цветом, β -тяжи – красным.

нантная форма *EcLon*, ее укороченные модификации, не содержащие либо консервативной части N-домена (*Lon-d106*) [137], либо 172 N-концевых остатков вплоть до начала СС-участка (*Lon-d172*) [138], делеционные формы, лишенные полного HI(CC)-домена или его СС-участка (*Lon-dHI(CC)* и *Lon-d(CC)* соответственно [139, 140]), точечные мутанты с заменами потенциально важных остатков, локализованных в разных участках HI(CC)-домена (*Lon-R164A*, *Lon-R192A* и *Lon-Y294A*) [141], и тройной мутант *Lon^{EKR}*, несущий замены трех заряженных поверхностных остатков (E34, K35 и R38) в N-доме фермента [142] (рис. 7).

Изучение АТРазной, пептидазной и протеолитической активностей, а также аутолитического расщепления *EcLon*-протеазы и ее модифицированных форм, проведенное как в базовых условиях, так и при влиянии эффекторов (белковые субстраты в случае гидролиза АТР и нуклеотиды или их комплексы с ионами Mg^{2+} в случае других типов активности) показало, что оба домена N-концевой области важны для функционирования индивидуальных каталитических центров *LonA*-протеаз – АТРазного и пептидазного, а также для осуществления аллостерических взаимодействий между ними. При этом ключевую роль в реализа-

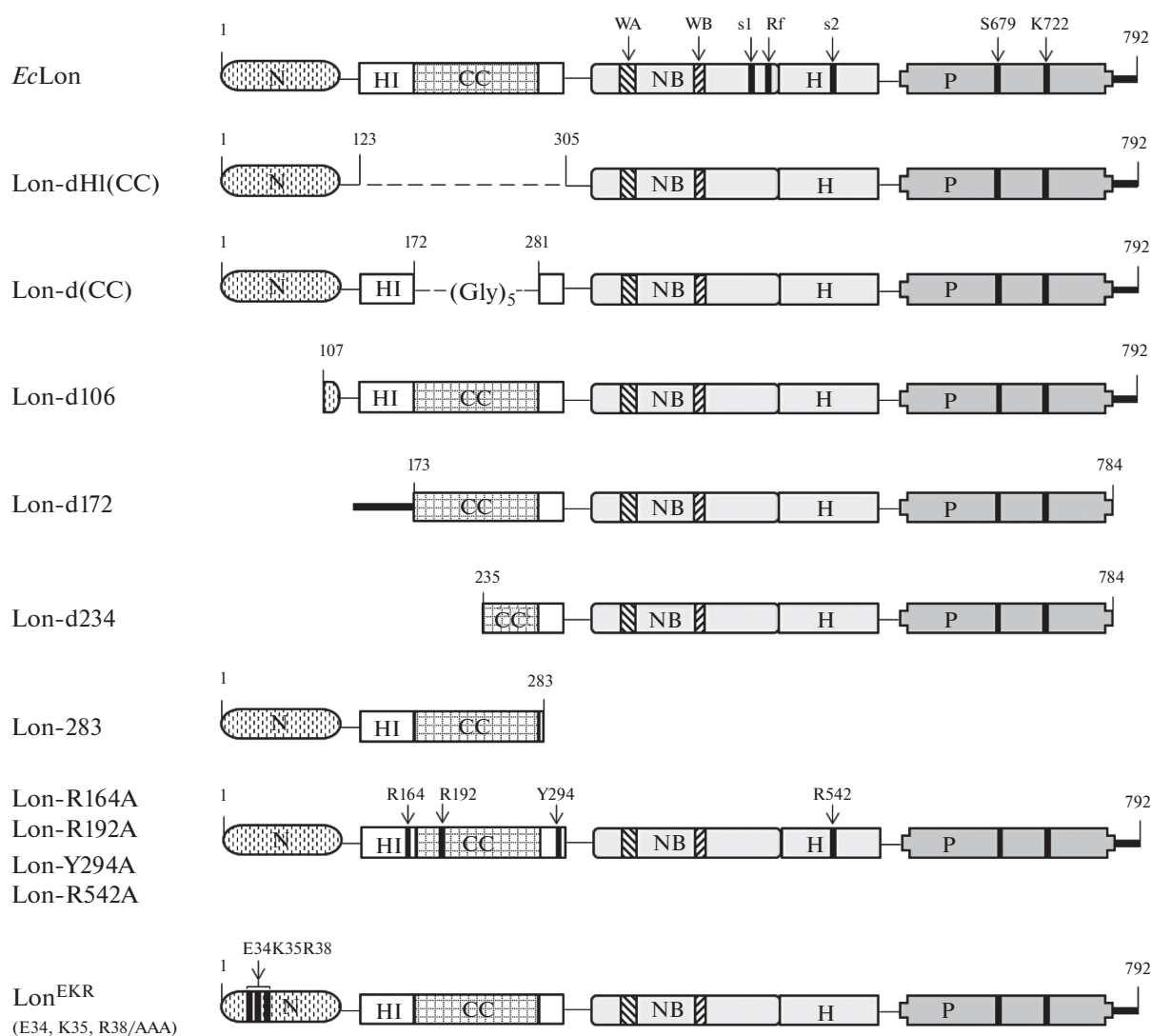


Рис. 7. Модифицированные и мутантные формы *EcLon*-протеазы, использованные для изучения вклада некаталитической N-концевой области в функционирование фермента. Консервативные элементы: WA и WB – мотивы Уолкера, s1 и s2 – сенсорные остатки, Rf – остаток “аргининовый палец”, Ser679 и Lys722 – каталитические остатки. Показаны гексагистиридиновые тэги (H6-тэги) на C-конце *EcLon* и ее различных форм (в форме *Lon-d172* H6-тэг локализован на N-конце белка).

ции уникального процессивного механизма гидролиза белкового субстрата играет инсерционный HI(CC)-домен, который вовлечен в формирование функционально активной гексамерной структуры фермента и во взаимодействия *EcLon*-протеазы с нуклеотидами и белковыми субстратами. В отношении N-домена сделано заключение о том, что его основная функция — обеспечение конформационной стабильности *EcLon*-протеазы в классических условиях сопряжения протеолиза с гидролизом АТФ.

Структурное сходство между LonA-протеазами и ClpB-шаперонами. Для получения представления о структуре инсерционного HI(CC)-домена в составе протомера фермента были предприняты попытки совмещения фрагментов *EcLon*-протеазы, представленных на рис. 6. Однако такая задача оказалась невыполнимой вследствие чрезвычайной гибкости региона, формирующего HI(CC)-домен. Тем не менее путем сравнительного анализа кристаллических структур форм *EcLon*, содержащих фрагменты HI(CC)-домена (рис. 6а, 6б), и АТР-модулей ClpB-шаперонов (рис. 8а) было показано, что LonA-протеазы могут представлять собой новый необычный подкласс AAA⁺-белков [105].

Основанием для такого анализа послужило обнаруженное сходство [100, 101, 105] первичных и вторичных структур HI(CC)-доменов LonA-протеаз и H1-доменов D1-модулей шаперонов ClpB с

внедренными в них пропеллерообразными M-доменами, обладающими CC-структурой (H1(M)-фрагмент на рис. 2). Общий специфический признак сопоставляемых фрагментов — наличие “длинных” α -спиралей (55 а.о. у LonA-протеаз и 58 а.о. у ClpB-шаперонов, рис. 6а и 8а соответственно), степень подобия которых превышает 50% при общей степени сходства CC-сегментов ~36%.

Было проведено сопоставление α -спирализованной составляющей D1-модуля ClpB-шаперона *T. thermophilus* (*TtClpB*, домены H1 и M на рис. 8б) и фрагментов *EcLon*, потенциально формирующих HI(CC)-домен фермента (рис. 8в и 8г — участки, объединенные серым фоном). Структурная эквивалентность “длинных” спиралей (L2 и $\alpha 7$), совпадение общего количества спиралей в CC-сегментах (L1–L4 и $\alpha 6$ – $\alpha 9$) и возможное сходство их топологического расположения с учетом различий в размерах малых спиралей (рис. 8б–8г) позволили выдвинуть гипотезу о том, что архитектура вставочного HI(CC)-домена LonA-протеаз может быть подобной архитектуре H1(M)-фрагмента ClpB-шаперонов [100, 101, 105].

Данные в поддержку этого предположения были получены при сравнительном изучении расположения ключевой консервативной петли *poore loop*-1 (GYVG) AAA⁺-модулей в структурах LonA-протеаз и Clp-шаперонов, проведенном путем наложения соответствующих структурных фрагментов NB-доменов LonA-протеаз на фраг-

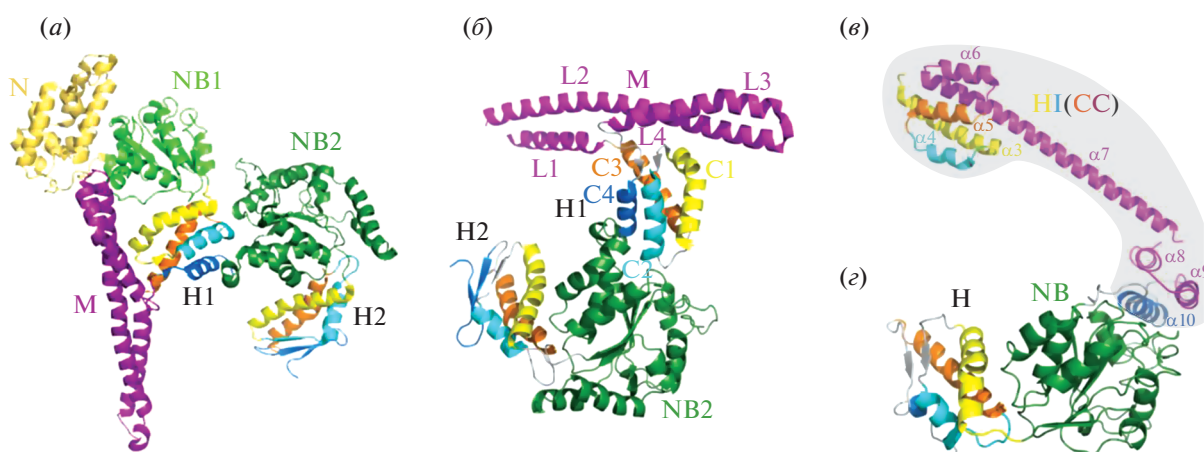


Рис. 8. Кристаллическая структура шаперона *TtClpB* (а) и сопоставление фрагмента *TtClpB* ($E^{331}-A^{854}$) (б) с фрагментами *EcLon*-протеазы ($E^{124}-D^{245}$) (в) и ($A^{247}-F^{584}$) (г), потенциально формирующими HI(CC)-домен (по данным работ Lee et al. [49] и Rotanova et al. [105]). (а) — Мономер *TtClpB*: N-домен показан золотистым цветом, NB1-домен — светло-зеленым, NB2-домен — темно-зеленым, вставочный M-домен — фиолетовым цветом; (б) — *TtClpB*, лишенный N- и NB1-доменов ($E^{331}-A^{854}$); (в) — фрагмент HI(CC)-домена *EcLon*-протеазы ($E^{124}-D^{245}$); (г) — фрагмент *EcLon* ($A^{235}-F^{584}$), включающий C-концевую часть HI(CC)-домена и AAA⁺-модуль (домены NB и H). Спирали доменов H1, H2 (*TtClpB*), HI(CC) и H (*EcLon*) окрашены как на рис. 6. Серым фоном объединены фрагменты *EcLon*, составляющие HI(CC)-домен.

менты NB1- и NB2-доменов шаперонов ClpB, а также топологически подобных им шаперонов ClpA, у которых отсутствует вставочный М-домен. При этом было установлено, что ориентация GYVG-петли в LonA-протеазах кардинально отличается от ее положения в NB1-доменах ClpB и в обоих NB-доменах ClpA (рис. 9а, 9в и 9г), но однозначно и безусловно совпадает с ее расположением в NB2-доменах ClpB (рис. 9б) [105]. Полученные результаты позволили сделать заключение о том, что и предстоящие NB-доменам α -спирализованные H1(CC)-домены LonA-протеаз, и H1(M)-фрагмен-

ты ClpB-шаперонов также могут проявлять определенное топологическое сходство.

Совокупные данные рентгеноструктурного анализа представляют достаточно обоснованные аргументы в пользу справедливости гипотезы о том, что инсерционный H1(CC)-домен можно рассматривать в качестве α -спирализованного компонента гипотетического добавочного AAA⁺-модуля, который мог локализоваться в LonA-протеазах подобно D1-модулю шаперонов ClpB (рис. 2), однако утратил свой нуклеотид-связывающий домен. На этом основании Rotanova et al. [105] предлагают признать протеазы подсемей-

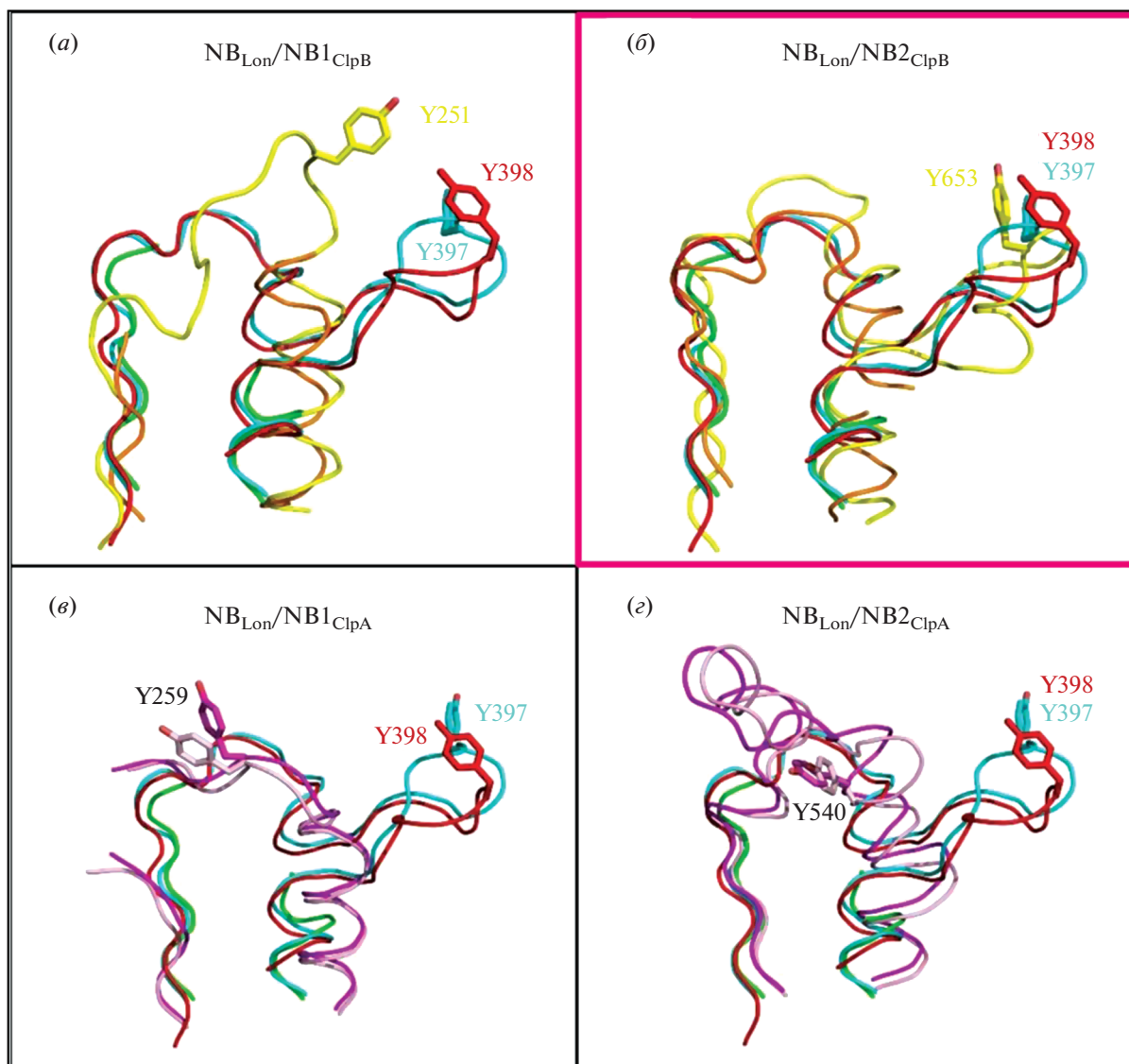


Рис. 9. Сопоставление фрагментов, включающих аксиальные петли *rope loop-1* (GYVG), в кристаллических структурах NB-доменов LonA-протеаз и NB1(NB2)-доменов шаперонов ClpA и ClpB (по данным работы Rotanova et al. [105]). Цвета фрагментов последовательностей: *EcLon* – красный, *BsLon* – ярко-зеленый, *MtLon* – голубой, *EcClpB* – желтый, *TrClpB* – оранжевый, *EcClpA-1* – розовый и *EcClpA-2* – пурпурный.

ства LonA особым, ранее неохарактеризованным подклассом AAA⁺-белков.

следований были представлены и подробно освещены на Втором симпозиуме по AAA⁺-белкам (Keystone, 2020 [143]).

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЯХ И МЕХАНИЗМАХ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ LonA-ПРОТЕАЗ И ДРУГИХ AAA⁺-БЕЛКОВ СИСТЕМЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

В самое последнее время наметился значительный прогресс в определении трехмерных структур и выявлении особенностей фундаментальных механизмов функционирования AAA⁺-белков — этих динамических молекулярных машин, которые обеспечивают структурную базу для осуществления транслокации белковых субстратов. Основой достигнутых успехов служит широкое использование криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) высокого разрешения, позволяющей визуализировать как конформационные превращения собственно AAA⁺-АТРаз, так и отдельные этапы фермент-субстратных взаимодействий у AAA⁺-протеаз системы контроля качества белков, включающие распознавание и связывание субстратов, их транслокацию и последующую деградацию. Новейшие достижения в этой области и перспективные направления новых ис-

Спиральная организация гексамеров AAA⁺-белков — базовое условие транслокации белковых мишеней/субстратов

Представление об общей архитектуре AAA⁺-белков как циклических гексамеров было получено в результате их рентгеновской кристаллографии. При этом в ряде случаев AAA⁺-белки обнаруживались в виде открытых гексамерных колец или спиралевидных комплексов, что свидетельствовало о возможности больших конформационных изменений у этих ферментов [144]. Вместе с тем вопросы о взаимодействии AAA⁺-белков со своими субстратами и о путях сопряжения АТРазной и транслокационной функций долгое время оставались неизученными.

Прорывным исследованием в этом отношении оказалась работа 2013 г. [145], в которой при помощи крио-ЭМ впервые было показано, что взаиморасположение шести субъединиц (Rpt1—Rpt6) регуляторного 19S-комплекса дрожжевой 26S-протеасомы, связанной с субстратом, представляет тип правосторонней “винтовой лестни-

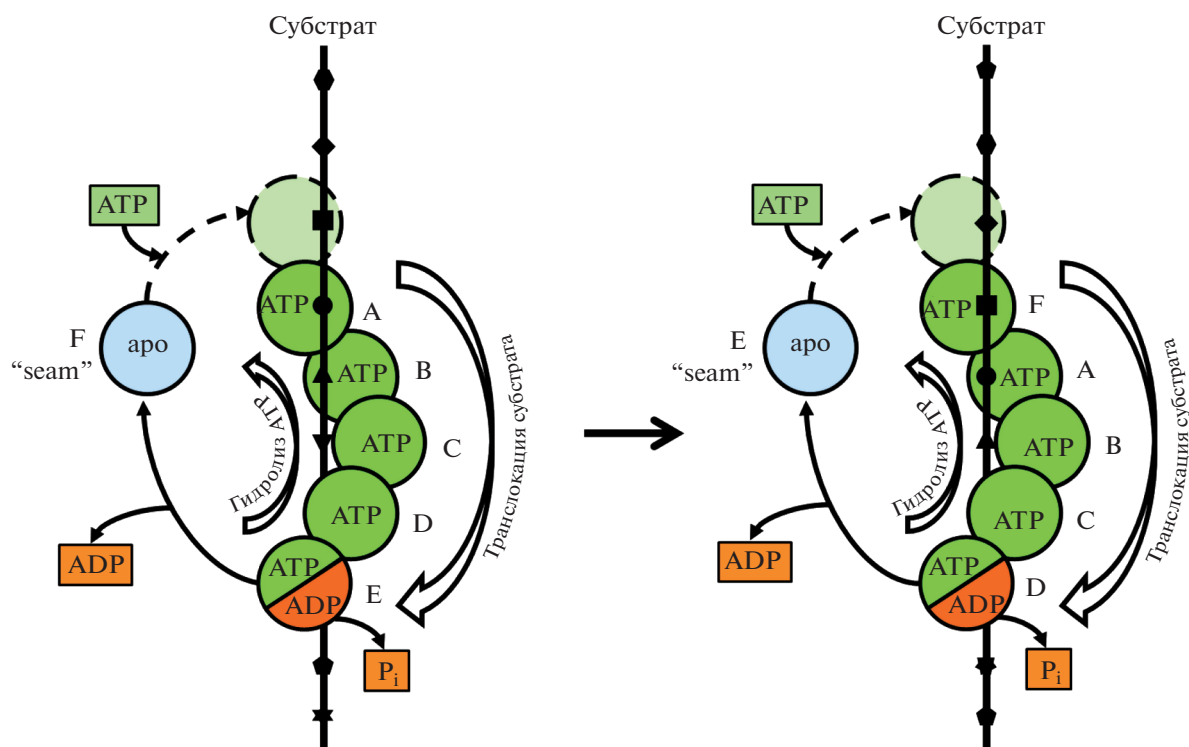


Рис. 10. Схема механизма разворачивания и последовательной транслокации полипептидного субстрата в AAA⁺-белках (по данным работ Puchades et al. [39] и Gates et al. [144]). Показано взаиморасположение протомеров (A—F) в гексамере AAA⁺-белка и их нуклеотидное состояние; отмечены сайты связывания AAA⁺-модулей в последовательности белка-субстрата; “seam” — стыковочная субъединица.

цы”. Это открытие было подтверждено в последующие годы решением крио-ЭМ-структур более чем 50 AAA⁺-белков с различной функциональностью [39, 44, 144, 146–151]. В принятой на настоящий момент модели комплекса AAA⁺-белок*S (где S — белковый субстрат) АТРазные субъединицы (или протомеры) “обволакивают” со всех сторон белковую мишень, локализованную в вертикальном центральном канале AAA⁺-белка (рис. 10) [144]. При этом пять субъединиц (А–Е), связанных с АТР, но имеющих различные конформации [144, 146, 152], непосредственно контактируют с белком-субстратом посредством петель *rope loop-1* (GYVG), обращенных внутрь канала. В то же самое время шестая субъединица F (“стыковочная”, “seam”), пребывающая сначала в ADP-связанном, а затем в аро-состоянии, оказывается свободной от субстрата и располагается между верхней (А) и нижней (Е) субъединицами (рис. 10). Установлено, что соседние субъединицы, контактирующие с субстратом, разделены расстоянием в 6 Å (дистанция в 2 а.о. в последовательности субстрата) и повернуты друг относительно друга на 60° (отражение симметричности кольцевого гексамера). Особо следует отметить, что в отсутствие субстратов AAA⁺-белки могут принимать множество различных конформаций (формируя в том числе плоские симметричные кольца), что определяется различием их экстрадоменов и/или включением в некоторых случаях дополнительных вставочных элементов структуры [39, 144, 147].

Механизм поэтапной транслокации белка-мишени, регулируемой гидролизом АТР, подтвержден для целого ряда AAA⁺-белков [39, 144, 146, 147], причем установлено, что ключевую роль в процессе транслокации играют крупномасштабные конформационные перестройки внутри AAA⁺-модулей, происходящие с участием междоменных линкеров. Аллостерическое влияние нуклеотидного состояния АТРазных субъединиц AAA⁺-гексамера приводит к различному расположению ключевых остатков тирозина петель GYVG в аксиальном канале, что обеспечивает прочный захват субстрата и реализацию последовательного кругового цикла гидролиза АТР (“around-the-ring АТР hydrolysis cycle”), первый этап которого происходит в нижней субъединице Е. Образование ADP и высвобождение фосфата дестабилизируют междоменные взаимодействия внутри этой субъединицы (в частности, за счет увеличения угла поворота между NB- и H-доменами AAA⁺-модуля) и, кроме того, ослабляют ее взаимодействия с другими субъединицами (вследствие нарушения связи ISS-мотива и остатка “аргининовый палец” с нуклеотидом соседней субъединицы). Все это приводит к отсоединению субъединицы Е как от субстрата, так и от смеж-

ной субъединицы D и ее передвижению к вершине спирали (рис. 10). Одновременно АТР-содержащие субъединицы (А–D), связанные с субстратом, продвигаются вниз по спирали в виде единой жесткой конструкции (*rigid body*), обеспечивая тем самым разворачивание и нисходящую транслокацию субстрата внутри центрального канала. Вместе с тем в отделенной на предыдущей стадии стыковочной seam-субъединице F происходит обмен ADP на АТР, и она снова становится способной к установлению стабильного взаимодействия с соседней субъединицей (А) и к связыванию с белковой мишенью в сайте, расположенном на 2 а.о. выше, чем сайт связывания субъединицы А (рис. 10). Таким образом, эта модель предполагает регулярное пошаговое перемещение AAA⁺-гексамера вдоль субстрата. При этом в каждом цикле транслокации гидролизуется одна молекула АТР, и в любой момент времени четыре субъединицы, связанные с АТР, остаются в контакте с субстратом, предотвращая его случайное “скольжение” в канале или высвобождение.

Для большей наглядности Puchades et al. [39] проводят аналогию между представленным “каскадным” механизмом транслокации и подтягиванием саней с помощью привязанной к ним веревки, когда согласованно работают шесть рук: они поочередно дотягиваются до веревки, схватывают ее и тянут (механизм “hand-over-hand” — “из руки в руку”). Руки попеременно отпускают веревку внизу и хватают ее сверху, при этом веревка все время остается плотно зажатой четырьмя “центральными” руками, и каждый цикл сопровождается тяговым усилием. Совокупность подобных движений в AAA⁺-белке обеспечивает постоянный захват и удерживание субстрата, а также его ступенчатую транслокацию, которая сочетается с последовательными круговыми циклами гидролиза АТР, протекающего в субъединицах гексамерного кольца шаперона в направлении против часовой стрелки (рис. 10).

Описанный выше основной механизм транслокации субстрата в направлении по часовой стрелке, называемый SC/2R (*Sequential Clockwise/2-Residue step*), зачастую рассматривается как универсальный для AAA⁺-белков, выполняющих разные функции [144, 146, 149]. Тем не менее существует ряд примеров функционирования белков по альтернативным механизмам. Так, транслокация белкового субстрата шапероном ClpX происходит по модели SC/6R, когда каждый цикл гидролиза АТР сопряжен с перемещением AAA⁺-гексамера сразу на 6 а.о. [153]. Кроме того, в работе Fei et al. [153] обсуждаются также модели транслокации, реализация которых приводит к изменению не только диапазона перемещения АТРазных субъединиц (вплоть до 30 а.о. и более), но и направления их передвижения (против часо-

вой стрелки). Помимо этого, для некоторых AAA⁺-шаперонов обнаружено, что цикл транслокации субстрата может быть связан с перемещением не одной, а двух стыковочных АТР-разных субъединиц [151].

*Крио-ЭМ-структуры EcLon
и других LonA-протеаз*

Проводимое в самые последние годы в ряде лабораторий изучение полноразмерных LonA-протеаз методом крио-ЭМ позволило получить новые данные о строении бактериальных ферментов из *E. coli* (*EcLon*) [154], *M. taiwanensis* (*MtLon*) [155] и *Yersinia pestis* (*YpLon*) [156], а также эукариотической LonA-протеазы человека (*HumLon*) [157]. Обнаружено, что подобно описанным выше индивидуальным AAA⁺-шаперонам АТР-разные модули протомеров LonA-протеаз, выступающие центральными фрагментами единой полипептидной цепи этих сложных ферментов, которые фланкированы N-концевыми областями и C-концевыми протеазными доменами, также формируют активные гексамерные комплексы с архитектурой “винтовой лестницы” (табл. 4).

Вместе с тем следует подчеркнуть, что долгое время даже с помощью крио-ЭМ не удавалось выявить структуру N-концевых областей полноразмерных LonA-протеаз, включающих N-домен и большую часть вставочного α -спирализованного HI(CC)-домена, вследствие высокой гибкости этого региона в протомерах ферментов (табл. 4). При этом использование электронной микроскопии низкого разрешения (ЭМ) для изучения укороченной *HumLon*-протеазы, лишенной N-домена, показало, что фрагменты HI(CC)-доменов противостоящих субъединиц фермента объединяются в димерные пары (A–D, B–E и C–F), из которых складывается тример димеров, формирующий вход в аксиальный канал, образованный AAA⁺-модулями фермента [158]. Эти данные успешно подтверждены вновь полученными с помощью крио-ЭМ структурами полноразмерных бактериальной LonA-протеазы из *Thermus thermophilus* (*TtLonA*) [159] и *HumLon*-протеазы [160, 161]. Есть основания полагать, что выявленная организация N-концевых областей LonA-протеаз топологически подобна структурам входных отверстий в аксиальные каналы, сформированным N-концевыми экстрадоменами других шаперонов-транслоказ (ClpX, ClpB, AAA⁺-АТР-азы эукариотических и архейных протеасом [88, 91, 92, 148]) (см. подраздел “Основные характеристики некаталитических экстрадоменов АТР-зависимых протеаз”). Можно ожидать, что углубленный анализ новых структур даст возможность получить также ответы на вопросы о позиции и структурной роли уникальных N-доменов LonA-

протеаз, служащих структурными аналогами PUA-доменов (см. подраздел “Различие функций доменов, формирующих N-концевую область LonA-протеаз”), но пока остаются недостаточное охарактеризованными.

На примере полноразмерной *EcLon*-протеазы методом ЭМ было также обнаружено сосуществование двух олигомерных форм фермента — гексамерной и додекамерной, где додекамеры образованы в результате непосредственного взаимодействия N-концевых областей гексамеров *EcLon* по типу “голова к голове” [154, 162, 163]. Детали структуры, механизм функционирования и биологическую значимость додекамерной формы LonA-протеаз еще предстоит выяснить.

Участники LonA-подсемейства, исследованные методом крио-ЭМ, характеризуются высоким сходством своих первичных структур (рис. 11). Так, *EcLon* и *YpLon* содержат 91.1% консервативных остатков, а общая степень подобия этих ферментов составляет 98.5%. Степень подобия между *EcLon* и *MtLon* несколько ниже — 77.9% (при 50.1% консервативных остатков), практически те же цифры характеризуют пару *EcLon/TtLon* (77.2 и 50.3%), а подобие между *EcLon* и *HumLon* составляет 70.7% (34.7% консервативных остатков). Консервативны для всех четырех ферментов 27.2% а.о. (общая степень подобия 55.4%).

Наименьший уровень сходства обнаруживают N-домены (39.3%), близки по степени подобия HI(CC)- и H-домены (50.8 и 52.8% соответственно), высокое сходство проявляют нуклеотид-связывающие и протеолитические домены (79.4 и 66.1%). Несмотря на это, в элементах вторичной структуры P-доменов *EcLon*, *YpLon* и *HumLon* обнаруживаются заметные отличия (в частности, в области каталитического остатка серина, рис. 11), что, однако, практически не нарушает их общей топологии.

Установлено (табл. 4), что в отсутствие транслоцируемого белкового субстрата спиральные гексамеры AAA⁺-модулей LonA-протеаз, включающие связанный ADP, принимают открытую левостороннюю конфигурацию [154–157, 160]. При этом *HumLon* олигомеризуется с меньшим шагом спирали, чем ее бактериальные ортологи (*EcLon* и *YpLon*) [157]. Той же левосторонней конфигурации соответствует пространственная организация протеазных доменов ферментов, причем их каталитические центры, экспонированные во внешнюю среду вследствие образования обширной полости между верхним и нижним протомерами, пребывают в неактивных конформациях (состояние фермента — “выключено”, “OFF”) [154–157, 160]. Проявляемое “аутоингибирование” активных центров протеаз позволяет предотвратить вероятную в этих условиях беспо-

Таблица 4. Характеристика структур LonA-протеаз, полученных методом крио-ЭМ

Lon-протеаза, источник, а.о., активный центр	Фрагмент с решенной структурой (XXX–YYY), мутации	Структурные данные			Характеристики LonA-протеазы		Ссылки
		PDB ID, разре- шение	условия определения		AAA ⁺ -модуль (XXX–YYY), конфигурация, (число seam- субъединиц)	протеазный домен (XXX–YYY), конформация активного центра	
			белковый субстрат; сайты связывания (ароматический остаток в петле)	лиганд			
<i>EcLon</i> , <i>Escherichia coli</i> , (1–784), S679/K722	(247–775), S679A	6U5Z, 3.50 Å	Отсутствует	ADP	(326–590), открытая левосто- ронняя “винтовая лестница”, (0)	(591–775), аутоингибированный активный центр	[154]
<i>YpLon</i> , <i>Yersinia pestis</i> , (1–784), S679/K722	(253–775)	6V11, 3.80 Å	Отсутствует	ADP	(326–590), открытая левосто- ронняя “винтовая лестница”, (0)	(591–775), аутоингибированный активный центр	[156]
	(253–775), E424Q	6ON2, 3.00 Å	Y2853 (18 кДа), 7 видимых а.о.; rope loop-1 (Y398) в протомерах A–C	АТР, ADP, Mg	Закрытая правосто- ронняя “винтовая лестница”, (2)	Функционально активный центр	
<i>MtLon</i> , <i>Meiothermus taiwanensis</i> , (1–793), S678/K721	(245–780)	6WQH, 3.60 Å	Ig2 (25 кДа), 11 видимых а.о.; rope loop-1 (Y397) в протомерах A–D, rope loop-2 (W431) в протомерах A–D	АТР-γ-S, ADP, Bortezomib	(321–594), закрытая правосто- ронняя “винтовая лестница”, (2)	(595–780), функционально активный центр	[155]

Таблица 4. Продолжение

Lon-протеаза, источник, а.о., активный центр	Фрагмент с решенной структурой (XXX–YYY), мутации	Структурные данные			Характеристики LonA-протеазы		Ссылки
		PDB ID, разре- шение	условия определения белковый субстрат; сайты связывания (ароматический остаток в петле)	лиганд	AAA ⁺ -модуль (XXX–YYY), конфигурация, (число seam- субъединиц)	протеазный домен (XXX–YYY), конформация активного центра	
<i>HumLon</i> , <i>Homo sapiens</i> , (115–959), S855/K898	(421–947)	7KSL, 3.50 Å	Отсутствует	ADP	(416–762), открытая левосто- ронняя “винтовая лестница”, (0)	(763–947), аутоингибированный активный центр	[157]
	(416–947)	7KSM, 3.2 Å	Эндогенный субстрат неизвестной струк- туры, 12 видимых а.о.; prote loop-1 (Y565) в протомерах A–E, prote loop-2 (Y599) в протомерах A, B. Субстрат связан только с AAA ⁺ -гекса- мером	АТР, ADP, Mg	Закрытая правосто- ронняя “винтовая лестница”, (1)	Аутоингибированный активный центр	
	(415–947)	7KRZ, 3.2 Å	Эндогенный субстрат неизвестной струк- туры, 12 видимых а.о.; prote loop-1 (Y565) в протомерах A–E. Субстрат связан с AAA ⁺ -гексамером и с Р-доменом	АТР, ADP, Mg, Bortezomib	Закрытая правосто- ронняя “винтовая лестница”, (1)	Функционально актив- ный центр	

Таблица 4. Окончание

Lop-протеаза, источник, а.о., активный центр	Фрагмент с решенной структурой (XXX–YYY), мутации	Структурные данные			Характеристики LopA-протеазы		Ссылки
		PDB ID, разре- шение	условия определения	лиганд	AAA ⁺ -модуль (XXX–YYY), конфигурация, (число seat- субъединиц)	протезный домен (XXX–YYY), конформация активного центра	
<i>HumLon</i> , <i>Homo sapiens</i> , (68–959), S855/K898	(410–949), G106P, R563W, K594M	7P0B, 4.11 Å	Отсутствует	ADP	(416–762), открытая левосто- ронняя “винтовая лестница”, (0)	(763–949), аутоингибированный активный центр	[160]
		7P09, 2.70 Å	TFAM (25 кДа) (фраг- мент), 11 видимых а.о.; роге loor-1 (Y565) в протомерах A–D, роге loor-2 (Y599) в протомерах A–C и E. Субстрат связан только с AAA ⁺ -гекса- мером	ATP, ADP, Mg	Закрытая правосто- ронняя “винтовая лестница”, (1)	Функционально актив- ный центр	
		7P0M, 1.75 Å	TFAM (25 кДа) (фраг- мент), 11 видимых а.о.; роге loor-1 (Y565) в протомерах A–F. Субстрат связан с AAA ⁺ -гексамером и с Р-доменом	ATP, ADP, Mg	Закрытая правосто- ронняя “винтовая лестница”, (1)	Функционально актив- ный центр с мутацией K898A. Субстрат связан с S855	

Примечание: Y2853 – белок-регулятор сенсорной трансдукции из *Y. pestis*; Ig2 – домены 5 и 6 телеобразующего фактора ABR-120 из *Dictyostelium discoideum*; TFAM – транскрипционный фактор А митохондрий; ATP-γ-S – аденозин-5'-[γ-тио]трифосфат; Vortezomib – N-[(1R)-1-(дигидроксидобрил)-3-метилбутил]-N-(пирозин-2-ил-карбонил)-L-фенилаланинамид.

Рис. 11. Сопоставление первичных и вторичных структур LonA-протеаз, для которых получены структурные данные методом крио-ЭМ. Источники LonA-протеаз: Ec – *Escherichia coli* (MER0000485), Yp – *Yersinia pestis* (MER0015528), Mt – *Meiothermus taiwanensis* (MER1037479), Tt – *Thermus thermophilus* (MER0006064), Hum – *Homo sapiens* (MER0000495). Наложение первичных структур проведено с помощью программы <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. Элементы вторичных структур ферментов представлены согласно рентгеноструктурным данным (жирный шрифт, красный цвет – α -спирали, розовый – 3_{10} -спирали, синий – β -тяжи, курсив – фрагменты, не видимые в кристаллических структурах). В последовательностях Yp, Mt и Hum обычным шрифтом показаны фрагменты, не видимые в крио-ЭМ-структурах; для Tt рентгеноструктурные данные отсутствуют. Показаны консенсусные фрагменты: мотивы Уолкера (WA и WB), петли pore loop-1 и pore loop-2 с ключевыми остатками Tug и (Met, Trp, Tyr) соответственно, ISS-фрагмент и RKN-петля, остаток сенсор-1 и сенсор-2 (s1 и s2) и “аргининовый палец” (Rf), каталитические остатки серина (S*) и лизина (K*), важный для активности остаток треонина (T*).

рядочную деградацию белковых молекул клеточного протеома.

В присутствии белка-субстрата гексамеры LonA-протеаз, содержащие также молекулы ADP, ATP (или его медленно гидролизующегося аналога ATP- γ -S) и ионы Mg^{2+} , подвергаются реорганизации в активное состояние, отвечающее за транслокацию субстрата. Эти изменения приводят к формированию вокруг транслоцируемых полипептидов закрытых спиральных правосторонних AAA^+ -конформеров и к перестройке протеазных доменов с образованием симметричных планарных структур с активными каталитическими центрами (состояние ферментов – “включено”, “ON”) [154–157, 160]. При этом в структурах ферментов их AAA^+ -кольца оказываются наклоненными по отношению к центральной оси 6-го порядка колец Р-доменов [160]. Применение борорганического ингибитора бортезомиба приводит к “закреплению” активной конформации протеазных центров [155, 157]. Показано, что конформация активного фермента сохраняется также при введении в *HumLon* мутаций как по мотиву Волкера WB, так и по каталитическому остатку лизина [157, 160]. Следует отметить, что важную роль при переходе протеазных доменов от спиральной организации к плоскому состоянию играют линкерные фрагменты, соединяющие AAA^+ -модули с Р-доменами (рис. 11). На примере *YpLon*-протеазы отмечено, что левосторонняя спираль гексамера фермента (“OFF”) значительно круче ее правостороннего конформера (“ON”) [156].

Shin et al. [156] полагают, что переход гексамера LonA-протеазы из состояния “OFF” в состояние “ON” инициируется связыванием ATP верхним протомером и взаимодействием его петли *poor loop*-1 с белковой мишенью, что обеспечивает энергию, необходимую для реализации начального этапа локального разворачивания субстрата, за которым следует процесс последовательного гидролиза ATP, сопровождающийся пошаговой транслокацией развернутого полипептида в протеазную камеру для деградации.

Описанные к настоящему времени структуры функционально активных LonA-протеаз кроме сходства общей архитектуры, определяемой конфигурацией AAA^+ -модуля, проявляют ряд заметных отличий, обусловленных, главным образом, связыванием белков-субстратов. Так, установлено, что ATPазные кольца бактериальных ферментов (*MtLon* и *YpLon*) состоят из четырех нисходящих по спирали AAA^+ -модулей, взаимодействующих с субстратом, и двух восходящих стыковочных субъединиц [155, 156], в то время как у эукариотической *HumLon*-протеазы в связывании с субстратом участвуют пять AAA^+ -модулей, и только одна субъединица выполняет функцию стыковочной

[157]. При этом в работе Gesé et al. [160] описана ATP-связанная стыковочная субъединица *HumLon*, что противоречит нуклеотидному статусу *seam*-субъединиц, соответствующему основному механизму транслокации (“apo” или комплекс с ADP) (рис. 10). Авторы считают, что обнаруженное состояние отражает промежуточную стадию, которая непосредственно следует за обменом нуклеотидов в стыковочном протомере и предшествует его повторному вовлечению в связывание субстрата.

Еще одно отличие связано с тем, что у некоторых LonA-протеаз во взаимодействии с субстратом кроме основных петель *poor loop*-1, включающих критически важный остаток Тир, могут участвовать также петли *poor loop*-2 при условии, что в них содержится остаток ароматической аминокислоты, способный к связыванию с основной цепью белка-субстрата (ферменты *MtLon* и *HumLon* в табл. 4). Дополнительные взаимодействия с петлями *poor loop*-2 позволяют визуализировать более протяженные фрагменты последовательностей связанных субстратов (7 а.о. в структуре *YpLon* и 11–12 а.о. в структурах *MtLon* или *HumLon*) [155–157, 160].

Наиболее впечатляющим различием служит тот факт, что для активации протеазных доменов у бактериальных ферментов достаточно “захвата” полипептидного субстрата только AAA^+ -модулями, в то время как для эукариотической *HumLon*-протеазы дополнительным требованием выступает взаимодействие субстрата также и с протеазными активными центрами (табл. 4) [155–157, 160]. Важная характеристика *HumLon* – наличие ATP-зависимой шапероновой активности, причем способность к сворачиванию ряда митохондриальных белковых субстратов сохраняется и у протеолитически неактивного фермента [157]. Авторы полагают, что шапероновая и протеолитическая функции – это независимо регулируемые функции *HumLon*-протеазы, а возможность дифференцированного взаимодействия субстратов с AAA^+ -модулями и Р-доменами служит проявлением функциональной пластичности, необходимой для регулирования разнообразных ролей этого фермента в митохондриях [157].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Охарактеризована система контроля качества белков (СКК), играющая ключевую роль в поддержании сохранности клеточного протеома во всех природных царствах, изложены основные сведения о строении и структурных особенностях участников СКК – молекулярных шаперонов, ATP-зависимых протеаз и мультисубъединичных комплексов, а также обобщены современные данные о структуре, функциональных свойствах и

механизме действия Lon-протеаз, представляющих одно из важнейших семейств СКК. Значительное внимание уделено характеристике ферментов подсемейства LonA, которые, как показано, можно отнести к особому подклассу AAA⁺-белков.

Отдельный раздел посвящен применению метода криоэлектронной микроскопии к изучению представителей СКК. Отмечено, что с помощью этого метода определены структуры целого ряда протеаз и шаперонов AAA⁺-суперсемейства, обладающих транслоказными свойствами, а также выявлены как общие этапы, так и различающиеся стадии в уникальных механизмах их функционирования. Несомненным успехом явилось также определение крио-ЭМ-структур полноразмерных HumLon- и TiLon-протеаз, что позволило смоделировать N-концевые области этих молекул, строение которых ранее не было известно. Однако вследствие низкого разрешения и недостаточного качества карт электронной плотности детали структур на атомном уровне в этих областях ферментов остаются нераскрытыми. При этом очевидно, что несмотря на схожесть общей ориентации характеристических длинных спиралей в HI(CC)-доменах бактериального и эукариотического ферментов, их фактическая архитектура значительно различается. В этой связи остаются актуальными дальнейшие углубленные исследования молекулярных принципов и степени консервативности механизмов действия AAA⁺-белков СКК (в том числе Lon-протеаз), поскольку они вовлечены в протекание таких процессов, как окислительный стресс, нейродегенеративные нарушения, проявление вирулентности и канцерогенез, что дает основание рассматривать их в качестве перспективных диагностических биомаркеров и терапевтических мишеней при лечении ряда патологий.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-04-00646-а — характеристика системы контроля качества клеточных белков) и Российского научного фонда (проект № 21-74-20154 — анализ структурных особенностей и механизма функционирования LonA-протеаз).

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. Balchin D., Hayer-Hartl M., Hartl F.U. // Science. 2016. V. 353. P. aac4354. <https://doi.org/10.1126/science.aac4354>
2. Gottesman S., Wickner S., Maurizi M.R. // Genes Dev. 1997. V. 11. P. 815–823. <https://doi.org/10.1101/gad.11.7.815>
3. Kovacs D., Szabo B., Pancsa R., Tompa P. // Arch. Biochem. Biophys. 2013. V. 531. P. 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.09.010>
4. Jeng W., Lee S., Sung N., Lee J., Tsai F.T.F. // F1000Res. 2015. V. 4. P. 1448. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7214.1>
5. Schubert U., Anton L.C., Gibbs J., Norbury C.C., Yewdell J.W., Bennink J.R. // Nature. 2000. V. 404. P. 770–774. <https://doi.org/10.1038/35008096>
6. Clausen L., Abildgaard A.B., Gersing S.K., Stein A., Lindorff-Larsen K., Hartmann-Petersen R. // Adv. Protein Chem. Struct. Biol. 2019. V. 114. P. 61–83. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2018.09.002>
7. Mogk A., Huber D., Bukau B. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2011. V. 3. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004366>
8. Finka A., Mattoo R.U.H., Goloubinoff P. // Annu. Rev. Biochem. 2016. V. 85. P. 715–742. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014124>
9. Мельников Э.Э., Ротанова Т.В. // Биоорг. химия. 2010. Т. 36. С. 5–14. [Melnikov E.E., Rotanova T.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2010. V. 36. P. 1–10.] <https://doi.org/10.1134/S1068162010010012>
10. Hoffmann A., Bukau B., Kramer G. // Biochim. Biophys. Acta. 2010. V. 1803. P. 650–661. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.01.017>
11. Jee H. // J. Exerc. Rehabil. 2016. V. 12. P. 255–259. <https://doi.org/10.12965/jer.1632642.321>
12. Richter K., Haslbeck M., Buchner J. // Mol. Cell. 2010. V. 40. P. 253–266. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.10.006>
13. Saibil H. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2013. V. 14. P. 630–642. <https://doi.org/10.1038/nrm3658>
14. Dahiya V., Buchner J. // Adv. Protein Chem. Struct. Biol. 2019. V. 114. P. 1–60. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2018.10.001>
15. Mattoo R.U.H., Goloubinoff P. // Cell. Mol. Life Sci. 2014. V. 71. P. 3311–3325. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1627-y>
16. Weibezahn J., Bukau B., Mogk A. // Microbial. Cell Fact. 2004. V. 3. P. 1. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-3-1>
17. Bascos N.A.D., Landry S.J. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 6195. <https://doi.org/10.3390/ijms20246195>
18. Voos W. // Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1833. P. 388–399. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.06.005>
19. Chakafana G., Zininga T., Shonhai A. // Biomolecules. 2019. V. 9. P. 543. <https://doi.org/10.3390/biom9100543>

20. *Rosenzweig R., Nillegoda N.B., Mayer M.P., Bukau B.* // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2019. V. 20. P. 665–680.
<https://doi.org/10.1038/s41580-019-0133-3>
21. *Kampinga H.H., Craig E.A.* // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2010. V. 11. P. 579–592.
<https://doi.org/10.1038/nrm2941>
22. *Takakuwa J.E., Nitika, Knighton L.E., Truman A.W.* // Front. Mol. Biosci. 2019. V. 6. P. 81.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00081>
23. *Walter S.* // Cell. Mol. Life Sci. 2002. V. 59. P. 1589–1597.
<https://doi.org/10.1007/pl00012485>
24. *Bar-Lavan Y., Shemesh N., Ben-Zvi A.* // Essays Biochem. 2016. V. 60. P. 237–253.
<https://doi.org/10.1042/EBC20160004>
25. *Taguchi H.* // J. Mol. Biol. 2015. V. 427. P. 2912–2918.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.04.007>
26. *Chaudhuri T.K., Verma V.K., Maheshwari A.* // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2009. V. 99. P. 42–50.
<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2008.10.007>
27. *Prodromou C.* // Biochem. J. 2016. V. 473. P. 2439–2452.
<https://doi.org/10.1042/BCJ20160005>
28. *Li J., Buchner J.* // Biomed. J. 2013. V. 36. P. 106–117.
<https://doi.org/10.4103/2319-4170.113230>
29. *Pearl L.H.* // Biopolymers. 2016. V. 105. P. 594–607.
<https://doi.org/10.1002/bip.22835>
30. *Luengo T.M., Mayer M.P., Rüdiger S.G.D.* // Trends Cell Biol. 2019. V. 29. P. 164–177.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.10.004>
31. *Genest O., Wickner S., Doyle S.M.* // J. Biol. Chem. 2019. V. 294. P. 2109–2120.
<https://doi.org/10.1074/jbc.REV118.002806>
32. *Haslbeck M., Vierling E.* // J. Mol. Biol. 2015. V. 427. P. 1537–1548.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.02.002>
33. *Mogk A., Ruger-Herreros C., Bukau B.* // Annu. Rev. Microbiol. 2019. V. 73. P. 89–110.
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115515>
34. *Obuchowski I., Liberek K.* // Cell Stress Chaperones. 2020. V. 25. P. 593–600.
<https://doi.org/10.1007/s12192-020-01094-0>
35. *Haslbeck M., Weinkauff S., Buchner J.* // J. Biol. Chem. 2019. V. 294. P. 2121–2132.
<https://doi.org/10.1074/jbc.REV118.002809>
36. *Riedl M., Strauch A., Catici D.A.M., Haslbeck M.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 5448.
<https://doi.org/10.3390/ijms21155448>
37. *Waters E.R., Vierling E.* // New Phytol. 2020. V. 227. P. 24–37.
<https://doi.org/10.1111/nph.16536>
38. *Neuwald A.F., Aravind L., Spouge J.L., Koonin E.V.* // Genome Res. 1999. V. 9. P. 27–43.
<https://doi.org/10.1101/gr.9.1.27>
39. *Puchades C., Sandate C.R., Lander G.C.* // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2020. V. 21. P. 43–58.
<https://doi.org/10.1038/s41580-019-0183-6>
40. *Ogura T., Wilkinson A.J.* // Genes Cells. 2001. V. 6. P. 575–597.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2001.00447.x>
41. *Dougan D.A., Mogk A., Zeth K., Turgay K., Bukau B.* // FEBS Lett. 2002. V. 529. P. 6–10.
[https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03179-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03179-4)
42. *Voos W., Jaworek W., Wilkening A., Bruderek M.* // Essays Biochem. 2016. V. 60. P. 213–225.
<https://doi.org/10.1042/EBC20160009>
43. *Abrahão J., Mokry D.Z., Ramos C.H.I.* // Front. Mol. Biosci. 2017. V. 4. P. 60.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00060>
44. *Yokom A.L., Gates S.N., Jackrel M.E., Mack K.L., Su M., Shorter J., Southworth D.R.* // Nat. Struct. Mol. Biol. 2016. V. 23. P. 830–837.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.3277>
45. *Barends T.R., Werbeck N.D., Reinstein J.* // Curr. Opin. Struct. Biol. 2010. V. 20. P. 46–53.
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.12.014>
46. *Miller J.M., Lin J., Li T., Lucius A.L.* // J. Mol. Biol. 2013. V. 425. P. 2795–2812.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.04.019>
47. *Doyle S.M., Wickner S.* // Trends Biochem. Sci. 2009. V. 34. P. 40–48.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.09.010>
48. *Zolkiewski M., Zhang T., Nagy M.* // Arch. Biochem. Biophys. 2012. V. 520. P. 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.01.012>
49. *Lee S., Sowa M.E., Watanabe Y.H., Sigler P.B., Chiu W., Yoshida M., Tsai F.T.* // Cell. 2003. V. 115. P. 229–240.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00807-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00807-9)
50. *Schramm F.D., Schroeder K., Jonas K.* // FEMS Microbiol. Rev. 2020. V. 44. P. 54–72.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuz026>
51. *Voos W.* // Res. Microbiol. 2009. V. 160. P. 718–725.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.08.003>
52. *Mogk A., Kummer E., Bukau B.* // Front. Mol. Biosci. 2015. V. 2. P. 22.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2015.00022>
53. *Watanabe Y.H., Nakazaki Y., Suno R., Yoshida M.* // Biochem. J. 2009. V. 421. P. 71–77.
<https://doi.org/10.1042/BJ20082238>
54. *Gottesman S.* // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2003. V. 19. P. 565–587.
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.110701.153228>
55. *Koodathingal P., Jaffe N.E., Kraut D.A., Prakash S., Fishbain S., Herman C., Matouschek A.* // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. P. 18674–18684.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M900783200>
56. *Sauer R.T., Baker T.A.* // Annu. Rev. Biochem. 2011. V. 80. P. 587–612.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060408-172623>
57. *Mahmoud S.A., Chien P.* // Annu. Rev. Biochem. 2018. V. 87. P. 677–696.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012848>
58. *Maupin-Furlow J.A.* // Subcell Biochem. 2013. V. 66. P. 297–327.
https://doi.org/10.1007/978-94-007-5940-4_11
59. *Ciechanover A.* // Cell. 1994. V. 79. P. 13–21.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90396-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90396-4)

60. Bard J.A.M., Goodall E.A., Greene E.R., Jonsson E., Dong K.C., Martin A. // *Annu. Rev. Biochem.* 2018. V. 87. P. 697–724.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-011931>
61. Ciechanover A., Stanhill A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1843. P. 86–96.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.07.007>
62. Kudriaeva A., Kuzina E.S., Zubenko O., Smirnov I.V., Belogurov A., Jr. // *FASEB J.* 2019. V. 33. P. 6852–6866.
<https://doi.org/10.1096/fj.201802237R>
63. Iyer L.M., Leipe D.D., Koonin E.V., Aravind L. // *J. Struct. Biol.* 2004. V. 146. P. 11–31.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2003.10.010>
64. Lupas A.N., Martin J. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2002. V. 12. P. 746–753.
[https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(02\)00388-3](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(02)00388-3)
65. Chang C.W., Lee S., Tsai F.T.F. // *Front. Mol. Biosci.* 2017. V. 4. P. 27.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00027>
66. Miller J.M., Enemark E.J. // *Archaea.* 2016. V. 2016. P. 9294307.
<https://doi.org/10.1155/2016/9294307>
67. Wendler P., Ciniawsky S., Kock M., Kube S. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1823. P. 2–14.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.06.014>
68. Ogura T., Whiteheart S.W., Wilkinson A.J. // *J. Struct. Biol.* 2004. V. 146. P. 106–112.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2003.11.008>
69. Martin A., Baker T.A., Sauer R.T. // *Mol. Cell.* 2008. V. 29. P. 441–450.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.02.002>
70. Gur E., Ottofueling R., Dougan D.A. // *Subcell. Biochem.* 2013. V. 66. P. 3–33.
https://doi.org/10.1007/978-94-007-5940-4_1
71. Kirstein J., Schlothauer T., Dougan D.A., Lilie H., Tischendorf G., Mogk A., Bukau B., Turgay K. // *EMBO J.* 2006. V. 25. P. 1481–1491.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601042>
72. Mogk A., Bukau B. // *Curr. Biol.* 2004. V. 14. P. 78–80.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.12.051>
73. Ротанова Т.В., Мельников Э.Э. // Биомед. химия. 2008. Т. 54. С. 512–530. [Rotanova T.V., Melnikov E.E. // *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B. Biomed. Chem.* 2008. V. 2. P. 245–257.]
<https://doi.org/10.1134/S1990750808030049>
74. Sauer R.T., Bolon D.N., Burton B.M., Burton R.E., Flynn J.M., Grant R.A., Hersch G.L., Joshi S.A., Kenniston J.A., Levchenko I., Neher S.B., Oakes E.S., Siddiqui S.M., Wah D.A., Baker T.A. // *Cell.* 2004. V. 119. P. 9–18.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.09.020>
75. Kim Y.I., Levchenko I., Fraczkowska K., Woodruff R.V., Sauer R.T., Baker T.A. // *Nat. Struct. Biol.* 2001. V. 8. P. 230–233.
<https://doi.org/10.1038/84967>
76. Olivares A.O., Baker T.A., Sauer R.T. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2016. V. 14. P. 33–44.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.4>
77. Kirstein J., Moliere N., Dougan D.A., Turgay K. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2009. V. 7. P. 589–599.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2185>
78. Mukherjee S., Bree A.C., Liu J., Patrick J.E., Chien P., Kearns D.B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. P. 250–255.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1417419112>
79. Lo J.H., Baker T.A., Sauer R.T. // *Protein Sci.* 2001. V. 10. P. 551–559.
<https://doi.org/10.1110/ps.41401>
80. Kojetin D.J., McLaughlin P.D., Thompson R.J., Dubnau D., Prepiak P., Rance M., Cavanagh J. // *J. Mol. Biol.* 2009. V. 387. P. 639–652.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.01.046>
81. Elsholz A.K.W., Birk M.S., Charpentier E., Turgay K. // *Front. Mol. Biosci.* 2017. V. 4. P. 44.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00044>
82. Hinnerwisch J., Reid B.G., Fenton W.A., Horwich A.L. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 40838–40844.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M507879200>
83. Dougan D.A., Reid B.G., Horwich A.L., Bukau B. // *Mol. Cell.* 2002. V. 9. P. 673–683.
[https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00485-9](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00485-9)
84. Wang F., Mei Z., Qi Y., Yan C., Qi H., Wang J., Shi Y. // *Nature.* 2011. V. 471. P. 331–335.
<https://doi.org/10.1038/nature09780>
85. Mogk A., Schlieker C., Strub C., Rist W., Weibezahn J., Bukau B. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 17615–17624.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M209686200>
86. Cashikar A.G., Schirmer E.C., Hattendorf D.A., Glover J.R., Ramakrishnan M.S., Ware D.M., Lindquist S.L. // *Mol. Cell.* 2002. V. 9. P. 751–760.
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00499-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00499-9)
87. Wendler P., Shorter J., Snead D., Plisson C., Clare D.K., Lindquist S., Saibil H.R. // *Mol. Cell.* 2009. V. 34. P. 81–92.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.02.026>
88. Donaldson L.W., Wojtyra U., Houry W.A. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 48991–48996.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M307826200>
89. Miethke M., Hecker M., Gerth U. // *J. Bacteriol.* 2006. V. 188. P. 4610–4619.
<https://doi.org/10.1128/JB.00287-06>
90. Tomko R.J., Jr., Hochstrasser M. // *Cell Biochem. Biophys.* 2011. V. 60. P. 13–20.
<https://doi.org/10.1007/s12013-011-9178-4>
91. Zhang F., Hu M., Tian G., Zhang P., Finley D., Jeffrey P.D., Shi Y. // *Mol. Cell.* 2009. V. 34. P. 473–484.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.021>
92. Djuranovic S., Hartmann M.D., Habeck M., Ursinus A., Zwickl P., Martin J., Lupas A.N., Zeth K. // *Mol. Cell.* 2009. V. 34. P. 580–590.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.030>
93. Zhang F., Wu Z., Zhang P., Tian G., Finley D., Shi Y. // *Mol. Cell.* 2009. V. 34. P. 485–496.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.022>
94. Sousa M.C., Trame C.B., Tsuruta H., Wilbanks S.M., Reddy V.S., McKay D.B. // *Cell.* 2000. V. 103. P. 633–643.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00166-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00166-5)

95. Sundar S., Baker T.A., Sauer R.T. // *Protein Sci.* 2012. V. 21. P. 188–198.
<https://doi.org/10.1002/pro.2001>
96. Scharfenberg F., Serek-Heuberger J., Coles M., Hartmann M.D., Habeck M., Martin J., Lupas A.N., Alva V. // *J. Mol. Biol.* 2015. V. 427. P. 910–923.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.12.024>
97. Ramelot T.A., Yang Y., Sahu I.D., Lee H.W., Xiao R., Lorigan G.A., Montelione G.T., Kennedy M.A. // *FEBS Lett.* 2013. V. 587. P. 3522–3528.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.09.009>
98. An J.Y., Sharif H., Kang G.B., Park K.J., Lee J.G., Lee S., Jin M.S., Song J.J., Wang J., Eom S.H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018. V. 495. P. 1201–1207.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.158>
99. Langklotz S., Baumann U., Narberhaus F. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1823. P. 40–48.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.08.015>
100. Rotanova T.V., Melnikov E.E., Khalatova A.G., Makhovskaya O.V., Botos I., Wlodawer A., Gustchina A. // *Eur. J. Biochem.* 2004. V. 271. P. 4865–4871.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04452.x>
101. Ротанова Т.В., Дергоусова Н.И., Морозкин А.Д. // *Биоорг. химия.* 2013. Т. 39. С. 303–319. [Rotanova T.V., Dergousova N.I., Morozkin A.D. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2013. V. 39. P. 268–282.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162013030114>
102. Li M., Rasulova F., Melnikov E.E., Rotanova T.V., Gustchina A., Maurizi M.R., Wlodawer A. // *Protein Sci.* 2005. V. 14. P. 2895–2900.
<https://doi.org/10.1110/ps.051736805>
103. Duman R.E., Löwe J. // *J. Mol. Biol.* 2010. V. 401. P. 653–670.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.06.030>
104. Li M., Gustchina A., Rasulova F.S., Melnikov E.E., Maurizi M.R., Rotanova T.V., Dauter Z., Wlodawer A. // *Acta Cryst.* 2010. V. 66. P. 865–873.
<https://doi.org/10.1107/S090744491001955>
105. Rotanova T.V., Andrianova A.G., Kudzhayev A.M., Li M., Botos I., Wlodawer A., Gustchina A. // *FEBS Open Bio.* 2019. V. 9. P. 1536–1551.
<https://doi.org/10.1002/2211-5463.12691>
106. Маховская О.В., Козлов С., Ботос И., Степнов А.А., Андрианова А.Г., Гущина А.Е., Влодавер А., Мельников Э.Э., Ротанова Т.В. // *Биоорг. химия.* 2007. Т. 33. С. 657–660. [Makhovskaya O.V., Kozlov S., Botos I., Stepnov A.A., Andrianova A.G., Gustchina A.E., Wlodawer A., Melnikov E.E., Rotanova T.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2007. V. 33. P. 610–613.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162007060131>
107. Liao J.H., Kuo C.I., Huang Y.Y., Lin Y.C., Lin Y.C., Yang C.Y., Wu W.L., Chang W.H., Liaw Y.C., Lin L.H., Chang C.I., Wu S.H., Liao J.H., Kuo C.I., Huang Y.Y., Lin Y.C., Lin Y.C. // *PLoS One.* 2012. V. 7. e40226.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040226>
108. Li J.K., Liao J.H., Li H., Kuo C.I., Huang K.F., Yang L.W., Wu S.H., Chang C.I. // *Acta Cryst.* 2013. V. 69. P. 1789–1797.
<https://doi.org/10.1107/S090744491301500X>
109. Gur E., Sauer R.T. // *Genes Dev.* 2008. V. 22. P. 2267–2277.
<https://doi.org/10.1101/gad.1670908>
110. Ngo J.K., Pomatto L.C.D., Davies K.J.A. // *Redox Biol.* 2013. V. 1. P. 258–264.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.01.015>
111. Cheng C.W., Kuo C.Y., Fan C.C., Fang W.C., Jiang S.S., Lo Y.K., Wang T.Y., Kao M.C., Lee A.Y.L. // *Cell Death Dis.* 2013. V. 4. e681.
<https://doi.org/10.1038/cddis.2013.204>
112. Liu Y., Lan L., Huang K., Wang R., Xu C., Shi Y., Wu X., Wu Z., Zhang J., Chen L., Wang L., Yu X., Zhu H., Lu B. // *Oncotarget.* 2014. V. 5. P. 11209–11224.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.2026>
113. Bulteau A.L., Bayot A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. V. 1807. P. 595–601.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2010.12.011>
114. Voos W., Pollecker K. // *Biomolecules.* 2020. V. 10. P. 253.
<https://doi.org/10.3390/biom10020253>
115. Lu B. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017. V. 1038. P. 8173–8182.
https://doi.org/10.1007/978-981-10-6674-0_12
116. Pinti M., Gibellini L., Liu Y., Xu S., Lu B., Cossarizza A. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2015. V. 72. P. 4807–4824.
<https://doi.org/10.1007/s00018-015-2039-3>
117. Quiros P.M., Espanol Y., Acin-Perez R., Rodriguez F., Barcena C., Watanabe K., Calvo E., Loureiro M., Fernandez-Garcia M.S., Fueyo A., Vazquez J., Enriquez J.A., Lopez-Otin C. // *Cell Rep.* 2014. V. 8. P. 542–556.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.018>
118. Bota D.A., Davies K.J.A. // *Free Rad. Biol. Med.* 2016. V. 100. P. 188–198.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.031>
119. Rawlings N.D., Barrett A.J., Thomas P.D., Huang X., Bateman A., Finn R.D. // *Nucl. Acids Res.* 2018. V. 46. P. 624–632.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>
120. Swamy K.S., Goldberg A.L. // *Nature.* 1981. V. 292. P. 652–654.
<https://doi.org/10.1038/292652a0>
121. Liao J.H., Ihara K., Kuo C.I., Huang K.F., Wakatsuki S., Wu S.H., Chang C.I. // *Acta Cryst.* 2013. V. 69. P. 1395–1402.
<https://doi.org/10.1107/S0907444913008214>
122. Bittner L.M., Arends J., Narberhaus F. // *Biopolymers.* 2016. V. 105. P. 505–517.
<https://doi.org/10.1002/bip.22831>
123. Goldberg A.L., Waxman L. // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. P. 12029–12034.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)38980-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)38980-9)
124. Patterson-Ward J., Tedesco J., Hudak J., Fishovitz J., Becker J., Frase H., McNamara K., Lee I. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. V. 1794. P. 1355–1363.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.02.015>
125. Vineyard D., Patterson-Ward J., Berdis A.J., Lee I. // *Biochemistry.* 2005. V. 44. P. 1671–1682.
<https://doi.org/10.1021/bi048618z>

126. Besche H., Tamura N., Tamura T., Zwickl P. // FEBS Lett. 2004. V. 574. P. 161–166.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.08.021>
127. Botos I., Melnikov E.E., Cherry S., Kozlov S., Makhovskaya O.V., Tropea J.E., Gustchina A., Rotanova T.V., Wlodawer A. // J. Mol. Biol. 2005. V. 351. P. 144–157.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.06.008>
128. Botos I., Melnikov E.E., Cherry S., Tropea J., Khalatova A.G., Rasulova F.S., Dauter Z., Maurizi M.R., Rotanova T.V., Wlodawer A., Gustchina A. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 8140–8148.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M312243200>
129. Botos I., Melnikov E.E., Cherry S., Khalatova A.G., Rasulova F.S., Tropea J.E., Maurizi M.R., Rotanova T.V., Gustchina A., Wlodawer A. // J. Struct. Biol. 2004. V. 146. P. 113–122.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2003.09.003>
130. Lee A.Y., Chen Y.D., Chang Y.Y., Lin Y.C., Chang C.F., Huang S.J., Wu S.H., Hsu C.H. // Acta Cryst. 2014. V. 70. P. 218–230.
<https://doi.org/10.1107/S139900471302631X>
131. Lin C.C., Su S.C., Su M.Y., Liang P.H., Feng C.C., Wu S.H., Chang C.I. // Structure. 2016. V. 24. P. 667–675.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2016.03.001>
132. Tzeng S.R., Tseng Y.C., Lin C.C., Hsu C.Y., Huang S.J., Kuo Y.T., Chang C.I. // eLife. 2021. V. 10. P. e64056.
<https://doi.org/10.7554/eLife.64056>
133. Su S.C., Lin C.C., Tai H.C., Chang M.Y., Ho M.R., Babu C.S., Liao J.H., Wu S.H., Chang Y.C., Lin C., Chang C.I. // Structure. 2016. V. 24. P. 676–686.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2016.03.003>
134. Chen X., Zhang S., Bi F., Guo C., Feng L., Wang H., Yao H., Lin D. // Protein Sci. 2019. V. 28. P. 1720–1726.
<https://doi.org/10.1002/pro.3687>
135. Garcia-Nafria J., Ondrovicova G., Blagova E., Levdikov V.M., Bauer J.A., Suzuki C.K., Kutejova E., Wilkinson A.J., Wilson K.S. // Protein Sci. 2010. V. 19. P. 987–999.
<https://doi.org/10.1002/pro.376>
136. Bertonati C., Punta M., Fischer M., Yachdav G., Forouhar F., Zhou W., Kuzin A.P., Seetharaman J., Abashidze M., Ramelot T.A., Kennedy M.A., Cort J.R., Belachew A., Hunt J.F., Tong L., Montelione G.T., Rost B. // Proteins. 2009. V. 75. P. 760–773.
<https://doi.org/10.1002/prot.22287>
137. Куджаев А.М., Дубовцева Е.С., Серова О.В., Андрианова А.Г., Ротанова Т.В. // Биоорг. химия. 2016. Т. 42. С. 421–430. [Kudzhaev A.M., Dubovtseva E.S., Serova O.V., Andrianova A.G., Rotanova T.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2016. V. 42. P. 381–388.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162016040142>
138. Андрианова А.Г., Куджаев А.М., Дубовцева Е.С., Ротанова Т.В. // Биоорг. химия. 2017. Т. 43. С. 357–366. [Andrianova A.G., Kudzhaev A.M., Dubovtseva E.S., Rotanova T.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2017. V. 43. P. 368–376.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162017040021>
139. Куджаев А.М., Андрианова А.Г., Дубовцева Е.С., Серова О.В., Ротанова Т.В. // Acta Naturae. 2017. Т. 9. С. 79–86. [Kudzhaev A.M., Andrianova A.G., Dubovtseva E.S., Serova O.V., Rotanova T.V. // Acta Naturae. 2017. V. 9. P. 75–81.]
<https://doi.org/10.32607/20758251-2017-9-2-75-81>
140. Куджаев А.М., Дубовцева Е.С., Серова О.В., Андрианова А.Г., Ротанова Т.В. // Биоорг. химия. 2018. Т. 44. С. 522–532. [Kudzhaev A.M., Dubovtseva E.S., Serova O.V., Andrianova A.G., Rotanova T.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. P. 518–527.]
<https://doi.org/10.1134/S0132342318050081>
141. Куджаев А.М., Андрианова А.Г., Серова О.В., Архипова В.А., Дубовцева Е.С., Ротанова Т.В. // Биоорг. химия. 2015. Т. 41. С. 579–586. [Kudzhaev A.M., Andrianova A.G., Serova O.V., Arkhipova V.A., Dubovtseva E.S., Rotanova T.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2015. V. 41. P. 518–524.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162015050076>
142. Андрианова А.Г., Куджаев А.М., Абрикосова В.А., Гущина А.Е., Смирнов И.В., Ротанова Т.В. // Acta Naturae. 2020. Т. 12. С. 86–97. [Andrianova A.G., Kudzhaev A.M., Abrikosova V.A., Gustchina A., Smirnov I.V., Rotanova T.V. // Acta Naturae. 2020. V. 12. P. 102–113.]
<https://doi.org/10.32607/actanaturae.11197>
143. Glynn S.E., Kardon J.L., Mueller-Cajar O., Cho C. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2020. V. 27. P. 515–518.
<https://doi.org/10.1038/s41594-020-0444-2>
144. Gates S.N., Martin A. // Protein Sci. 2019. V. 29. P. 407–419.
<https://doi.org/10.1002/pro.3743>
145. Matyskiela M.E., Lander G.C., Martin A. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2013. V. 20. P. 781–788.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.2616>
146. Puchades C., Rampello A.J., Shin M., Giuliano C.J., Wiseman R.L., Glynn S.E., Lander G.C. // Science. 2017. V. 358. P. eaao0464.
<https://doi.org/10.1126/science.aao0464>
147. Uchihashi T., Watanabe Y.H., Nakazaki Y., Yamasaki T., Watanabe H., Maruno T., Ishii K., Uchiyama S., Song C.H., Murata K., Iino R., Ando T. // Nat. Commun. 2018. V. 9. P. 2147.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-04587-w>
148. Rizo A.N., Lin J.B., Gates S.N., Tse E., Bart S.M., Castellano L.M., DiMaio F., Shorter J., Southworth D.R. // Nat. Commun. 2019. V. 10. P. 2393.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-10150-y>
149. Majumder P., Rudack T., Beck F., Danev R., Pfeifer G., Nagy I., Baumeister W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2019. V. 116. P. 534–539.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1817752116>
150. Lee S., Roh S.H., Lee J., Sung N., Liu J., Tsai F.T.F. // Cell Rep. 2019. V. 26. P. 29–36.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.037>
151. Zhang S., Mao Y. // Biomolecules. 2020. V. 10. P. 629.
<https://doi.org/10.3390/biom10040629>
152. de la Pena A.H., Goodall E.A., Gates S.N., Lander G.C., Martin A. // Science. 2018. V. 362. P. eaav0725.
<https://doi.org/10.1126/science.aav0725>
153. Fei X., Bell T.A., Jenni S., Stinson B.M., Baker T.A., Harrison S.C., Sauer R.T. // eLife. 2020. V. 9. P. e52774.
<https://doi.org/10.7554/eLife.52774>
154. Botos I., Lountos G.T., Wu W., Cherry S., Ghirlando R., Kudzhaev A.M., Rotanova T.V., de Val N., Tropea J.,

- Gustchina A., Wlodawer A.* // *Curr. Res. Struct. Biol.* 2019. V. 1. P. 13–20.
<https://doi.org/10.1016/j.crstbi.2019.10.001>
155. *Li S., Hsieh K.Y., Su S.C., Pintilie G.D., Zhang K., Chang C.I.* // *J. Biol. Chem.* 2021. V. 297. P. 101239.
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101239>
156. *Shin M., Puchades C., Asmita A., Puri N., Adjei E., Wiseman R.L., Karzai A.W., Lander G.C.* // *Sci. Adv.* 2020. V. 6. P. eaba8404.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aba8404>
157. *Shin M., Watson E.R., Song A.S., Mindrebo J.T., Novick S.J., Griffin P.R., Wiseman R.L., Lander G.C.* // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. P. 3239.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-23495-0>
158. *Kereiche S., Kovacik L., Bednar J., Pevala V., Kunova N., Ondrovicova G., Bauer J., Ambro L., Bellova J., Kutejova E., Raska I.* // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 33631.
<https://doi.org/10.1038/srep33631>
159. *Coscia F., Löwe J.* // *FEBS Lett.* 2021. V. 595. P. 2691–2700.
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.14199>
160. *Gesé G.V., Shahzad S., Pardo-Hernández C., Wramstedt A., Falkenberg M., Hällberg B.M.* // *bioRxiv.* 2021.
<https://doi.org/10.1101/2021.1106.1109.447696>
161. *Mohammed I., Schmitz K.A., Schenck N., Topitsch A., Maier T., Abrahams J.P.* // *bioRxiv.* 2021.
<https://doi.org/10.1101/2021.1107.1128.454137>
162. *Vieux E.F., Wohlever M.L., Chen J.Z., Sauer R.T., Baker T.A.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. P. 2002–2008.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1307066110>
163. *Brown B.L., Vieux E.F., Kalastavadi T., Kim S.R., Chen J.Z., Baker T.A.* // *Protein Sci.* 2018. V. 28. P. 1239–1251.
<https://doi.org/10.1002/pro.3553>

ATP-Dependent Lon Proteases in the Cellular Protein Quality Control System

A. M. Kudzhaev*, A. G. Andrianova*, A. E. Gustchina**, I. V. Smirnov*, and T. V. Rotanova*, #

*Phone: +7(495)335-42-22; e-mail: tatyana.rotanova@ibch.ru

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
 ul. Mikluho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

**Protein Structure Section, Center for Structural Biology, National Cancer Institute, Frederick, MD 21702, USA

The Protein Quality Control (PQC) system plays a leading role in maintaining the safety of the cellular proteome in all natural kingdoms. This review summarizes information about the structural and functional characteristics of molecular chaperones and energy-dependent proteases that form the PQC system, emphasizing the crucial role of proteins belonging to the AAA⁺ superfamily, with the focus on ATP-dependent Lon proteases as a special family in the PQC. Similarities and differences among the enzymes of individual Lon subfamilies are discussed in detail using up-to-date data, elucidating the structural features and unique mechanisms of functioning of these proteins.

Keywords: Protein Quality Control system, AAA⁺ proteins, molecular chaperones, ATP-dependent proteolysis, Lon proteases, 3D structure, cryo-EM



УДК 535.37+57.088+612.014.46+616.155.34

ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЕ ЗОНДЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ХЛОРНОВАТИСТОЙ КИСЛОТЫ В ЖИВЫХ КЛЕТКАХ¹

© 2022 г. В. Е. Реут*, И. В. Горудко*, Д. В. Григорьева*,
А. В. Соколов**, ***, О. М. Панасенко***, #

*Белорусский государственный университет, Беларусь, 220030 Минск, просп. Независимости, 4

**ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины”,
Россия, 197376 Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

***ФГБУ “Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины” ФМБА России,
Россия, 119435 Москва, ул. Малая Пироговская, 1а

Поступила в редакцию 02.08.2021 г.

После доработки 12.10.2021 г.

Принята к публикации 22.11.2021 г.

Хлорноватистая кислота (НОСІ) играет роль в иммунных (воспалительных) реакциях не только при защите организма от патогенов, но и в силу высокой реакционной способности провоцирует развитие и осложнение многих заболеваний. Актуальная задача — разработка высокочувствительных и избирательных по отношению к НОСІ биосенсоров, включая флуоресцентные зонды. Тем не менее регистрация образования НОСІ в биологических объектах сопряжена с рядом трудностей. Так, нестабильность используемых в настоящее время зондов или их цитотоксичность, а также возбуждение флуоресценции в ультрафиолетовой области спектра или в полосах поглощения основных клеточных белков делают поиск новых хемосенсоров актуальной задачей на протяжении многих лет. В данном обзоре рассмотрены вопросы классификации малых молекулярных зондов для регистрации НОСІ в биологических системах, а также обобщены результаты разработки хемосенсоров. Особое внимание уделено достижениям в этой области за 2016–2021 гг. Сформулирован ряд проблем, касающихся конструирования и применения малых молекулярных зондов. Ввиду отсутствия “золотого стандарта” среди хемосенсоров НОСІ, что связано в том числе с коммерческой недоступностью либо сложными методами синтеза новых сенсоров, даны рекомендации по области применения упомянутых хемосенсоров. Обозначены тенденции в разработке флуоресцентных хемосенсоров для визуализации продукции НОСІ в живых клетках.

Ключевые слова: флуоресценция, флуоресцентные зонды, активные формы кислорода, активные формы галогенов, хлорноватистая кислота, хемосенсоры

DOI: 10.31857/S0132342322030162

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....416

Типы молекулярных флуоресцентных зондов для регистрации НОСІ.....417

Классификация зондов по сайтам реакции.....417

Классификация зондов по типу

флуоресцентного ответа.....418

Классификация зондов по типу флуорофора.....419

Предпосылки к разработке современных флуоресцентных хемосенсоров.....420

Зонды “включения” и “выключения”.....420

¹ Дополнительные материалы для этой статьи доступны по doi 10.31857/S0132342322030162 для авторизованных пользователей. Сокращения: APF — аминифенил флуоресцеина; CB — целестиновый синий В; DAMN — диаминомалеонитрил; ESIPТ — внутримолекулярный перенос протонов в возбужденном состоянии; FRET — ферстеровский резонансный перенос энергии; Hcy — гомоцистеин; HeLa — клетки раковой опухоли шейки матки; HL-60 — клеточная линия острого промиелоцитарного лейкоза человека; ICT — внутримолекулярный перенос заряда; IFN-γ — интерферон гамма; LPS — липополисахариды; MPO — миелопероксидаза; PET — фотоиндуцированный перенос электронов; PMA — флорбол-12-миристан-13-ацетат; R19 — родамин 19; RAW264.7 — линия клеток трансформированных макрофагов мышей; RGNH — нафтоилгидразид родамина 6G; SNAPF — сульфонафтаминофенил флуоресцеина; TBET — передача энергии через связь; АФА — активные формы азота; АФГ — активные формы галогенов; АФК — активные формы кислорода; возб — возбуждение; исп — испускание; ПО — предел обнаружения.

Автор для связи: (тел.: +7 (499) 246-44-90; эл. почта: o-panas@mail.ru).

Переход к концепции зондов “переключения”	424
Последние достижения в разработке малых молекулярных флуоресцентных зондов для регистрации НОСІ.....	425
Зонды на основе кумарина.....	425
Зонды на основе флуоресцеина.....	427
Зонды на основе феноксазина.....	427
Зонды на основе родола.....	430
Зонды на основе 1,8-нафталимида.....	430
Иные малые молекулярные зонды.....	433
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	436
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	438

ВВЕДЕНИЕ

Активные формы кислорода (АФК), азота (АФА) и галогенов (АФГ), вырабатываемые живыми организмами, необходимы для обеспечения различных биологических функций: межклеточного взаимодействия, внутриклеточной передачи сигналов, модуляции артериального давления, контроля иммунной системы, фагоцитоза, регуляции активности ферментов и факторов транскрипции, синтеза биологических соединений, процессов метаболизма и др. [1, 2]. Однако в силу высокой реакционной способности данные соединения, модифицируя биологически важные молекулы (нуклеиновые кислоты, белки, липиды и др.), также вовлечены в патологические процессы, такие как старение, диабет, нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания, рак, катаракта, ревматоидный артрит, воспаление, ишемические и постишемические патологии [3]. Среди АФГ хлорноватистая кислота (НОСІ), вырабатываемая миелопероксидазой (МРО, КФ 1.11.2.2) — ферментом, содержащимся в основном в азурофильных гранулах нейтрофилов, в меньшем количестве в моноцитах, — участвует в реакциях как окисления, так и хлорирования и играет особую роль в защите организма от внешних патогенов [4, 5]. Стоит отметить, что значение pK_a НОСІ составляет 7.5, т.е. при физиологическом рН практически равные концентрации НОСІ и ОСІ[−] содержатся в водной среде, поэтому здесь и далее под НОСІ подразумевается смесь этих форм (НОСІ/ОСІ[−]) [6]. Повышение концентрации МРО в плазме крови, избыточное образование НОСІ и хлорированных продуктов приводят к повреждению собственных клеток и тканей организма. Многие воспалительные заболевания (например, сердечно-сосудистые, нейродегенеративные, атеросклероз, васкулит, фиброз, ревматоидный артрит, некоторые виды рака и др.) сопровождаются повышением количества и/или активности МРО, ростом продукции НОСІ и, как следствие, выявлением в биологических жидкостях пациентов с данными патологиями так называемых мар-

керов галогенирующего стресса (3-хлортирозина, 5-хлорурацила, α -хлоральдегидов, хлорированных белков и др.) [6, 7]. Ввиду исключительной роли НОСІ как в защите организма от патогенов, так и в развитии патологий, исследование кинетики образования НОСІ, ее локализации, механизмов регуляции активности МРО, выявление вклада МРО в развитие заболеваний — важные не только фундаментальные, но и прикладные задачи, направленные на профилактику, диагностику и контроль за лечением заболеваний, ассоциированных с воспалением.

Регистрация НОСІ сопряжена с рядом трудностей. НОСІ обладает высокой реакционной способностью и малым временем жизни в биологических средах. Так, константа скорости реакции НОСІ с аминокислотами цистеином и метионином превышает $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, а с гистидином, таурином, α -аминогруппами — более $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [8]. Также возможны реакции и с другими мишенями (NH_2 -группами “полярных головок” фосфатидилэтаноламина и фосфатидилсерина, ДНК, двойными связями в белках и липидах), однако они вряд ли будут играть решающую роль из-за более низких скоростей реакции. Более того, фагоциты генерируют также целый ряд других высокореакционных соединений: АФК ($\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $^1\text{O}_2$, $\text{OH}^{\cdot}$, $\text{ROO}^{\cdot}$ и др.), АФА ($\text{NO}^{\cdot}$, $\text{ONOO}^{\cdot-}$, $\text{NO}_2^{\cdot-}$, $\text{NO}_2^{\cdot}$ и др.), а также АФГ (помимо НОСІ может образовываться НОВг, хлор-, бромамины и др.) [3, 9]. Учитывая все это, становится ясным, что для регистрации продукции НОСІ в биологических системах необходимы надежные, чувствительные и селективные инструменты обнаружения, имеющие высокое пространственное и временное разрешение. Таким мощным инструментом, сочетающим простоту манипуляций и доступность, выступает флуоресцентный анализ на основе синтетических зондов (хемосенсоров) [10, 11]. Несмотря на то, что в последние годы разработано множество хемосенсоров, способных регистрировать НОСІ и другие АФК, АФГ и АФА, такие недостатки, как низкая стабильность, отсутствие специфичности их реакций с окислителями или сильное влияние восстановителей, а также цитотоксичность делают поиск новых флуоресцентных зондов, способных регистрировать НОСІ в биологических системах, по-прежнему актуальным направлением.

Большинство экспериментальных исследований и аналитических обзоров, посвященных данной тематике, сфокусированы на физико-химических аспектах взаимодействия зондов с НОСІ в бесклеточной среде, а также перспективах разработки новых зондов [10–14]. Меньше внимания уделено применению этих зондов для регистрации НОСІ в клеточных средах. Ввиду того, что ко-

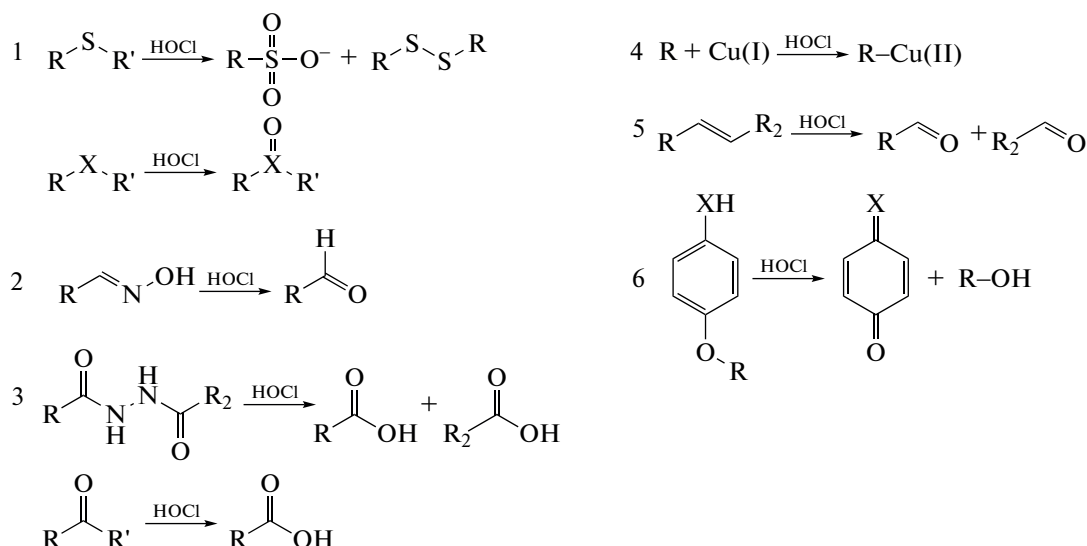


Рис. 1. Механизмы взаимодействия хемосенсоров с HOCl (R – флуорофор). Реакция HOCl: 1 – с X-содержащими соединениями (X = S, Se, Te; R' = H или алкил); 2 – с производными оксима; 3 – с гидразидами и амидами (R' = NH₂); 4 – с Cu(I)-содержащими соединениями; 5 – с ненасыщенной углерод-углеродной связью; 6 – с производными *n*-метоксифенола (X = O) и *n*-аминофенола (X = NR', R' = H или алкил). Адаптировано по данным работ [16, 22].

нежная цель разработки сенсоров – изучение вклада HOCl в физиологические и патофизиологические процессы, скрининг лекарственных препаратов, а также прогнозирование и диагностика заболеваний, крайне важны исследования возможности использования этих веществ в системах клеток/тканей/организма. В данном обзоре собрана информация о наиболее перспективных малых молекулярных флуоресцентных зондах, предназначенных для регистрации HOCl в клеточных системах. Отметим также, что некоторые вопросы применения наночастиц и квантовых точек для регистрации HOCl приведены в работах [15–17] и не будут затронуты в данном обзоре.

ТИПЫ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ HOCl

Выбор флуоресцентного зонда зависит от целей исследования, а чувствительность и избирательность зонда по отношению к аналиту (веществу, содержание которого требуется оценить, в нашем случае – HOCl) – зачастую определяющие факторы выбора сенсора. В качестве количественной меры чувствительности зонда к HOCl чаще всего используют предел обнаружения (ПО) [18]. Математическое выражение для расчета ПО выглядит так:

$$ПО = 3\sigma/k,$$

где σ – стандартное отклонение интенсивности флуоресценции раствора зонда в отсутствие HOCl, k – тангенс угла наклона калибровочной кривой зависимости интенсивности флуоресценции от

концентрации HOCl [19]. Под избирательностью понимают предпочтительное взаимодействие зонда с HOCl по сравнению с прочими соединениями. Чаще всего в экспериментальных статьях чувствительным зонд признают в случае, когда изменение интенсивности его флуоресценции при действии HOCl значительно больше, чем при действии других присутствующих высокореакционных соединений. Чувствительность и избирательность зонда могут ограничивать как используемый химический механизм преобразования сенсора, так и тип преобразования флуоресцентного ответа или использование конкретных флуорофоров.

Классификация зондов по сайтам реакции

Разработка флуоресцентных зондов для регистрации HOCl основана на окислительно-восстановительных реакциях или реакциях замещения между HOCl и хемосенсором. Примеры некоторых основных реакций HOCl с функциональными группами флуоресцентных зондов представлены на рис. 1:

1) серосодержащие соединения окисляются под воздействием HOCl с образованием сульфонов, дисульфидов или сульфоксидов, селен- и теллур-содержащие – до селен- и теллуридов соответственно (рис. 1, 1) [20];

2) производные оксима окисляются HOCl до альдегидов (рис. 1, 2) [21, 22];

3) гидразины и амиды хлорируются под действием HOCl с последующим гидролизом в вод-

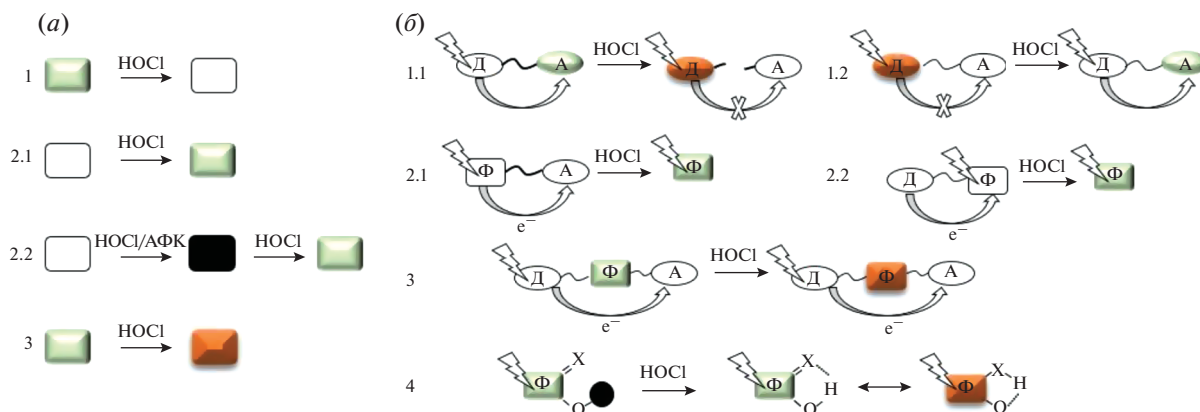


Рис. 2. Типы и механизмы флуоресцентного ответа датчиков. (а) — Общий вид типов флуоресцентного ответа: 1 — “выключения”, 2.1 — “включения”, 2.2 — “двойного замка”, 3 — “переключения”; (б) — механизмы изменения флуоресцентного ответа: 1.1 — FRET выкл, 1.2 — FRET вкл, 2.1 — а-PET, 2.2 — д-PET, 3 — ICT, 4 — ESIPT. “Ф” — флуорофор, “Д” — донор, “А” — акцептор. С изменениями и дополнениями из работы P. Gao et al. [27]. Пояснения см. в тексте.

ной среде и образованием карбонильных соединений (рис. 1, 3) [16, 22];

4) Cu(I) и другие металл-содержащие соединения окисляются под действием HOCl (рис. 1, 4), на основе реакций такого типа для косвенного обнаружения HOCl разработаны хемосенсоры, чувствительные, например, к Cu(II) [22];

5) ненасыщенные углерод-углеродные связи ($-\text{HC}=\text{CH}-$) подвергаются реакции электрофильного присоединения HOCl с образованием изомеров хлоргидринов [6] и дальнейшему окислению до более стабильных нехлорированных карбонильных соединений (рис. 1, 5) [22];

6) производные *n*-метоксифенола и *n*-аминофенола окисляются HOCl с высвобождением бензохинона и бензохинонимина соответственно (рис. 1, 6) [16, 22, 23].

Классификация зондов по типу флуоресцентного ответа

Для регистрации HOCl важны флуоресцентные свойства используемых зондов. Так, в результате взаимодействия сенсора с аналитом интенсивность его флуоресценции может изменяться следующим образом:

1) уменьшаться, такой тип зондов упоминается в литературе под названиями “turn-off” [10], “on-off” [16], “negative” [24] (т.е. “выключения”, “отрицательные”);

2) увеличиваться, такой тип зондов именуется “turn-on” [13], “off-on” [16, 25], “positive” [24] (т.е. “включения”, “положительные”);

3) убывать на одной и возрастать на другой длине волны испускания или возбуждения флуоресценции, наиболее часто встречаемое наименование таких зондов — “ratiometric” [16], реже

“switch” (т.е. “рационаметрические” или “переключения”).

Исторически первым появившимся типом хемосенсоров были зонды “выключения”. Такие молекулярные зонды обладают собственной флуоресценцией и теряют свои флуоресцентные свойства при взаимодействии с HOCl (рис. 2а, 1). Если хемосенсор не флуоресцирует или интенсивность флуоресценции крайне мала, а образующийся в результате реакции с HOCl продукт обладает флуоресценцией, интенсивность которой в разы превышает фоновый уровень, то его относят к типу “включения” (рис. 2а, 2.1). “Включение” зонда может происходить при непосредственном окислении до флуоресцирующего продукта либо за счет высвобождения заблокированного флуорофора. Возможна ситуация, когда зонд первоначально нужно “активировать”, а уже затем при реакции с аналитом он переходит во флуоресцирующую форму — такая система получила название “двойного замка” (рис. 2а, 2.2) [26]. Если при взаимодействии с HOCl происходит сдвиг спектрального диапазона в спектрах возбуждения или испускания, то такие зонды относятся к типу “переключения” (рис. 2а, 3). Наиболее часто зонды “переключения” характеризуются изменениями в спектрах испускания.

Вместе с указанием типа датчика говорят и о механизме (если он установлен) изменения его флуоресцентных свойств: флуоресцентный резонансный перенос энергии (FRET), фотоиндуцированный перенос электронов (PET), внутримолекулярный перенос заряда (ICT) или внутримолекулярный перенос протонов в возбужденном состоянии (ESIPT, рис. 2б) [27].

FRET — явление безлучательной передачи энергии от донора “Д” к акцептору “А” (рис. 2б) за счет дальнедействующих диполь-дипольных

взаимодействий. Эффективность FRET сильно зависит от степени перекрытия спектров поглощения (возбуждения) “А” и испускания “Д”. Процесс FRET до взаимодействия хемосенсора с HOCl может быть как активным с последующей инактивацией (FRET выкл — рис. 2б, 1.1), так и заблокированным с последующей активацией (FRET вкл — рис. 2б, 1.2). Зонды, сконструированные по принципу FRET, могут относиться ко всем трем типам (“включения”, “выключения” и “переключения”), однако чаще всего используются в качестве зондов “переключения”, где и “Д”, и “А” выступают флуорофорами [27, 28]. В последние годы чаще стали появляться сведения о новом механизме передачи энергии между “Д” и “А”, аналогичном FRET, но лишенном некоторых его недостатков: не требуется эффективное перекрытие спектров испускания “Д” и поглощения “А”, эффективность переноса не зависит значительно от расстояния между “Д” и “А”, за счет чего возрастает скорость безызлучательной передачи энергии, и наблюдается большой псевдостоксов сдвиг. Предполагается, что процесс передачи энергии идет через электронно-сопряженный жесткий линкер π -системы (фенильные остатки, ацетилен, оксидазольный компонент) и называется передачей энергии через связь (through bond energy transfer, TBET), хотя сам механизм еще не вполне изучен. Подробнее с этим механизмом и зондами на его основе можно ознакомиться, например, в обзоре Cao et al. [29].

PET — явление фотоиндуцированного переноса электронов, часто используемое при проектировании зондов типа “включения”. Зонды, в основе которых используется механизм PET, можно разделить на а-PET и д-PET. а-PET представляет собой процесс переноса электронов от возбужденного флуорофора “Ф” к электронно-дефицитному “А” (рис. 2б, 2.1), что вызывает тушение флуоресценции “Ф” и называется окислительным PET. д-PET представляет собой перенос электронов от “Д” к возбужденному “Ф” (рис. 2б, 2.2) и вызывает восстановление “Ф”, а также тушение флуоресценции и называется восстановительным PET. При реакции зонда с HOCl происходит смещение энергетических уровней “Д” и “А” относительно друг друга (для д-PET — “Д” и “Ф”, для а-PET — “А” и “Ф”), что приводит к блокировке процесса PET и увеличению интенсивности флуоресценции [27, 28].

Зонды, работающие по принципу ICT, в составе одной молекулы содержат “Д” и “А” электронов на разных концах от “Ф” (рис. 2б, 3). Сам флуорофор также может быть использован в качестве “Д” или “А”. Возбужденное состояние зонда обладает большим дипольным моментом по сравнению с основным состоянием. Перестройка сольватной оболочки приводит к сближению уровней энергии основного и возбужден-

ного состояний и флуоресценции с длиной волны значительно большей, чем у возбуждающего излучения. При реакции зонда с HOCl нарушается первоначальное распределение электронной плотности сенсора, что служит причиной изменения эффективности процесса ICT. Уменьшение эффективности ICT приводит к сдвигу в синюю область спектра испускания флуоресценции, и наоборот, возрастание эффективности ICT способствует сдвигу в красную область спектра флуоресценции. На основе ICT чаще всего проектируют зонды типа “включения” и “переключения” [27, 28].

ESIPT относится к явлению переноса атомов водорода (в основном от гидроксильных или аминогрупп) от “Ф” к соседним гетероатомам (в основном к N, O или S) при лазерном возбуждении (рис. 2б, 4). ESIPT обычно происходит в молекулах с пяти- или шестичленным кольцом, которые подвергаются процессу таутомеризации, сопровождающемуся эмиссионными изменениями из-за различий в структуре энергетических уровней таутомеров. Стратегия ESIPT может эффективно применяться для конструирования зондов типа “переключения” [27, 30].

Стоит отметить, что использование зондов типа “выключения” зачастую затрудняет регистрацию HOCl ввиду остаточного флуоресцентного сигнала. Зонды типа “включения” и “переключения” обеспечивают лучшее пространственное разрешение, и их применение более предпочтительно. Сенсоры типа “переключения” удобны для визуализации прореагировавшего и непрореагировавшего зонда, что помогает минимизировать ошибки, которые могут возникнуть из-за неоднородности образца или неоднородности распределения зонда [31]. Однако часто наблюдается малый сдвиг длин волн в спектрах испускания или образование двух продуктов реакции с двумя разными длинами волн возбуждения, что затрудняет применение зондов типа “переключения” на практике. Кроме того, они, как правило, имеют громоздкую структуру за счет использования нескольких флуорофоров, что ограничивает их применение [32, 33].

Классификация зондов по типу флуорофора

Выбор подходящих низкомолекулярных флуоресцентных зондов для обнаружения HOCl в биологических исследованиях может основываться на разновидности их “ядра”, т.е. флуорофора. Существует несколько основных типов “ядер”: кумарин, флуоресцеин, родамин, 4,4-дифтор-4-бор-3а,4а-диаза-*s*-индацен (бор-дипиррометен, BODIPY), 1,8-нафталимид, цианин, триазаолин и др. [12, 13, 34]. Таким образом, выбор зонда может быть сделан исходя из хорошо изученных химических и фотофизических свойств флуорофора.

ПРЕДПОСЫЛКИ К РАЗРАБОТКЕ СОВРЕМЕННЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ХЕМОСЕНСОРОВ

Первые флуоресцентные зонды для регистрации продукции АФК в клетках, сконструированные по типу “выключения”, были крайне неспецифичными. В дальнейшем целесообразным представлялось конструирование более специфичных хемосенсоров для регистрации НОСІ. Параллельно этот процесс сопровождался переходом к синтезу сенсоров типа “включения” и “переключения”. В данном разделе представлен ряд разработок в этой области.

Зонды “включения” и “выключения”

Хемосенсоры на основе родамина. В 2007 г. группа ученых во главе с S. Kenmoku представила HySOx — хемосенсор типа “включения” ($\lambda_{\text{возб}} = 552 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 575 \text{ нм}$), реализованный на основе концепции “S-замка” (рис. 3) [35]. “Включение” флуоресценции наблюдается после окисления сенсора под действием НОСІ с разрывом S-содержащего кольца и переходом зонда во флуоресцирующую форму. HySOx — чувствительный и избирательный флуоресцентный зонд для НОСІ, кроме того, интенсивность флуоресценции его продукта практически не зависит от рН в диапазоне 6.5–9.0. К недостаткам стоит отнести малый квантовый выход и сильное перекрывание спектров поглощения и испускания [35]. В 2011 г. на основе HySOx синтезирован ряд Si-содержащих аналогов (MMSiR и его более гидрофобное производное wsMMSiR, рис. 3), интенсивность флуоресценции которых возрастает при реакции с НОСІ в ближней инфракрасной области спектра ($\lambda_{\text{возб}} = 652 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 770 \text{ нм}$) [36]. HySOx и его модификации были успешно апробированы при визуализации продукции НОСІ в фагосомах нейтрофилов, активированных опсонизированным зимозаном [35, 36]. Также с их помощью была выявлена продукция НОСІ *in vivo* в модели перитонита у мышей, который был вызван внутрибрюшинной инъекцией зимозана и форбол-12-миристат-13-ацетата (РМА) [36].

В 2011 г. группой X. Chen et al. был предложен еще один структурный аналог HySOx — R-19S ($\lambda_{\text{возб}} = 510 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 545 \text{ нм}$) (рис. 3) [37]. Этот зонд типа “включения” показал хорошую чувствительность и селективность обнаружения НОСІ с оптимумом рН ~ 6.0. С помощью данного хемосенсора была выявлена продукция НОСІ нейтрофилами человека и мышей методами конфокальной микроскопии и проточной цитометрии, а также продукция НОСІ в кишечном эпителии *Drosophila melanogaster*, индуцируемая при пероральном введении насекомым микробного экстракта [37]. В 2015 г. был представлен зонд

RSTPP — еще один структурный аналог HySOx типа “включения” ($\lambda_{\text{возб}} = 553 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 580 \text{ нм}$) (рис. 3) [38]. Главная особенность этого зонда — наличие катиона трифенилфосфония, который обеспечивает проникновение RSTPP в митохондрии клеток. Зонд показал высокую чувствительность и селективность, однако интенсивность флуоресценции продукта стабильна в узком диапазоне рН 6–7. Для апробации сенсора были использованы макрофаги линии RAW264.7 (макрофаги мышей, зараженных вирусом лейкемии Абельсона), в норме экспрессирующие МРО на низком уровне [39], однако способные увеличивать экспрессию фермента при действии ряда стимулов, например, интерферона гамма (IFN- γ) [40]. При помощи хемосенсора методом конфокальной микроскопии была показана продукция эндогенной НОСІ в митохондриях макрофагов RAW264.7, индуцируемая последовательной инкубацией клеток с липополисахаридами (LPS) и РМА. Также показана продукция НОСІ клетками RAW264.7 при их инкубации с *Escherichia coli* [38].

В 2009 г. группа ученых во главе с Y.K. Yang предложила зонд типа “включения” на основе родамина 6G — соединение (I) (рис. 3) [41]. В исходном состоянии соединение (I) находится в нефлуоресцирующей спироциклической форме. Остаток гидроксамовой кислоты — сайт для НОСІ, после реакции с которым происходит хлорирование и элиминирование HCl с образованием открытой формы родамина 19 (R19). Для данного хемосенсора характерно малое время реакции (достижение плато интенсивности флуоресценции происходит за 20 с), большая чувствительность (увеличение интенсивности флуоресценции наблюдалось уже при внесении 25 нМ НОСІ) и высокая селективность по отношению к НОСІ в сравнении с другими основными АФК и АФА. Однако рабочий диапазон рН оказался несколько сдвинут в щелочную область (рН 7.5–10.0, максимум при рН 9.0). Зонд был использован для визуализации экзогенной НОСІ при ее инкубации с клетками рака легкого линии A549 и с эмбрионами аквариумных рыб *Danio rerio* (семейство карповых) [41].

В 2011 г. Z. Zhang et al. синтезировали гидразид родамина 6G — хемосенсор типа “включения” (рис. 3) [42]. В отличие от соединения (I), в данном хемосенсоре в качестве специфического сайта реакции выступает гидразидный фрагмент, N-хлорирование которого при действии НОСІ с последующей элиминацией HCl приводит к высвобождению R19 ($\lambda_{\text{возб}} = 500 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 550 \text{ нм}$). К достоинствам этого зонда можно отнести высокую чувствительность (ПО = 60 нМ), а также широкий диапазон линейного отклика (2–400 мкМ НОСІ при рН 7.4). Главные недостатки сенсора — значительное увеличение интенсивности флуо-

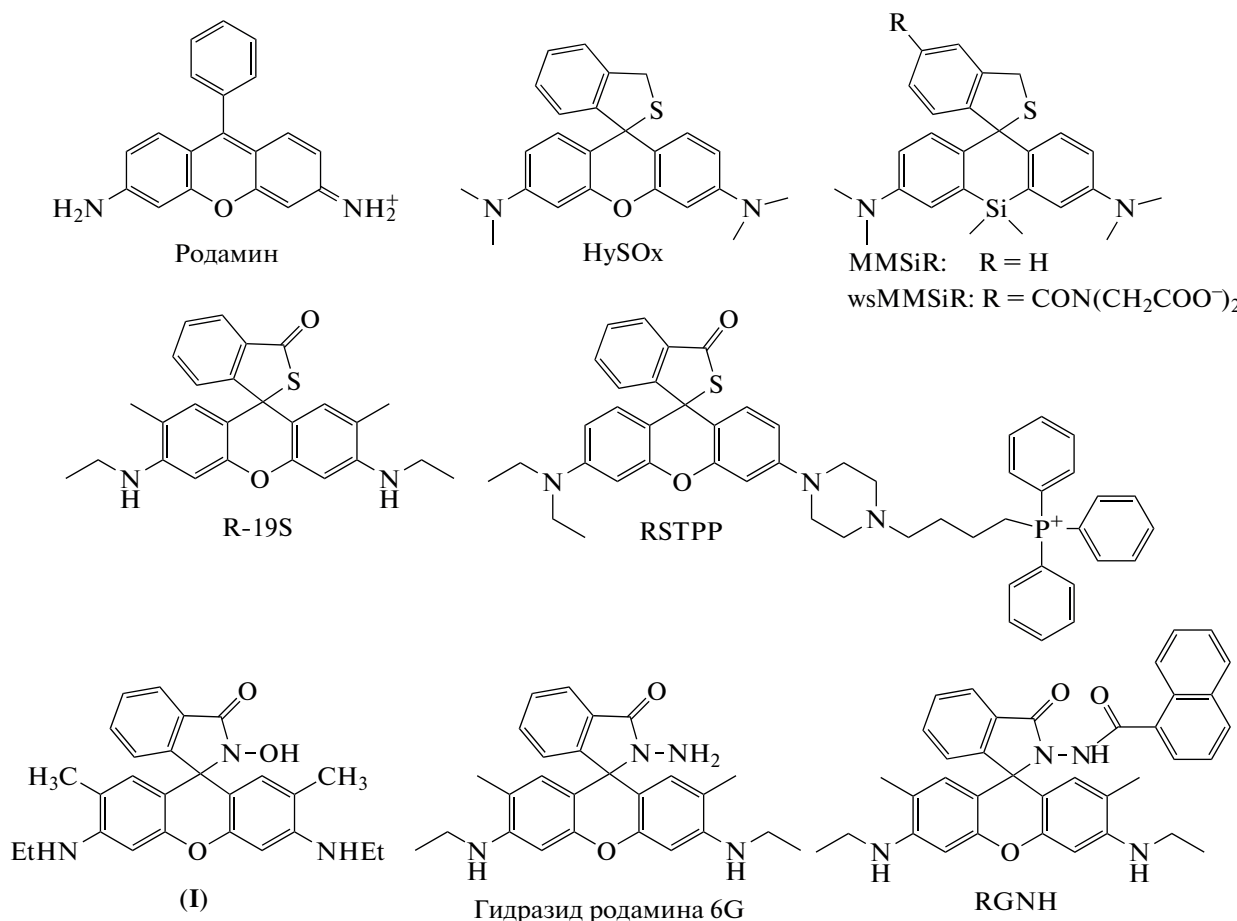


Рис. 3. Структурные формулы родамина и флуоресцентных зондов на его основе.

ресценции в присутствии ионов меди (Cu^{2+}) и сильный сдвиг оптимума pH работы зонда в сторону низких значений pH 2–5, при которых значительно возрастает автофлуоресценция хемосенсора. Гидразид родамина 6G был использован для регистрации образования HOCl методом конфокальной микроскопии в макрофагах линии RAW264.7 при их инкубации с LPS и IFN- γ и последующей активации PMA (система LPS/IFN- γ /PMA) [42].

В 2015 г. эта же группа ученых предложила нафтоилгидразид родамина 6G (RGNH), сконструированный на основе гидразида родамина 6G с нафтоильным фрагментом в аминоположении последнего (рис. 3) [43]. RGNH также относится к зондам типа “включения”. Взаимодействие RGNH с HOCl приводит к образованию флуоресцентного R19 по механизму, аналогичному для гидразида родамина 6G ($\lambda_{\text{возб}} = 500 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 550 \text{ нм}$). Введение нафтоильного фрагмента позволило повысить избирательность и добиться более высокой чувствительности (ПО = 9 нМ) по сравнению с гидразидом родамина 6G, однако рабочий диапазон pH зонда оказался сильно сдвинут в щелочную область (pH 9–12). RGNH был успешно применен для регистрации методами конфокальной микроскопии и проточной цитометрии продукции HOCl клетками линии RAW264.7 при их стимуляции LPS/IFN- γ /PMA [43].

Из упомянутых выше зондов коммерчески доступен только зонд HySOx, известный также как BioTracker 574 Red HOCl Dye (Sigma-Aldrich, США).

Из упомянутых выше зондов коммерчески доступен только зонд HySOx, известный также как BioTracker 574 Red HOCl Dye (Sigma-Aldrich, США).

Хемосенсоры на основе флуоресцеина. Аминофенил флуоресцеина (APF) был разработан группой К. Setsukinai в 2003 г. [44]. Присоединение обогащенного электронами фрагмента 4-аминофениларилэфира к молекуле флуоресцеина (рис. 4) приводит к тушению его флуоресценции за счет процесса PET. Показано, что APF при действии $\cdot\text{OH}$, HOCl/HOBr и ONOO^- , а также в присутствии систем пероксидаза хрена/ H_2O_2 и МРО/ H_2O_2 /Cl⁻ путем О-деарилирования превращается в флуоресцеин, что сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 490 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 515 \text{ нм}$), т.е. выступает зондом типа “включения”. ПО для $\cdot\text{OH}$, ONOO^- и HOCl

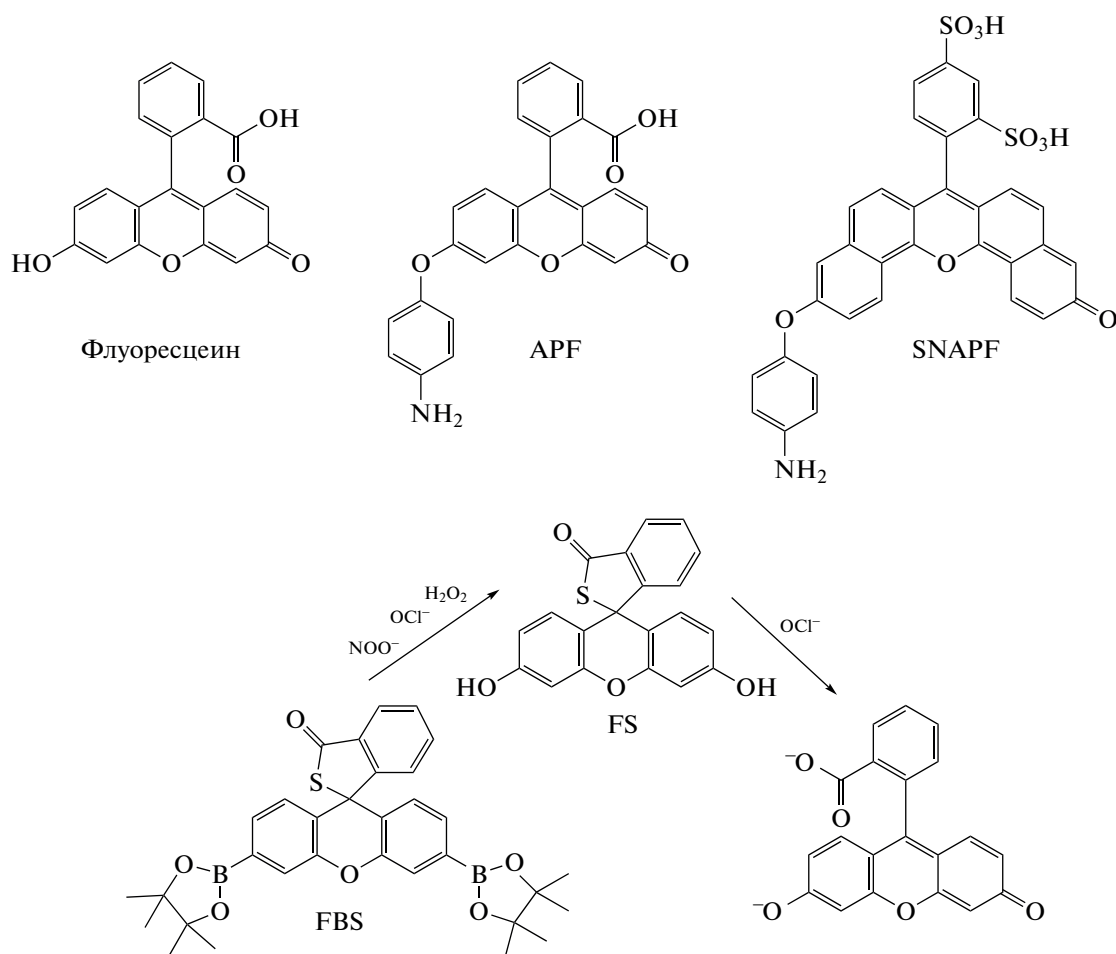


Рис. 4. Структурные формулы флуоресцеина и флуоресцентных зондов на его основе.

составил 50 нМ [45]. APF используют для регистрации продукции HOCl и HOBr нейтрофилами и эозинофилами методами конфокальной микроскопии [44] и проточной цитометрии [46], а большой квантовый выход и высокая чувствительность позволяют регистрировать продукцию HOCl/HOBr в суспензии лейкоцитов, полученной сразу же после гемолиза эритроцитов цельной крови [46, 47]. Однако для оценки избирательной роли HOCl относительно других АФК, АФГ и АФА в превращение APF в флуоресцеин необходимо использовать разностный подход с применением структурного аналога APF – гидроксифенилфлуоресцеина (HPF), который реагирует с теми же высокореакционными соединениями, что и APF, за исключением HOCl [44].

В 2007 г. J. Shepherd et al. предложили модификацию APF до сульфонамтоаминофенил флуоресцеина (SNAPF), который также представляет собой датчик типа “включения”. Отличительная особенность SNAPF – сдвиг спектров возбуждения и регистрации флуоресценции в ближнюю инфракрасную область ($\lambda_{\text{возб}} = 614 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 676 \text{ нм}$) [48].

Данный зонд показал высокую селективность и был использован для регистрации методом флуоресцентной микроскопии продукции HOCl нейтрофилами человека и макрофагами мышей, трансгенных по гену, кодирующему MPO человека, при стимуляции клеток PMA. Кроме того, с применением SNAPF было выявлено присутствие HOCl в образцах артерий человека с атеросклеротическими бляшками, а также *in vivo* у мышей с перитонитом, индуцированным тиюгликолятом [48].

Концепция “двойного замка” была реализована группой Q. Xu в 2013 г. при конструировании зонда типа “включения” FBS [49]. При реакции FBS с H_2O_2 , ONOO^- или HOCl образуется слабо флуоресцирующий продукт – FS, который, в свою очередь, избирательно реагирует с HOCl с высвобождением флуоресцеина ($\lambda_{\text{возб}} = 498 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 523 \text{ нм}$) (рис. 4). Зонд чувствителен и селективен по отношению к HOCl в диапазоне pH 7–9. FBS не окисляется до флуорофора под действием $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{NO}$, $\cdot\text{OH}$, гидропероксидов и пероксильных

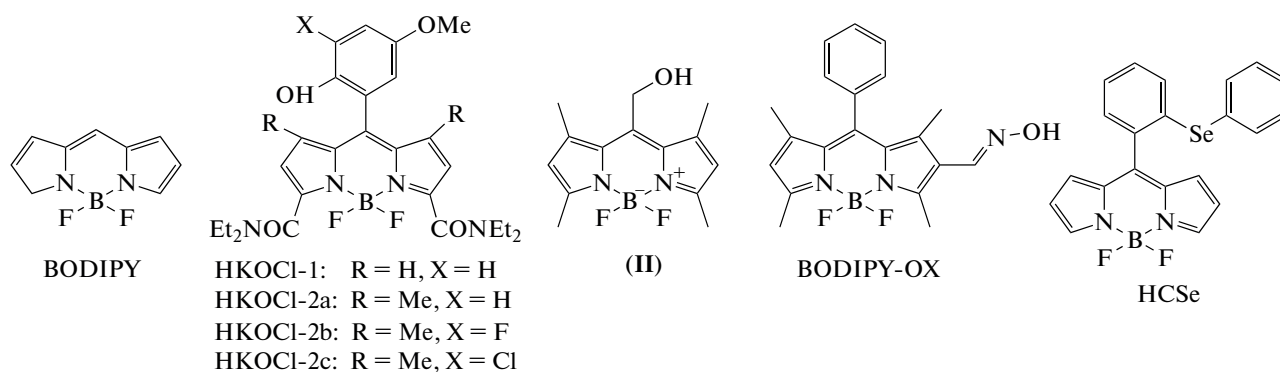


Рис. 5. Структурные формулы BODIPY и флуоресцентных зондов на его основе.

радикалов. FBS был применен для визуализации продукции HOCl в кишечнике дрозоды при оральном введении насекомым бактериального экстракта [49].

Из упомянутых зондов на основе флуоресцеина коммерчески доступны только APF и его структурный аналог HPF (Sigma-Aldrich, США).

Хемосенсоры на основе BODIPY. В 2008 г. Z.N. Sun et al. сконструировали зонд типа “включения” HKOCl-1 (рис. 5) [50]. Увеличение интенсивности флуоресценции сенсора происходит вследствие окисления 4-метоксифенола до бензохинона в присутствии HOCl, что приводит к потере способности остатка 4-метоксифенола тушить флуоресценцию “ядра” BODIPY по механизму PET ($\lambda_{\text{возб}} = 520$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 541$ нм). Зонд обладает высокой чувствительностью и избирательностью, широким рабочим диапазоном pH 5–8. HKOCl-1 использовали для регистрации образования HOCl в системе MPO/H₂O₂/Cl[–], а также в макрофагах линии RAW264.7 при их стимуляции LPS/IFN- γ /PMA [50, 51]. Однако в дальнейшем зонд не получил практического применения ввиду повторного окисления флуоресцирующего продукта с образованием нефлуоресцирующего соединения [52].

В 2014 г. J.J. Hu et al. разработали ряд аналогов HKOCl-1 (HKOCl-2a–c) с дополнительной защитой 4-метоксифенола двумя метильными группами (рис. 5) [52]. Среди них HKOCl-2b ($\lambda_{\text{возб}} = 523$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 545$ нм) показал наиболее высокую селективность и чувствительность (ПО = 18 нМ) в отношении HOCl. Для зондов HKOCl-2a и HKOCl-2b характерно длительное время выхода на плато интенсивности флуоресценции при их реакции с HOCl (до 15 мин), в то время как для HKOCl-2c этот показатель значительно ниже (3 мин). Тем не менее величина флуоресцентного отклика для HKOCl-2c в 3 раза меньше таковой по сравнению с HKOCl-2a и HKOCl-2b. По совокупности параметров HKOCl-2b был выбран как самый перспективный и применен для регистрации мето-

дом конфокальной микроскопии продукции HOCl в клетках линии RAW264.7 при их стимуляции PMA или зимозаном. Также с использованием данного зонда впервые была показана продукция HOCl в дифференцированных клетках линии THP-1 (моноциты человека с острым моноцитарным лейкозом, экспрессирующие MPO на низком уровне [53]) при их стимуляции PMA или зимозаном [52].

Зонд типа “выключения” на основе BODIPY с гидроксиметильной группой в мезо-позиции был представлен группой L. Gai в 2013 г. (соединение (II), рис. 5) [54]. “Выключение” флуоресценции зонда ($\lambda_{\text{возб}} = 480$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 525$ нм) происходит за счет превращения гидроксиметильной группы в формильную в результате реакции окисления в присутствии HOCl. Сенсор продемонстрировал хорошую избирательность в отношении HOCl по сравнению с $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, H₂O₂, $\cdot\text{NO}$. Данный зонд был протестирован на клеточной линии аденокарциномы протоков молочной железы человека MCF-7 при экзогенном введении HOCl в культуральную среду [54].

В 2013 г. M. Emrullahoglu et al. предложили зонд типа “включения” на основе “ядра” BODIPY с внедренной группой альдоксима (BODIPY-OX) (рис. 5) [55]. При действии HOCl образуется флуоресцирующий нитрилоксид BODIPY-CNO ($\lambda_{\text{возб}} = 470$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 529$ нм). Зонд показал высокую чувствительность (ПО = 500 нМ) и селективность, но интенсивность флуоресценции BODIPY-CNO сильно зависит от pH (оптимум при pH 8.0). В дальнейшем было показано, что BODIPY-CNO нестабилен и разлагается на компоненты, которые не удалось идентифицировать, что сделало невозможным применение зонда для регистрации образования HOCl в клеточной среде [55].

В этом же году S. Liu совместно с S. Wu представили селен-содержащий зонд типа “включения” HCSel (рис. 5). Изначально флуоресценция HCSel блокируется за счет процесса PET. После

окисления HCS₂ при действии HOCl образуется оксид селена (HCS₂O), в котором PET заблокирован, что приводит к увеличению интенсивности флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 510$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 526$ нм). Зонд характеризуется высокой чувствительностью и селективностью, быстрым ответом, оптимум работы сенсора лежит в диапазоне pH 6–8. HCS₂ был использован для регистрации образования HOCl в клетках линии RAW264.7, стимулированных PMA [56].

Из вышеперечисленных зондов в настоящий момент производится и доступен к приобретению только HKOCl-1 (Molbase (Shanghai) Biotechnology Co. Ltd, Китай).

Переход к концепции зондов “переключения”

В 2009 г. группой W. Lin впервые для регистрации HOCl был предложен зонд типа “переключения”. В основе функционирования данного сенсора лежит превращение оксима в альдегид под действием HOCl. Однако оптимум работы зонда находится в щелочной области (pH > 9), из-за чего зонд непригоден для регистрации продукции HOCl в клеточных системах [21]. В 2012 г. эта же группа ученых в качестве основы для зондов “переключения” предложила стратегию циклизации родамин-тиосемикарбазидов до родамин-оксадиазолов при действии HOCl [31]. Так был создан родамин-кумариновый сенсор (соединение (III), рис. 6), в котором “переключение” интенсивности флуоресценции с кумаринового ($\lambda_{\text{возб}} = 414$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 473$ нм) на родаминовый ($\lambda_{\text{возб}} = 414$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 594$ нм) каналы осуществляется за счет FRET ($\lambda_{\text{возб}} = 414$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 594/473$ нм). Зонд показал высокую избирательность и чувствительность к HOCl (ПО = 52 нМ), быстрый выход интенсивности флуоресценции на плато (в течение 3 мин). При этом изменение флуоресценции зонда сильно зависит от pH (оптимум работы при pH 6.0). Этот родамин-кумариновый сенсор был успешно применен для регистрации продукции HOCl клетками линии RAW264.7 при их стимуляции LPS/PMA [31].

В 2013 г. группой L. Long был предложен зонд HRS1 [57]. Он содержит флуорофоры на основе кумарина и родамина, связанные между собой диацетилгидразином, выступающим сайтом реакции с HOCl. HRS1 характеризуется флуоресценцией в области спектра, характерной для кумарина ($\lambda_{\text{возб}} = 410$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 501$ нм). После реакции HRS1 с HOCl происходит высвобождение как кумаринового, так и родаминового фрагментов. Таким образом, сенсор можно рассматривать как зонд типа “переключения” по кумарину ($\lambda_{\text{возб}} = 410$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 464/501$ нм), так и “включения” по родамину ($\lambda_{\text{возб}} = 554$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 578$ нм). Зонд показал высокую селективность и чувствитель-

ность к HOCl (ПО = 24 нМ) в бесклеточной среде, быстрый выход на плато интенсивности флуоресценции (в течение 1 мин). Тем не менее HRS1 не получил дальнейшего применения из-за необходимости учитывать присутствие обоих флуорофоров с разными каналами возбуждения флуоресценции [57].

Y. Zhang et al. в 2014 г. предложили еще один родамин-кумариновый зонд типа “переключения” (соединение (IV), рис. 6). Как и у HRS1, диацетилгидразин выступает в качестве сайта реакции с HOCl. Процесс “переключения” происходит по механизму FRET ($\lambda_{\text{возб}} = 410$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 580/470$ нм). Сенсор характеризуется избирательностью в отношении HOCl, а также быстрым ответом, однако в качестве недостатков необходимо отметить высокий ПО HOCl (170 мкМ) и сильную зависимость интенсивности флуоресценции от pH (оптимум при pH 9.3). Помимо этого, продукт реакции зонда с HOCl (кумарин-родаминовая кислота) подвергается хлорированию с последующей циклизацией при действии HOCl, что приводит к блокировке FRET и увеличению флуоресценции в канале регистрации кумарина. Хемосенсор был применен для регистрации продукции HOCl клетками линии RAW264.7 при их стимуляции LPS [58].

Группа во главе с L. Wang в 2014 г. синтезировала зонд “переключения” на основе кумарина (соединение (V), рис. 6) [59]. В качестве сайта распознавания в этом сенсоре впервые был использован *N*-алкилпиридиний, который окисляется под действием HOCl до *N*-алкилпиридона. При этом происходит блокировка процесса ICT, что сопровождается сдвигом длин волн в спектре испускания ($\lambda_{\text{возб}} = 420$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 488/631$ нм) в синюю область. Зонд характеризуется высокой селективностью, сравнительно высокой чувствительностью к HOCl (ПО = 93 нМ) и малым временем реакции, однако интенсивность флуоресценции сильно зависит от pH (оптимум при pH 7.5–11.0). Зонд был использован для определения концентрации HOCl в образцах воды рек, а также для регистрации продукции HOCl в клетках линии RAW264.7 при их активации PMA.

В 2015 г. S. Goswami et al. предложили зонд ТАМ на основе трифениламина в качестве сенсора типа “переключения” для обнаружения HOCl (рис. 6) [60]. Диаминотрифениламин (DAMN, рис. 6) связан с основой зонда через иминогруппу, которая служит сайтом реакции с HOCl. После окисления ТАМ под действием HOCl происходит отщепление фрагмента DAMN, что сопровождается сдвигом в спектре испускания флуоресценции зонда ($\lambda_{\text{возб}} = 430$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 485/630$ нм) в синюю область. Для зонда характерна высокая чувствительность (ПО = 70 нМ), селективность и малое время реакции с HOCl (выход на плато за 100 с),

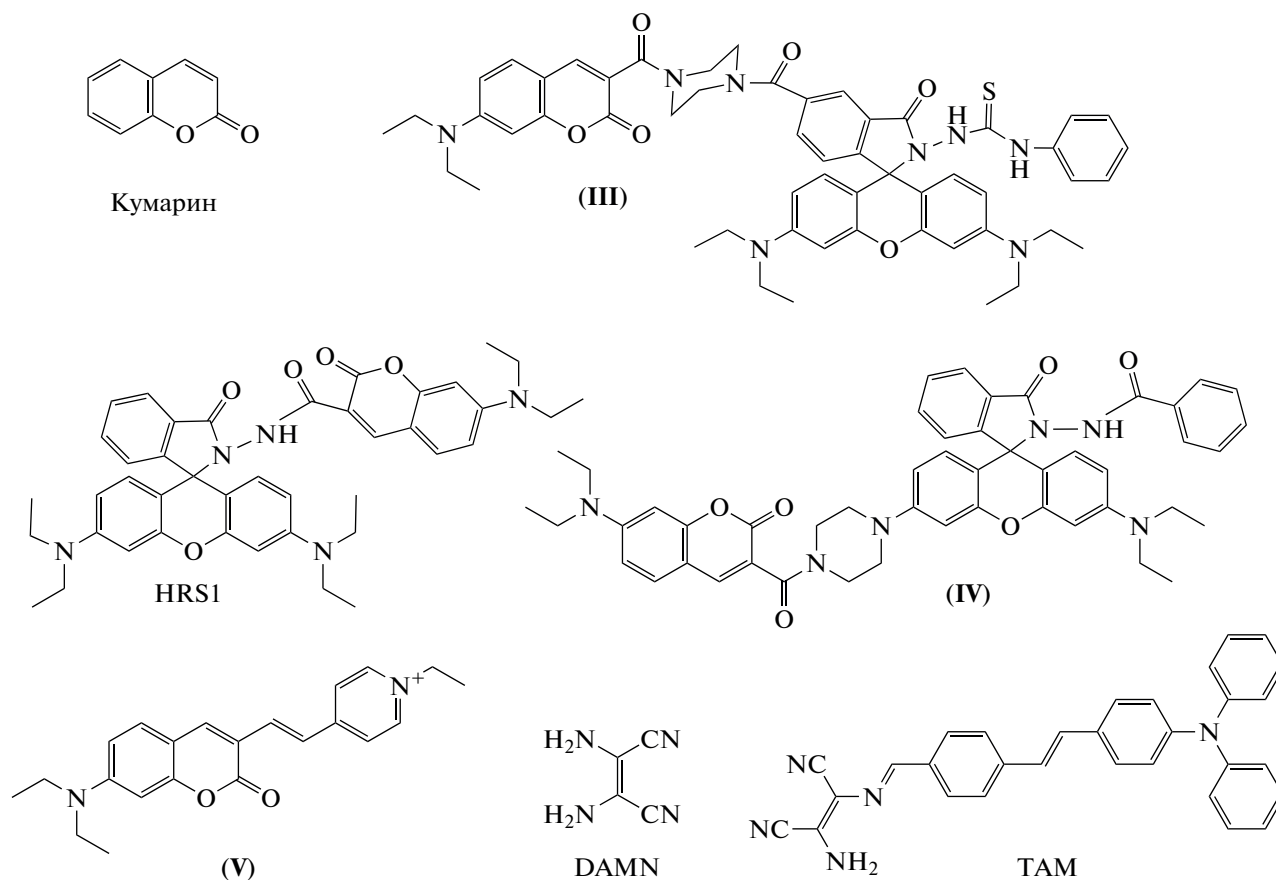


Рис. 6. Структурные формулы ратиометрических флуоресцентных зондов.

большой квантовый выход (0.86) и широкий рабочий диапазон pH (2.0–10.5). Однако данный сенсор характеризуется сильным сольватохромизмом (сдвигом спектров испускания флуоресценции в зависимости от полярности растворителя). TAM был использован для регистрации методом конфокальной микроскопии экзогенной HOCl в мононуклеарных клетках периферической крови человека [60].

Ни один из упомянутых зондов типа “переключения” не доступен для приобретения.

ПОСЛЕДНИЕ ДОСТИЖЕНИЯ В РАЗРАБОТКЕ МАЛЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ HOCl

В последние годы идет активная работа по конструированию малых молекулярных зондов для регистрации HOCl на основе известных флуорофоров с различными модификациями для достижения заданных свойств. Так, особый интерес представляют зонды не только с высокой селективностью и чувствительностью, но и с быстрым ответом для возможности исследования образования HOCl кинетически. Также усилия ученых

сосредоточены на возможности двухфотонного возбуждения зондов и/или регистрации их флуоресценции в ближнем инфракрасном диапазоне. Большой толчок в развитии получили сенсоры типа “переключения”.

Зонды на основе кумарина

В начале 2018 г. группа ученых во главе с Z. Liu предложила зонд типа “выключения” CMOS на основе кумарина (рис. 7) [61]. 1,3-Оксотиолан служит в качестве сайта реакции с HOCl. “Выключение” интенсивности флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 405 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 480 \text{ нм}$) происходит вследствие образования нефлуоресцирующего продукта окисления CMOS под действием HOCl – CMCHO. Также показано, что в присутствии цистеина или гомоцистеина (Cys/Hcy) CMCHO подвергается тиацеталированию с образованием CMCys или CMHcy (рис. 7), что сопровождается медленным увеличением интенсивности флуоресценции на длине волны, характерной для CMOS. Таким образом, данный зонд – пример перехода типа “включение”–“выключение”–“включение”. CMOS характеризуется быстрым откликом (5 с), высо-

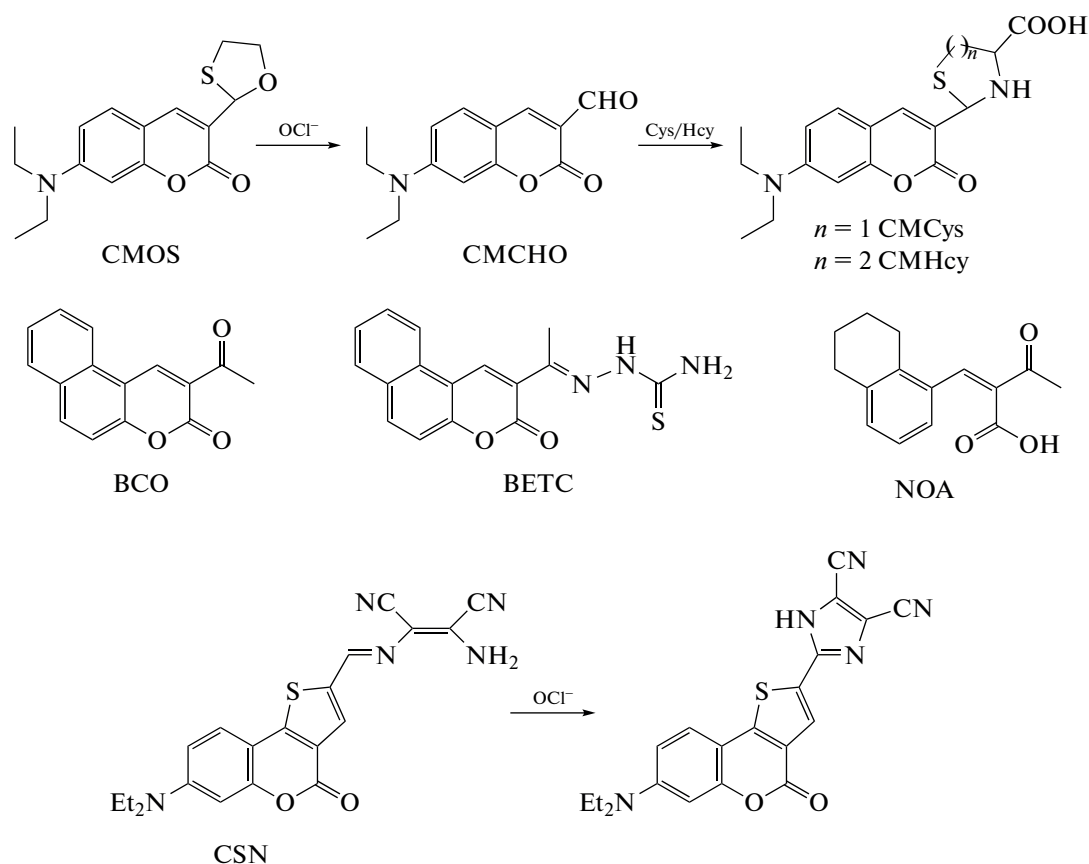


Рис. 7. Структурные формулы новых флуоресцентных зондов на основе кумарина.

кой чувствительностью (ПО = 21 нМ) и селективностью, оптимум работы зонда наблюдается в диапазоне pH 4.0–6.5. Зонд был использован для визуализации экзогенной HOCl в клетках рака яичников (SKVO-3). Методом конфокальной микроскопии было показано уменьшение интенсивности флуоресценции CMOS в клетках SKVO-3 при внесении HOCl, а также восстановление интенсивности флуоресценции в присутствии Cys/Hcy. Исходя из полученных данных, авторами был сделан вывод о возможности использования CMOS для изучения процессов окисления и восстановления тиолов в биологических системах [61].

В 2019 г. L. Jin et al. предложили сразу два хемосенсора типа “переключения” и “включения” с “ядром” кумарина – BCO и BETC соответственно (рис. 7) [62]. В основе механизма “переключения” BCO ($\lambda_{\text{возб}} = 372$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 430/460$ нм) и “включения” BETC ($\lambda_{\text{возб}} = 350$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 440$ нм) лежит окисление связей C=O (в случае BCO), C=O и C=N (в случае BETC) при действии HOCl с образованием общего конечного продукта (NOA, рис. 7). Оба зонда показали высокую чувствительность (ПО = 154 нМ для BCO и 32 нМ для BETC) и избирательность к HOCl. Однако BCO обладает малым сдвигом длин волн испускания

флуоресценции, что затрудняет его применение. Хемосенсоры были использованы для визуализации экзогенной HOCl в клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека (HepG2) методом конфокальной микроскопии [62].

В начале 2020 г. группа L. Shi представила зонд типа “переключения” на основе кумарина – CSN, в котором DAMN был выбран в качестве сайта реакции с HOCl [63]. “Переключение” зонда ($\lambda_{\text{возб}} = 413$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 470/640$ нм) происходит благодаря реакциям окисления и циклизации DAMN в присутствии HOCl. Зонд характеризуется большим синим сдвигом, высокой чувствительностью (ПО = 94 нМ) и селективностью к HOCl, оптимум интенсивности флуоресценции зонда наблюдался в диапазоне pH 6.6–8.6. Недостаток CSN – слабая фотостабильность (значительное изменение флуоресцентных характеристик CSN наблюдалось спустя 30 мин после начала облучения зонда ксеноновой лампой). Несмотря на это, было показано постепенное усиление интенсивности флуоресценции зонда в синем канале регистрации по отношению к красному каналу в клетках HeLa (клетки раковой опухоли шейки матки) после инкубации с HOCl. Хемосенсор также был успешно применен для реги-

страции продукции HOCl клетками RAW264.7 при их стимуляции LPS методом конфокальной микроскопии [63].

Ни один из указанных в данном подразделе зондов на основе кумарина не доступен для приобретения.

Зонды на основе флуоресцеина

В 2016 г. J. Hu et al. предложили модификацию зонда HPF с внедрением в него двух атомов хлора в *орто*-положении (2,6-дихлорфенольный фрагмент) – HKOCI-3 (рис. 8) [64]. PET обеспечивает низкий фоновый уровень флуоресценции HKOCI-3 . “Включение” датчика происходит за счет реакции окислительного *O*-деарилирования 2,6-дихлорфенола ($\lambda_{\text{возб}} = 490$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 527$ нм). HKOCI-3 обладает крайне высокой чувствительностью (ПО = 0.33 нМ), селективностью и быстрым ответом на HOCl ; его недостаток – сильная зависимость интенсивности флуоресценции продукта от pH среды (оптимум достигается в узком диапазоне pH 7.0–7.5). Хемосенсор был использован для регистрации методом конфокальной микроскопии продукции HOCl в клетках линий RAW264.7 и THP-1, нейтрофилах человека, а также в клетках микроглии мышей (BV-2, экспрессирующих MPO при воздействии ряда стимулов [65, 66]) при стимуляции PMA. Помимо этого, HKOCI-3 подходит для регистрации продукции эндогенной HOCl методом проточной цитометрии и при помощи спектрофлуориметра. Данный зонд эффективен также во флуоресцентной микроскопии при регистрации продукции эндогенной HOCl *in vivo* в живых интактных эмбрионах аквариумных рыб *Danio rerio* на разных стадиях их развития [64].

В 2016 г. группа R. Zhang представила хемосенсор типа “включения” FHZ на основе флуоресцеина (рис. 8) [67]. Зонд имеет два сайта реакции: для $\cdot\text{OH}$ и для HOCl . В присутствии только $\cdot\text{OH}$ происходит гидроксилирование одного из шестичленных ароматических колец с последующим его разрывом, а также разрыв пятичленного кольца FHZ с образованием конечного продукта FOBA (рис. 8). В присутствии только HOCl реакция идет без разрыва шестичленного ароматического кольца с образованием продукта F-TEG (рис. 8). Ввиду спектральных различий образующихся продуктов возможна одновременная регистрация увеличения интенсивности флуоресценции при действии $\cdot\text{OH}$ и HOCl в разных каналах: в синем ($\lambda_{\text{возб}} = 410$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 486$ нм) для $\cdot\text{OH}$ и в зеленом ($\lambda_{\text{возб}} = 490$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 520$ нм) для HOCl . FHZ в течение 2–3 мин реагирует с присутствующими одновременно $\cdot\text{OH}$ и HOCl с увеличением интенсивности флуоресценции в 19 раз в синем канале и в 35 раз – в зеленом канале. В случае с HOCl по-

казано, что “включение” флуоресценции происходит за счет блокирования процесса PET [67, 68]. FHZ избирателен в отношении $\cdot\text{OH}$ и HOCl и был протестирован на клетках HeLa при экзогенном внесении окислителей и на клетках RAW264.7 при их активации PMA. Показано, что FHZ распределяется как в цитоплазме, так и в митохондриях клеток. Продемонстрирована высокая биосовместимость зонда. Так, на живых эмбрионах аквариумных рыб *Danio rerio* было показано избирательное накопление спонтанно образующихся $\cdot\text{OH}$ и HOCl в органах (кишечник, печень, пронефрос) с течением времени [67].

В 2019 г. группа J. Lv представила два зонда типа “включения” на основе флуоресцеина – FN-1 и FN-2 (рис. 8) [69]. Оба зонда были получены путем конденсации аминогрупп 1,8-диаминонафталина с альдегидными группами моно- (в случае FN-1) или бис- (в случае FN-2) альдегида флуоресцеина. Азот полученной при этом иминогруппы ($-\text{NH}-$) выступает мишенью для HOCl . При реакции зондов с HOCl образуются моно- и бис-альдегид флуоресцеина (для FN-1 и FN-2 соответственно). Реакция сопровождается “включением” флуоресценции флуоресцеина ($\lambda_{\text{возб}} = 490$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 529$ нм) за счет блокировки PET. Квантовый выход флуоресценции продуктов реакции зондов с HOCl в 3–4 раза ниже, чем у флуоресцеина. FN-1 по сравнению с FN-2 обладает большим фоновым уровнем флуоресценции и меньшей скоростью реакции с HOCl . Оптимальный диапазон работы достигается при pH 7–10 для FN-1 и pH 6–10 для FN-2. Оба сенсора более специфичны, но менее чувствительны по отношению к HOCl по сравнению с APF (ПО = 210 и 230 нМ для FN-1 и FN-2 соответственно). FN-1 и FN-2 были использованы для регистрации продукции HOCl при экзогенном внесении H_2O_2 к клеткам HeLa, предварительно проинкубированными с NaCl и MPO [69].

Из указанных в данном подразделе зондов на основе флуоресцеина доступны к приобретению зонды HKOCI-3 (MedChemExpress, США) и FHZ (Sigma-Aldrich, США).

Зонды на основе феноксазина

В 2016 г. краситель феноксазинового ряда – целестиновый синий В (СВ) – был предложен в качестве зонда типа “включения” для регистрации продукции HOCl (рис. 9) [70]. Фоновая флуоресценция СВ в видимой области спектра практически не наблюдается, реакция с HOCl приводит к образованию гликоля СВ (рис. 9) [71]. Реакция СВ с HOCl сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции в оранжевой области спектра ($\lambda_{\text{возб}} = 460$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 590$ нм). Зонд характеризуется избирательностью в отношении

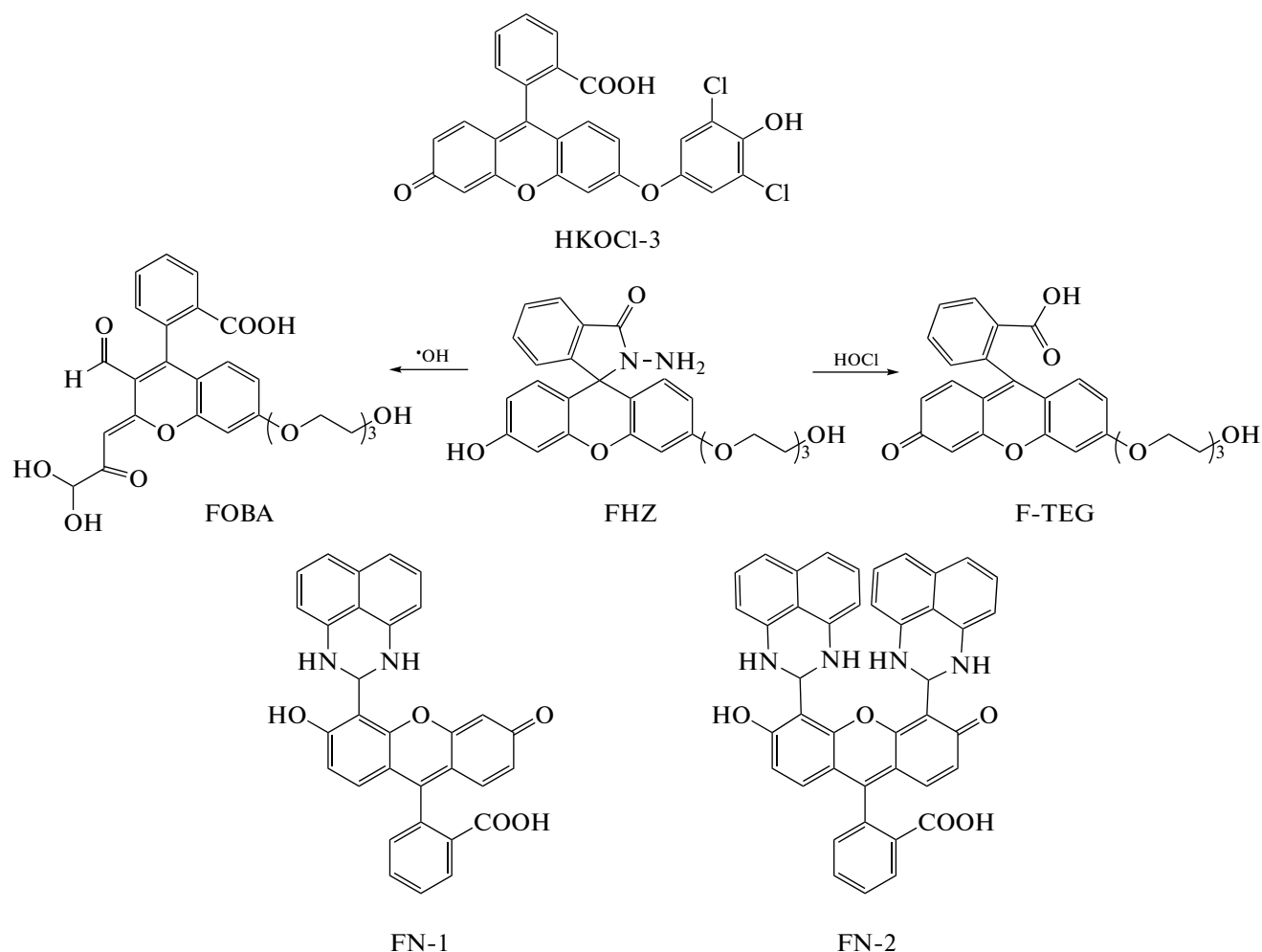


Рис. 8. Структурные формулы новых флуоресцентных зондов на основе флуоресцеина.

HOCl , NOBr , а также галогенированных производных таурина и белков. Хемосенсор обладает высокой чувствительностью к HOCl ($\text{ПО} = 32 \text{ нМ}$), фотостабильностью, высокой скоростью реакции (плато интенсивности флуоресценции достигается в течение 30 с) и большим стоксовым сдвигом. Существенное увеличение интенсивности флуоресценции (в ~ 100 раз) наблюдается в диапазоне pH 7.0–7.5, а фоновый уровень флуоресценции низок и практически не изменяется в диапазоне pH 2.2–8.0. С использованием СВ методами проточной цитометрии и конфокальной микроскопии показана продукция HOCl нейтрофилами человека при их стимуляции РМА [70]. Помимо этого, СВ может использоваться для кинетического анализа продукции HOCl в суспензиях нейтрофилов, активированных РМА, хемотаксическим пептидом *N*-формилметионил-лейцил-фенилаланином и растительными лектинами с различной углеводной специфичностью (в присутствии цитохалазина В). Хемосенсор был успешно опробован при исследовании влияния лекарственных

препаратов на продукцию HOCl нейтрофилами человека [70–72].

В 2019 г. М.Г. Choi et al. представили зонд типа “включения” RT-1 на основе карбонидитиоатного производного резорурфина (рис. 9) [73]. Гидролиз карбонидитиоатного фрагмента при действии HOCl приводит к высвобождению флуоресцирующего резорурфина ($\lambda_{\text{возб}} = 550 \text{ нМ}$; $\lambda_{\text{исп}} = 587 \text{ нМ}$). Зонд показал высокую чувствительность ($\text{ПО} = 2.18 \text{ нМ}$), избирательность к HOCl , однако относительно невысокую скорость реакции с HOCl (интенсивность флуоресценции достигала плато в течение 3 мин). К недостаткам зонда следует отнести падение интенсивности флуоресценции резорурфина в присутствии ионов брома и иода, а также сильную зависимость отношения интенсивности флуоресценции резорурфина к интенсивности флуоресценции RT-1 от значения pH среды (оптимум при pH 8.0). RT-1 был использован для визуализации экзогенной HOCl в клетках линий RAW264.7 и HeLa [73].

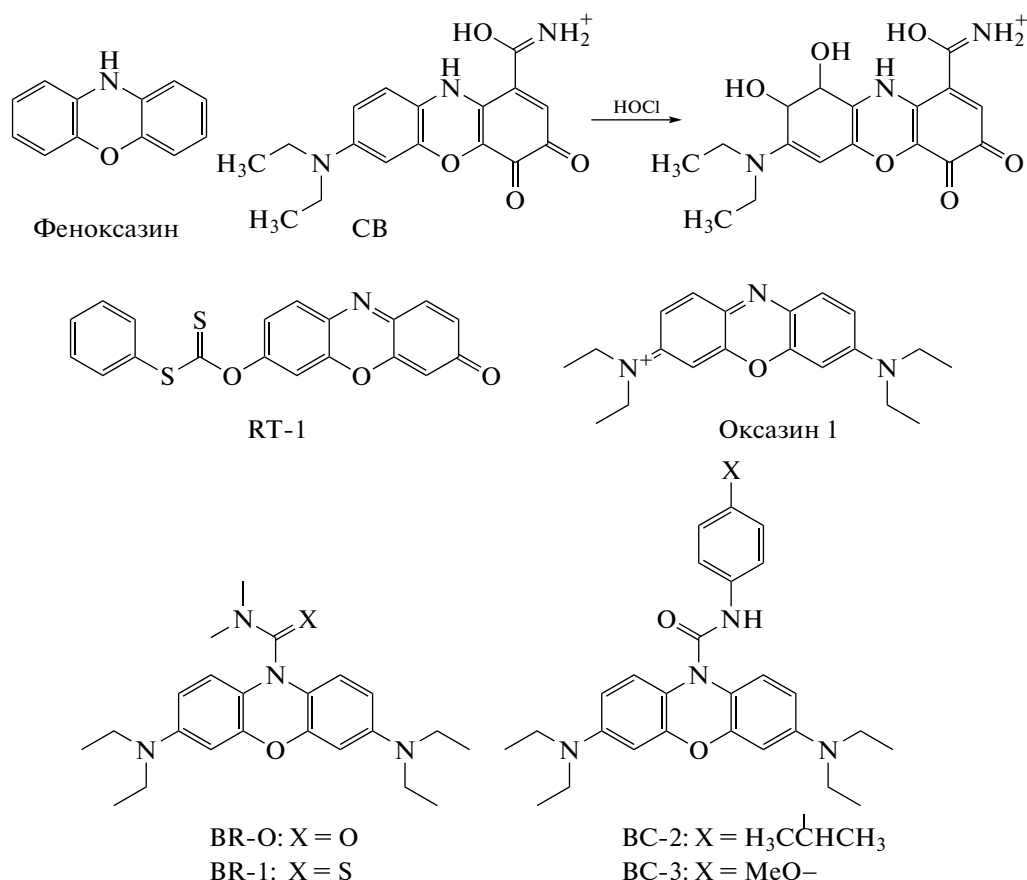


Рис. 9. Структурные формулы феноксазина и новых флуоресцентных зондов на его основе.

В 2020 г. группа J. Yang представила два зонда типа “включения” BR-O [74] и BR-1 [75], имеющих *N,N*-диметилкарбонильный и *N,N*-диметилтиокарбонильный остатки в качестве сайтов реакции с HOCl соответственно (рис. 9). Оба хемосенсора окисляются HOCl с высвобождением нестабильной восстановленной формы бис-диметиламинофеноксазина, который быстро гидролизуется и окисляется до конечного флуорофора — оксазина 1 ($\lambda_{\text{возб}} = 610 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 670 \text{ нм}$). Оба зонда показали избирательность в отношении HOCl по сравнению с АФК и АФА, достаточно быстрый ответ (плато интенсивности флуоресценции достигается за 7 и 2.5 мин для BR-O и BR-1 соответственно), стабильность флуоресцентного сигнала в диапазоне pH 5–8, а также высокую чувствительность (ПО = 19 и 11 нМ для BR-O и BR-1 соответственно). Недосток этих сенсоров — сильное перекрывание спектров поглощения и испускания (стоков сдвиг составил 20 нм для обоих зондов). BR-O и BR-1 показали увеличение интенсивности флуоресценции при внесении экзогенной HOCl в культуру клеток RAW264.7. Кроме того, с помощью данных зондов выявлено спонтанное образование HOCl в клетках острой

промиелоцитарной лейкемии человека (линия HL-60, экспрессирующая MPO на высоком уровне [53]) и подавление этого процесса в присутствии ингибитора MPO — гидразид 4-аминобензойной кислоты [74, 75]. BR-1 был использован для регистрации образования HOCl в модели артрита коленного сустава мышей [75], индуцированного инъекцией мукополисахарида λ -каррагинана — известного индуктора артрита у крыс [76].

В этом же году группа ученых во главе с W. Zheng представила две модификации зонда BR-O: BC-2 и BC-3 (рис. 9) [77]. Мишень для HOCl в этих сенсорах — атом углерода амидной группы. Как и в случае BR-O и BR-1, взаимодействие BC-2 и BC-3 с HOCl приводит к разрыву амидной связи с высвобождением восстановленного бис-диметиламинофеноксазина, который затем быстро переходит в окисленную форму, что сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции оксазина 1 ($\lambda_{\text{возб}} = 620 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 669 \text{ нм}$). BC-2 и BC-3 чувствительны (ПО = 20 и 11 нМ соответственно) и селективны в отношении HOCl по сравнению с АФК и АФА. При этом увеличение интенсивности флуоресценции в 3 раза больше в случае взаимодействия HOCl с BC-3

в сравнении с ВС-2. Существенное улучшение данных модификаций по сравнению с зондами BR-О и BR-1 — уменьшение времени достижения плато интенсивности флуоресценции после добавления НОСІ (30–50 с). ВС-3 был использован для регистрации спонтанной продукции НОСІ в клетках линии HL-60, а также в модели артрита у мышей при инъекции λ -каррагинана [77].

Из указанных зондов на основе феноксазина коммерчески доступен только зонд СВ (Sigma-Aldrich, США; Thermo Fisher Scientific, США).

Зонды на основе родола

Родол — гибридный флуорофор на основе флуоресцеина и родамина (рис. 10) — и его производные (родафлуоры) также используются в качестве флуоресцентных зондов для регистрации НОСІ. В 2018 г. группа Y. Zhang представила зонд типа “включения” RO610 на основе родола [78]. DAMN был выбран в качестве сайта реакции. При действии НОСІ происходит отщепление остатка DAMN, что сопровождается “включением” флуоресценции родола ($\lambda_{\text{возб}} = 535$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 577$ нм). RO610 обладает высокой чувствительностью (ПО = 29 нМ), селективностью по отношению к НОСІ в сравнении с АФК и АФА, быстрым выходом кинетической кривой изменения интенсивности флуоресценции на плато (в течение 30 с). Однако хемосенсор имеет небольшой рабочий диапазон pH (7.0–8.5). RO610 был апробирован для визуализации экзогенной НОСІ в клетках линии A549, а также при внутрибрюшинной инъекции НОСІ мышам. Помимо этого, была показана возможность регистрации образования эндогенной НОСІ *in vivo* в модели перитонита у мышей как при введении им зимозана, так и в норме без дополнительной стимуляции [78].

В 2020 г. X. Bai et al. на основе родола представили зонд типа “включения” НКОСІ-4 и его производные — НКОСІ-4г и НКОСІ-4м (рис. 10) [79]. Во всех трех зондах остаток 2,6-дихлорфенола был использован в качестве сайта для реакции с НОСІ. Превращение сенсоров во флуоресцирующую форму происходит за счет реакции О-деарилрования ($\lambda_{\text{возб}} = 530$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 557$ нм). НКОСІ-4 крайне чувствителен (ПО = 9 нМ) и селективен в отношении НОСІ. Увеличение интенсивности флуоресценции происходит быстро (плато достигается в течение 30 с), однако наблюдается сильная зависимость интенсивности флуоресценции от pH (максимум при pH 8.0). НКОСІ-4г и НКОСІ-4м были разработаны с целью улучшения проникновения зонда в клетки и регистрации продукции НОСІ в митохондриях. Так, в НКОСІ-4г введена группа сложного диметилового эфира, которая может гидролизироваться эстеразами клеток, а в НКОСІ-4м введен катионный митохондриально-нацелен-

ный фрагмент на основе трифенилфосфония (рис. 10). Методом конфокальной микроскопии с использованием НКОСІ-4г было показано образование НОСІ в клетках линии RAW264.7 при их стимуляции РМА, а также LPS/IFN- γ , помимо этого показано присутствие НОСІ в тканях мозга крыс с ишемическим повреждением. Методами конфокальной микроскопии и проточной цитометрии с помощью НКОСІ-4м была визуализирована НОСІ в митохондриях клеток линии RAW264.7 при их стимуляции РМА или LPS/IFN- γ [79].

Из указанных зондов на основе родола доступны к приобретению зонды НКОСІ-4 и НКОСІ-4м.

Зонды на основе 1,8-нафталимида

Несмотря на то, что 1,8-нафталимид и ранее использовался для конструирования зондов для НОСІ, в последние годы его популярность возросла. В 2017 г. группа во главе с J. Li синтезировала зонд типа “включения” на основе 1,8-нафталимида — соединение (VI) (рис. 11) [80]. НОСІ окисляет гидроксильную группу данного зонда до карбонильной, что сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 414$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 523$ нм). Хемосенсор характеризуется относительно низкой чувствительностью (ПО = 2.66 мкМ), большим диапазоном линейной зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации НОСІ (0.1–1.0 мМ), стабильностью в физиологическом диапазоне pH, хорошей селективностью и высокой скоростью реакции с НОСІ (плато изменения интенсивности флуоресценции достигается в течение 3 с). Соединение (VI) было использовано для визуализации экзогенной НОСІ в клетках линии A549 с помощью конфокальной микроскопии [80].

В этом же году C. Liu et al. представили лизосоминонацеленный хемосенсор типа “включения” РТ-1 (рис. 11) [81]. 1,8-Нафталимид выступает в качестве флуорофора, фенотиазинный фрагмент — в качестве донора электронов, а морфолиновый фрагмент — в качестве лизосоминонацеленной группы. В результате реакции НОСІ с атомом серы в фенотиазинном фрагменте происходит блокировка процесса РЕТ, что способствует увеличению интенсивности флуоресценции зонда ($\lambda_{\text{возб}} = 460$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 535$ нм). Зонд обладает высокими значениями таких параметров, как селективность, чувствительность (ПО = 0.88 нМ) и квантовый выход (0.57), а также быстрым откликом (плато изменения интенсивности флуоресценции достигается в течение 10 с), рабочий диапазон pH соответствует кислой области, что необходимо для регистрации НОСІ в лизосомах (pH 2–6). РТ-1 был апробирован при регистрации экзогенной НОСІ в клетках линии L929 (ли-

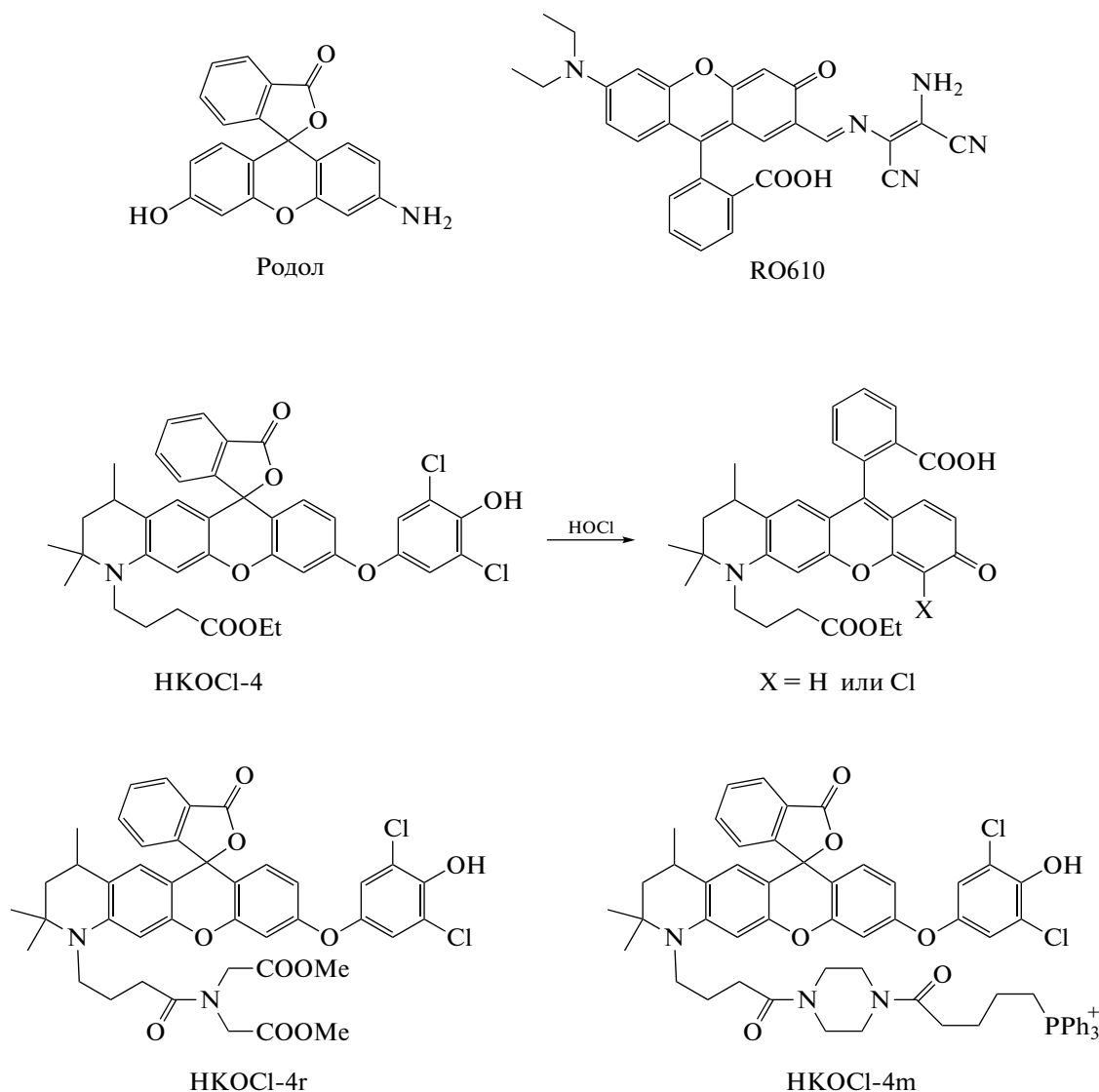


Рис. 10. Структурные формулы родола и новых флуоресцентных зондов на его основе.

ния клеток подкожной соединительной ткани мышей), а также эндогенной HOCl в клетках линии RAW264.7 при стимуляции LPS/PMA [81].

В начале 2020 г. С. Jiao et al. представили хемосенсор типа “включения” NDS для регистрации HOCl (рис. 11) [82]. В NDS нафталимид выступает в качестве флуорофора, диметилтиокарбамат — в качестве сайта реакции с HOCl, а морфолиновый фрагмент обеспечивает проникновение зонда в лизосомы. Предполагается, что HOCl реагирует с атомом серы сенсора с последующим гидролизом целевой группы. “Включение” интенсивности флуоресценции зонда ($\lambda_{\text{возб}} = 420 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 525 \text{ нм}$) происходит благодаря процессу ICT. NDS обладает высокой чувствительностью (ПО = 105 нМ), селективностью и скоростью реакции с HOCl: плато изменения интенсивности флуо-

ресценции достигается в течение 16 с при реакции NDS с HOCl в растворе и в течение 300 с при реакции с HOCl, образующейся в системе MPO/H₂O₂/Cl⁻. NDS был использован для регистрации образования HOCl в лизосомах клеток HeLa при их стимуляции LPS/PMA [82].

В этом же году другая группа ученых во главе с Т. Yang разработала зонд типа “включения” ER-NPA для регистрации HOCl в эндоплазматическом ретикулеуме (рис. 11) [83]. В качестве флуорофора был использован нафталимид, в качестве сайта реакции с HOCl — *n*-аминофениловый эфир, а в качестве целевой группы для эндоплазматического ретикулеума — метилсульфонамид. Предполагается, что в ER-NPA PET обеспечивает гашение флуоресценции нафталимида, а в присутствии HOCl окисление и гидролиз эфирной

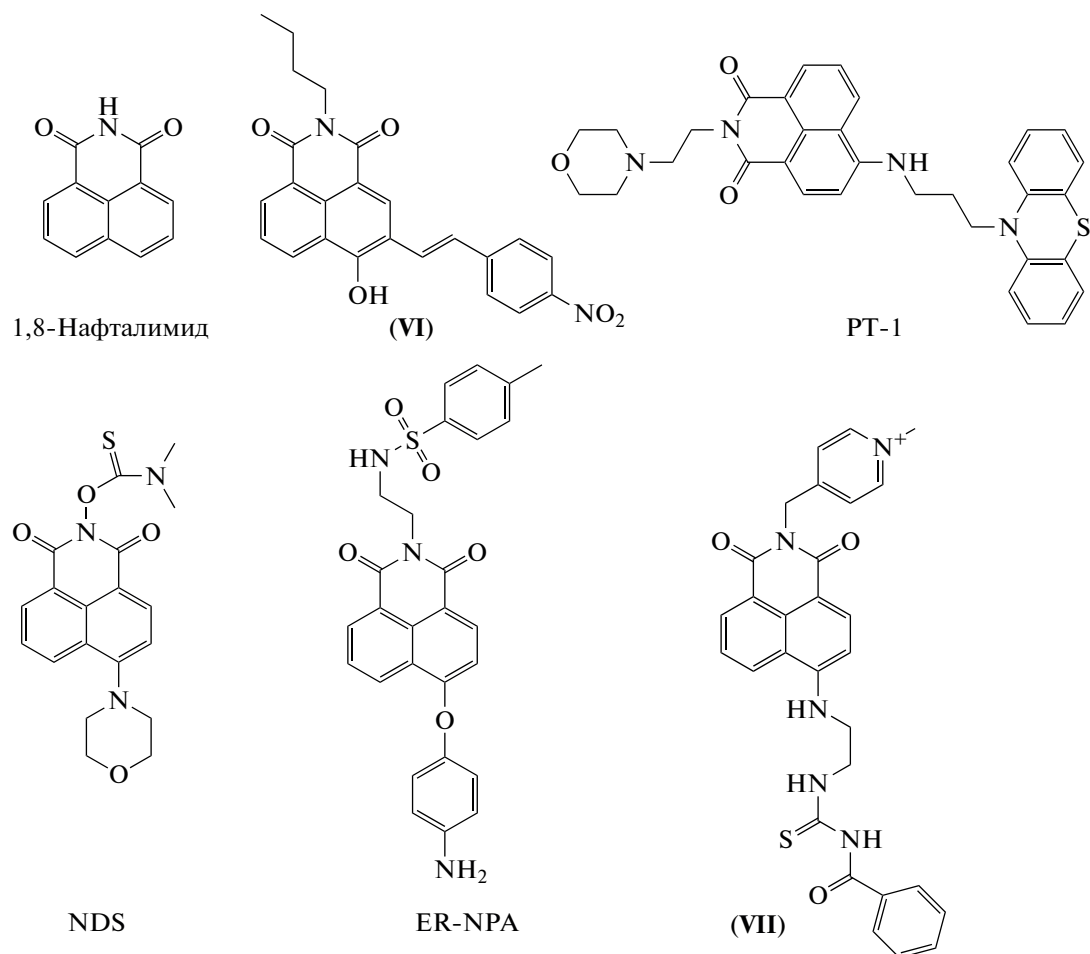


Рис. 11. Структурные формулы 1,8-нафталимида и новых флуоресцентных зондов на его основе.

связи в ER-NPA приводит к отщеплению остатка аминифенила и образованию гидроксильного аниона, что способствует процессу ИСТ и “включению” флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 450 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 550 \text{ нм}$). Зонд показал высокую чувствительность (ПО = 6.2 нМ) и селективность, а также стабильность и высокий уровень интенсивности флуоресценции при действии HOCl в диапазоне pH 2–10. При реакции с HOCl плато изменения интенсивности флуоресценции достигается в течение 60 с. ER-NPA был использован для регистрации экзо- и эндогенной HOCl (при стимуляции LPS/PMA, а также туникамицином) в клетках HeLa методом конфокальной микроскопии в режиме двухфотонного возбуждения ($\lambda_{\text{возб}} = 800 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 550 \text{ нм}$). Данный зонд показал эффективность также в случае регистрации экзо- и эндогенной HOCl (при стимуляции LPS/PMA) *in vivo* в эмбрионах аквариумных рыб *Danio rerio* [83].

В начале 2021 г. J. Xu et al. представили митохондриально-нацеленный зонд типа “включения” – соединение (VII) [84]. Остаток нафтал-

имида использован в качестве флуорофора, (2-аминоэтил)-тиомочевина – в качестве сайта реакции, а кватернизованный пиридиновый фрагмент – в качестве митохондриально-нацеленной группы. При взаимодействии с HOCl происходит внутримолекулярная циклизация тиомочевинной группы зонда, что сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 370 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 488 \text{ нм}$). Зонд характеризуется избирательностью к HOCl по сравнению с другими активными формами, относительно высокой чувствительностью (ПО = 230 нМ), большим рабочим диапазоном pH (pH 2–9), интенсивность флуоресценции достигает плато в течение 60 с. Хемосенсор был использован при визуализации экзогенной HOCl в митохондриях клеток линии PC-12 (клетки феохромоцитомы крысы), а также для регистрации образования эндогенной HOCl в клетках линии RAW264.7 при их стимуляции PMA [84].

Ни один из указанных в данном подразделе зондов не доступен для приобретения.

Иные малые молекулярные зонды

В 2016 г. группа ученых во главе с Y. Liu представила гибридный зонд “переключения” на основе “ядер” BODIPY и родамина – BRT (рис. 12) [85]. В отличие от предшественников, например, HRS1 и соединения (IV) (рис. 6), атом кислорода в родаминовом кольце заменен на атом серы. При действии HOCl тиогидразид родамина переходит в открытую форму, что сопровождается переносом энергии по механизму FRET от BODIPY к родамину ($\lambda_{\text{возб}} = 525$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 580/540$ нм). Зонд показал высокую чувствительность (ПО = 38 нМ), селективность, а также скорость реакции (выход кинетической кривой изменения интенсивности флуоресценции на плато достигался в течение 15 с) в отношении HOCl по сравнению с другими окислителями. Однако “переключение” интенсивности флуоресценции зонда сильно зависит от pH (оптимум при pH 4.0–5.5). BRT был использован для регистрации методом конфокальной микроскопии продукции HOCl клетками линии RAW264.7 при их активации LPS [85].

В 2018 г. группа во главе с G.J. Song синтезировала новый зонд типа “переключения” RPM (рис. 12) [86]. В структуре хемосенсора в качестве донора энергии использован имидазо[1,5-*a*]пиридин, акцептора – модифицированный остаток родамина. Зонд обладает собственной флуоресценцией, характерной для имидазо[1,5-*a*]пиридина ($\lambda_{\text{возб}} = 400$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 462$ нм). При реакции с HOCl карбонильная группа в имидазо[1,5-*a*]пиридине преобразуется в оксадиазол, что ослабляет его способность принимать электроны. С другой стороны, происходит открытие кольца родаминового фрагмента, что в итоге приводит к увеличению интенсивности флуоресценции в оранжевой области спектра при сохранении флуоресценции в синей области ($\lambda_{\text{возб}} = 400$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 587/462$ нм). Авторы полагают, что подобный эффект обусловлен комбинацией ICT и TBET. RPM обладает высокой избирательностью по отношению к HOCl, быстрым ответом (плато изменения интенсивности флуоресценции достигается в течение 30 с), большим рабочим диапазоном pH (5.5–8.0), в пределах которого эффективность “переключения” максимальна и постоянна. Недостаток сенсора – сравнительно малая чувствительность (ПО = 2.08 мкМ). RPM был использован для визуализации методом конфокальной микроскопии образования HOCl клетками линии RAW264.7 при их стимуляции LPS [86].

Используя вышеописанный подход, H. Meng et al. в 2019 г. сконструировали ратиометрический зонд CR-Ly (рис. 12) [87]. “Ядра” кумарина и родамина были выбраны, соответственно, в качестве донора и акцептора энергии, а морфолиновый фрагмент – в качестве лизосомо-нацеленной группы. Механизм “переключения” CR-Ly и со-

единения (IV), описанного в подразделе о переходе к концепции зондов “переключения” (рис. 6), аналогичны. Диацилгидразин выступает в качестве сайта реакции с HOCl, после взаимодействия с которым родаминовый фрагмент претерпевает превращение из спироциклической формы в форму с раскрытым кольцом. При этом разблокировка процесса FRET приводит к “переключению” флуоресценции с кумарина на родамин ($\lambda_{\text{возб}} = 420$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 582/479$ нм). CR-Ly характеризуется крайне высокой чувствительностью (ПО = 12 нМ) и селективностью по отношению к HOCl, относительно малым временем реакции (плато изменения интенсивности флуоресценции достигается в течение 50 с). Соотношение изменения интенсивности флуоресценции максимально и слабо зависит от pH в слабокислой области (pH 4–6), что соответствует целям разработки зонда для применения в лизосомах. Возможность визуализации продукции HOCl в лизосомах была показана на клетках линии RAW264.7 при их стимуляции LPS/PMA [87].

В 2018 г. D. Zheng et al. представили зонд типа “включения” Dcp-EPtz на основе фенотиазин-дицианоизофорона (рис. 12) [88]. Окисление атома серы при действии HOCl приводит к образованию альдегида в качестве продукта реакции, который характеризуется интенсивностью флуоресценции в красной области ($\lambda_{\text{возб}} = 475$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 618$ нм) и большим стоксовым сдвигом (>143 нм). Dcp-EPtz обладает высокой селективностью в отношении HOCl по сравнению с другими окислителями, широким рабочим диапазоном pH 5–8. Однако вследствие образования интермедиатов радикальной природы интенсивность флуоресценции продукта реакции нестабильна в течение первых 300 с после начала реакции. Dcp-EPtz был использован для регистрации методом конфокальной микроскопии экзогенной HOCl в клетках линии L929 и продукции эндогенной HOCl в клетках линии RAW264.7 при их активации LPS/PMA [88].

В середине 2020 г. L. Liu et al. разработали и реализовали новый подход к регистрации базальной активности MPO [89]. В основу хемосенсора типа “включения” FD-301 (рис. 12) положена структура известного ингибитора MPO – гидразида 4-аминобензойной кислоты, связанного с помощью дибензоилгидразинового линкера с флуорофором – метиленовым синим. FD-301 специфически связывается с MPO благодаря гидразидному фрагменту, однако стерические затруднения, вызванные наличием метиленового синего, не приводят к ингибированию каталитической активности фермента. Мишенью реакции выступает гидразидный остаток, окисление которого HOCl приводит к разрыву связи и высвобождению флуорофора ($\lambda_{\text{возб}} = 620$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 686$ нм). FD-301 обладает высокой чувствительностью

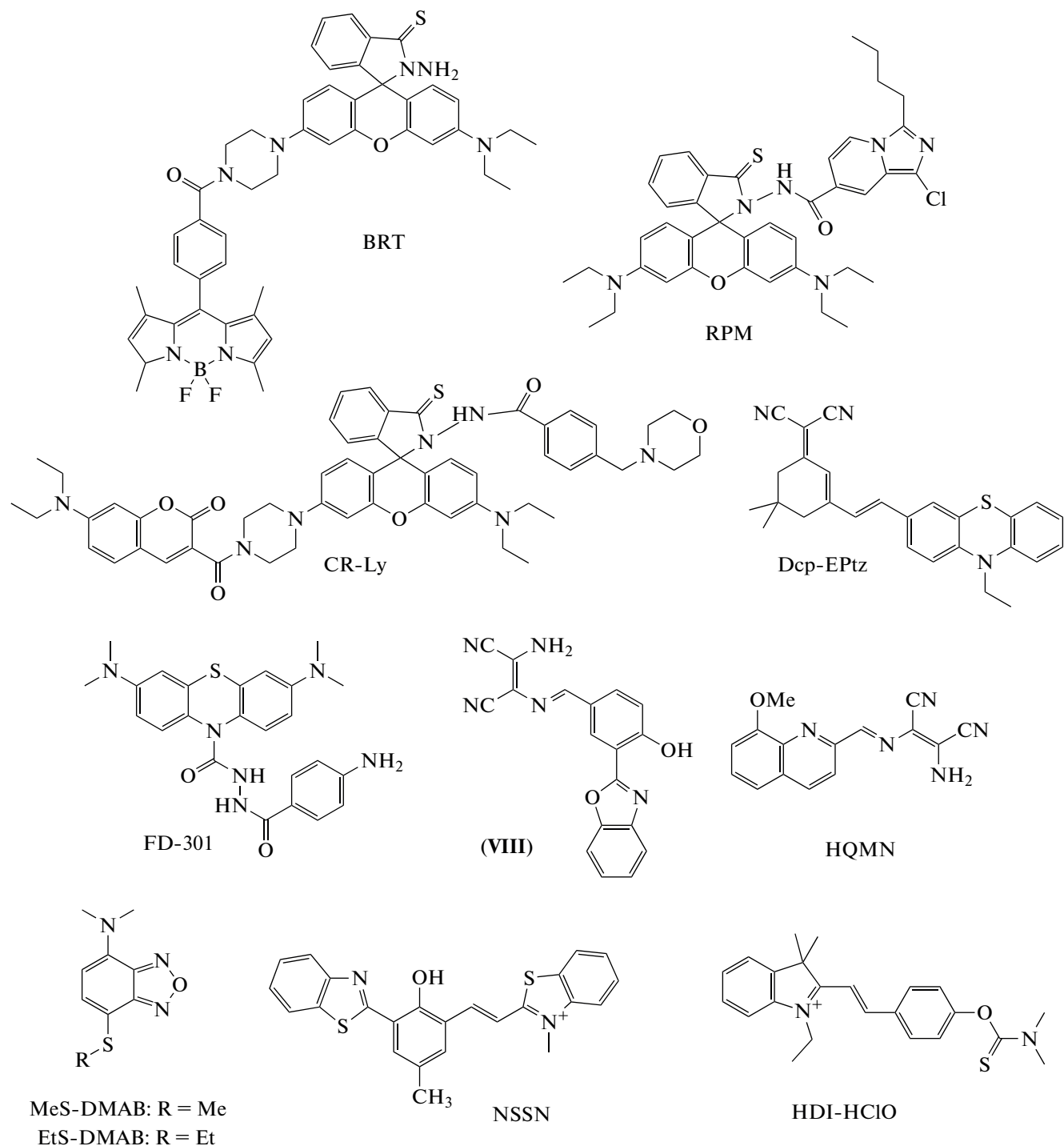


Рис. 12. Структурные формулы иных новых малых молекулярных флуоресцентных зондов.

(ПО = 44 нМ) и скоростью реакции с HOCl (плато изменения интенсивности флуоресценции достигается за 10 с), широким рабочим диапазоном pH 3–8, селективностью в отношении HOCl по сравнению с другими окислителями. Хемосенсор был успешно апробирован при визуализации экзогенной HOCl в клетках линии RAW264.7, а так-

же спонтанной продукции эндогенной HOCl в клетках линии HL-60. FD-301 был применен для регистрации образования HOCl *in vivo* в модели артрита, индуцированного инъекцией λ-каррагинана в голеностопный сустав мыши, и *ex vivo* в модели язвенного колита мышей, индуцированного оральным приемом 5%-ного декстрана [89].

В 2018 г. L. Chen et al. предложили зонд типа “включения” (соединение (VIII)) для обнаружения HOCl на основе флуоресцентного “ядра” 2-(2'-гидроксифенил)бензоксазола (рис. 12) [90]. DAMN был выбран в качестве сайта реакции с HOCl. При реакции HOCl с зондом происходит превращение иминогруппы в альдегидную. Реакция сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 360$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 435$ нм) за счет ингибирования PET. Зонд характеризуется высокой чувствительностью, селективностью и скоростью реакции (плато интенсивности флуоресценции достигается в течение 30 с) в отношении HOCl. Хемосенсор был использован в режиме двухфотонного возбуждения ($\lambda_{\text{возб}} = 740$ нм) для регистрации образования HOCl в клетках линии RAW264.7 при их стимуляции LPS/IFN- γ /PMA, а также в срезах гиппокампа мыши при стимуляции PMA [90].

В 2018 г. группа ученых во главе с S. Das предложила зонд “переключения” на основе хинолина — HQMN (рис. 12) [91]. Как и у соединения (VIII), DAMN служит в качестве сайта реакции с HOCl. Полученный в ходе реакции зонда с HOCl альдегид характеризуется значительным сдвигом в синюю область максимума интенсивности флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 370$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 468/572$ нм). Зонд показал высокую селективность в отношении HOCl по сравнению с другими окислителями, а также большой сдвиг максимума испускания при действии HOCl (104 нм). Однако теоретический предел обнаружения HOCl (ПО = 787 нМ) в ~10 раз больше, чем у многих сенсоров, разработанных в последние годы, а плато интенсивности флуоресценции достигается в течение 100 с, что в ~3 раза больше, чем у зондов феноксазинового ряда, зондов на основе родола и др. С помощью HQMN показано увеличение спонтанной продукции HOCl в моноцитах больных сахарным диабетом по сравнению с моноцитами здоровых доноров [91].

В 2018 г. J. Sun et al. предложили два флуоресцентных зонда типа “включения” с бензофуразаном в качестве флуорофора — MeS-DMAB и EtS-DMAB (рис. 12) [92]. Тиоэфирная группа окисляется при действии HOCl до сульфоксида и сульфоновой группы для MeS-DMAB и EtS-DMAB соответственно, что приводит к увеличению интенсивности флуоресцентного сигнала за счет активации процесса ICT ($\lambda_{\text{возб}} = 440$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 610$ нм). Оба хемосенсора характеризуются большим стоксовым сдвигом (170 нм), высокой избирательностью в отношении HOCl, однако время достижения плато интенсивности флуоресценции после добавления HOCl составляет 30–40 мин. Поскольку чувствительность EtS-DMAB (ПО = 340 нМ) по отношению к HOCl выше в

сравнении с MeS-DMAB, он был использован для регистрации методом конфокальной микроскопии экзогенной HOCl в клетках линии HeLa и образования эндогенной HOCl в клетках линии RAW264.7 при их активации LPS/IFN- γ /PMA [92].

В 2020 г. Y. Huang et al. предложил зонд двойного действия NSSN для регистрации HOCl в митохондриях (рис. 12) [93]. Зонд содержит два бензотиазольных фрагмента и один остаток *n*-метилфенола между ними. Реакция с HOCl протекает по связи C=C, расположенной между *орто*-положением *n*-метилфенола и бензотиазола с последующим отщеплением бензотиазольного фрагмента. При этом наблюдается “переключение” интенсивности флуоресценции зонда с красной на желтую область спектра ($\lambda_{\text{возб}} = 450$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 540/670$ нм) предположительно за счет процесса ESIPT. При концентрации HOCl 30–70 мкМ спектр испускания флуоресценции смещается в красную область, и NSSN может быть использован в качестве зонда “включения” ($\lambda_{\text{возб}} = 450$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 552$ нм). Хемосенсор селективен в отношении HOCl, имеет низкий предел обнаружения (ПО = 130 нМ), рабочий диапазон лежит в области pH 7–10, однако время выхода на плато интенсивности флуоресценции составляет 5 мин. NSSN был использован для визуализации экзогенной HOCl в митохондриях клеток HeLa, а также при подкожной инъекции HOCl мышам [93].

В 2021 г. P. Luo совместно с X. Zhao представили зонд типа “включения” HDI-HClO (рис. 12) [94]. Зонд содержит фрагменты индоленина, фенола и, как и в некоторых других работах, *N,N*-диметилтиокарбамат в качестве сайта реакции с HOCl. При реакции хемосенсора с HOCl происходит активация ранее заблокированного процесса ICT, что приводит к “включению” зонда ($\lambda_{\text{возб}} = 440$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 520$ нм). HDI-HClO продемонстрировал высокую селективность и чувствительность (ПО = 8.3 нМ), быстрый выход на плато кинетической кривой изменения интенсивности флуоресценции (8 с), широкий рабочий диапазон pH 7–10. При этом следует отметить незначительное влияние биологических тиолов на интенсивность флуоресценции зонда в режиме кинетических исследований. HDI-HClO был апробирован при визуализации экзогенной HOCl в клетках линии HeLa, а также эндогенной HOCl в макрофагах RAW264.7 при их стимуляции LPS/PMA [94].

Ни один из указанных в данном подразделе зондов не доступен для приобретения.

Краткая характеристика новых малых молекулярных флуоресцентных зондов для регистрации HOCl приведена в табл. S1 (см. дополнительные материалы).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка чувствительных, селективных и биологически совместимых флуоресцентных зондов с целью регистрации реакционных соединений, в том числе НОСІ, в биологических объектах вызывает интерес многих ученых, особенно это стало заметно в последние 10 лет. За это время было разработано множество зондов на основе различных флуоресцентных “ядер”, групп распознавания, типов и механизмов изменения интенсивности флуоресценции. Сами зонды стали более специализированными и чаще применяемыми для мониторинга образования НОСІ с целью изучения ее участия в физиологических и патофизиологических процессах, а также выяснения роли этой молекулы в клеточной сигнализации.

В настоящем обзоре мы представили классификацию, стратегии обнаружения, а также достижения в разработке флуоресцентных зондов для обнаружения НОСІ в биологических объектах. Однако, несмотря на значительные успехи в этой области, существует ряд ограничений использования флуоресцентных зондов вне зависимости от их типа: 1) малый стоксов сдвиг, который приводит к потере чувствительности зонда вследствие поглощения испускаемого света; 2) меньшая скорость реакции сенсора с НОСІ по сравнению со скоростью реакции НОСІ с функциональными группами биомолекул, что затрудняет кинетические исследования функционального ответа клеток на внешние стимулы; 3) сложная процедура синтеза и, как следствие, коммерческая недоступность, высокая стоимость или низкая чистота продукта; 4) малый рабочий диапазон рН и/или его сдвиг в кислотные или щелочные области (за исключением случаев разработки зондов, нацеленных на определенную органеллу клетки-мишени); 5) низкая стабильность самого зонда (малое время хранения препарата) и/или фотообесцвечивание флуоресцентного продукта во время наблюдений; 6) влияние НОСІ и других АФК, АФГ и АФА на продукт реакции зонда с НОСІ; 7) малая селективность (высокая степень влияния других АФК, АФГ и АФА, а также ионов); 8) низкая чувствительность (большое значение ПО) и т.д. [16].

В настоящее время получен ряд зондов, лишенных большинства вышеперечисленных недостатков при их использовании в бесклеточных средах. Однако данный факт не гарантирует достаточную чувствительность этого же зонда в клеточных культурах. Принимая во внимание специфику клеточных систем, к зондам для регистрации НОСІ предъявляются некоторые дополнительные требования.

1) В идеале сенсор должен позволять производить избирательную оценку образования НОСІ во внутри- или внеклеточных областях. Поэтому

при конструировании зонда должен быть соблюден подходящий для конкретной задачи баланс между гидрофобностью и гидрофильностью зонда в контексте проницаемости для мембран, удержания в клетках и растворимости в физиологических средах [14].

2) В качестве растворителя для сенсора идеально использование воды или буферного раствора с физиологическим значением рН. В ряде случаев допускаются малые добавки органического со- растворителя. Большое содержание органических растворителей может нарушать физико-химические свойства биомолекул и влиять на жизнеспособность клеток. Однако большинство флуоресцентных зондов плохо растворимы в водных средах. В качестве растворителей или со- растворителей используют такие органические вещества, как *N,N*-диметилформамид, диметилсульфоксид, ацетонитрил, этанол, глицерин [95]. Следует помнить, что часто используемый диметилсульфоксид сам окисляется НОСІ [96]. Чаше других в качестве буферных растворов используют фосфатно-солевой буфер, *N*-2-гидроксиэтилпиперазин-*N'*-2-этансульфоновую кислоту (HEPES), 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол (Tris) и др. [95]. Однако применение двух последних соединений нежелательно ввиду их реакции с НОСІ [97].

3) Необходимо избегать сильного поглощения зонда в ультрафиолетовой области, а также совпадения спектров поглощения и/или возбуждения сенсора с полосами Соре основных белков плазмы крови. Первую из этих проблем можно обойти, если использовать режим двухфотонного возбуждения хемосенсора, что, однако, не всегда реализуемо.

4) Зонд должен быть нетоксичным для клеток в используемых концентрациях на протяжении всего периода измерений (в зависимости от используемых методов промежутки времени варьируются от 30 мин до нескольких суток). При этом желательно наличие у зонда высокого молярного коэффициента поглощения, что дает возможность уменьшить его концентрацию, необходимую для экспериментов, и, следовательно, снизить вмешательство в изучаемые механизмы [14].

При разработке зонда, лишенного сразу нескольких недостатков, исследователи часто берут за основу некоторое удачное решение с целью его дальнейшей доработки. Так, среди тенденций в разработке и применении малых молекулярных зондов для регистрации НОСІ можно отметить частое использование DAMN в качестве мишени для НОСІ в составе сенсоров, например, в CSN [63], RO610 [78], соединениях (VIII) [90], HQMN [91]. Новой ветвью стало использование зондов на основе феноксазина (CB [70], RT-1 [73], BR-O [74], BR-1 [75], BC-2 и BC-3 [77]), а также гибридного флуорофора родола (RO610 [78], HKOC1-4 и

его производные [79]). Вызывает интерес стратегия одновременной регистрации нескольких типов окислителей, реализованная, например, в работе R. Zhang et al. [67] на примере зонда FHZ.

Наблюдается усложнение структуры зондов за счет введения дополнительных мишеней для увеличения селективности и/или чувствительности датчиков, а также более частое использование пар донор–акцептор для создания зондов типа “переключения”. Общая тенденция – разработка зондов с большим стоксовым сдвигом и регистрацией в ближнем инфракрасном диапазоне (альтернативно – зондов с возможностью двухфотонного возбуждения), совместимых с часто используемыми длинами волн лазерного излучения (например, 488, 640, 750 нм и др.) [32, 33].

Из представленных в данном обзоре новых малых молекулярных зондов (табл. S1 в дополнительных материалах), в зависимости от целей исследования и исходя из данных, указанных авторами статей, для регистрации HOCl подходят следующие зонды:

- 1) по используемому методу регистрации HOCl:
 - а) для конфокальной микроскопии – все указанные зонды;
 - б) для проточной цитометрии – HKOCl-3 [64], CB [70–72], HKOCl-4r [79];
 - в) для исследования в суспензиях клеток с использованием спектрофлуориметра – HKOCl-3 [64], CB [70–72];
 - г) для кинетических исследований образования HOCl (время реакции <1 мин) – все зонды, кроме BCO и BETC (время реакции не определено) [62], FN-1 и FN-2 [69], RT-1 [73], BR-O [74], BR-1 [75], Dcp-EPtz [88], EtS-DMAB [92], NSSN [93];
- 2) для регистрации продукции HOCl в клеточных органеллах:
 - а) в митохондриях – FHZ (в цитоплазме и митохондриях) [67], HKOCl-4m [79], соединение (VII) [84], NSSN [93];
 - б) в лизосомах – NDS [82], CR-Ly [87];
 - в) в эндоплазматическом ретикулуле – ER-NPA [83];
- 3) для регистрации образования HOCl:
 - а) *in vivo* – FHZ [67], BR-1 [75], BC-3 [77], RO610 [78], ER-NPA [83], FD-301 [89], NSSN [93];
 - б) в срезах тканей – HKOCl-4r [79], соединение (VIII) [90];
- 4) использование ближнего инфракрасного диапазона или режима двухфотонного возбуждения:
 - а) CSN – “переключение” из красной области спектра в синюю ($\lambda_{\text{исп}} = 470/640$ нм) [63], NSSN –

“переключение” из красной области спектра в желтую ($\lambda_{\text{исп}} = 540/670$ нм) [93];

б) возбуждение и испускание в красной области спектра – BR-O [74], BR-1 [75] и BC-3 [77] ($\lambda_{\text{возб}} = 610$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 670$ нм), FD-301 ($\lambda_{\text{возб}} = 620$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 686$ нм) [89];

в) BRT – “переключение” из синей области спектра в оранжевую с сохранением красной полосы ($\lambda_{\text{исп}} = 587/462$ нм) [85];

г) возможность использования двухфотонного возбуждения – соединение (VIII) ($\lambda_{\text{возб}} = 740$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 435$ нм) [90], ER-NPA ($\lambda_{\text{возб}} = 800$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 550$ нм) [83].

К настоящему времени коммерчески доступны для приобретения следующие зонды: HKOCl-3 (CAS 2031170-80-4), FHZ (CAS 1883737-63-0), CB (CAS 1562-90-9), HKOCl-4 (CAS 2031170-85-9) и HKOCl-4m (CAS 2031170-88-2).

В 2016–2021 гг. был достигнут несомненный прогресс в разработке малых молекулярных флуоресцентных зондов, а также их применении для визуализации HOCl как *in vitro*, так и *in vivo*. Однако многие проблемы, связанные с чувствительностью и селективностью зондов, скоростью их реакции с HOCl (для кинетических исследований), малым стоксовым сдвигом, использованием органических растворителей, а также малой фотостабильностью остаются актуальными и сейчас. В связи с этим при выборе хемосенсора для практического применения необходимо обратить внимание на ту совокупность характеристик зонда, которая наиболее оптимально позволит решить конкретную поставленную перед экспериментатором задачу. Кроме того, очень небольшое количество разработанных хемосенсоров доступно к непосредственному приобретению, что вызывает дополнительные затруднения у исследователей, но вместе с тем открывает возможность и необходимость дальнейшего конструирования и синтеза новых зондов для регистрации HOCl.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Б20Р-215), Российского фонда фундаментальных исследований (грант 20-515-00006), гранта Президента Российской Федерации МД-1901.2020.4.

Описание зондов на основе феноксазина и некоторых других поддержано Российским научным фондом (грант 20-15-00390), для выполнения которого запланировано их использование.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований, проведенных авторами данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов изучения.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Alfadda A.A., Sallam R.M.* // J. Biomed. Biotechnol. 2012. V. 2012. P. 936486–936499. <https://doi.org/10.1155/2012/936486>
2. *Milkovic L., Cipak Gasparovic A., Cindric M., Mouthuy P.A., Zarkovic N.* // Cells. 2019. V. 8. P. 793–806. <https://doi.org/10.3390/cells8080793>
3. *Phaniendra A., Jestadi D.B., Periyasamy L.* // Indian J. Clin. Biochem. 2015. V. 30. P. 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
4. *Winterbourn C.C.* // Toxicology. 2002. V. 181. P. 223–227. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00286-X](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00286-X)
5. *Arnhold J.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 8057–8084. <https://doi.org/10.3390/ijms21218057>
6. *Panasenko O.M., Gorudko I.V., Sokolov A.V.* // Biochemistry (Mosc.). 2013. V. 78. P. 1466–1489. <https://doi.org/10.1134/S0006297913130075>
7. *Ulfig A., Leichert L.I.* // Cell. Mol. Life Sci. 2021. V. 78. P. 385–414. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03591-y>
8. *Pattison D.I., Davies M.J.* // Chem. Res. Toxicol. 2001. V. 14. P. 1453–1464. <https://doi.org/10.1021/tx0155451>
9. *Zhang L., Wang X., Cueto R., Effi C., Zhang Y., Tan H., Qin X., Ji Y., Yang X., Wang H.* // Redox Biol. 2019. V. 26. P. 101284–101299. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101284>
10. *Chen X., Tian X., Shin I., Yoon J.* // Chem. Soc. Rev. 2011. V. 40. P. 4783–4804. <https://doi.org/10.1039/C1CS15037E>
11. *Burns J.M., Cooper W.J., Ferry J.L., King D.W., DiMento B.P., McNeill K., Miller C.J., Miller W.L., Peake B.M., Rusak S.A., Rose A.L., Waite T.D.* // Aquat. Sci. 2012. V. 74. P. 683–734. <https://doi.org/10.1007/s00027-012-0251-x>
12. *Hu J.J., Ye S., Yang D.* // Isr. J. Chem. 2017. V. 57. P. 251–258. <https://doi.org/10.1002/ijch.201600113>
13. *Yudhistira T., Mulay S.V., Kim Y., Halle M.B., Churchill D.G.* // Chem. Asian J. 2019. V. 14. P. 3048–3084. <https://doi.org/10.1002/asia.201900672>
14. *Chan J., Dodani S.C., Chang C.J.* // Nat. Chem. 2012. V. 4. P. 973–984. <https://doi.org/10.1038/nchem.1500>
15. *Dong S., Zhang L., Lin Y., Ding C., Lu C.* // Analyst. 2020. V. 145. P. 5068–5089. <https://doi.org/10.1039/D0AN00645A>
16. *Zhang R., Song B., Yuan J.* // TrAC Trends Anal. Chem. 2018. V. 99. P. 1–33. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.11.015>
17. *Wan J., Zhang X., Zhang K., Su Z.* // Rev. Anal. Chem. 2020. V. 39. P. 209–221. <https://doi.org/10.1515/revac-2020-0119>
18. *Tholen D.W., Linnet K., Kondratovich M., Armbruster D.A., Garrett P.E., Jones R.L., Kroll M.H., Lequin R.M., Pankratz T.J., Scassellati G.A., Schimmel H., Tsai J.* // Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline. CLSI document EP17-A. CLSI, Wayne, PA, 2004. <https://demo.nextlab.ir/Organization/Documents/CLSI-Standards/CLSI-EP17-A.aspx>
19. *Long G.L., Winefordner J.D.* // Anal. Chem. Am. Chem. Soc. 1983. V. 55. P. 712A–724A. <https://doi.org/10.1021/ac00258a001>
20. *Ruff F., Szabó D., Rábai J., Jalsovszky I., Farkas Ö.* // J. Phys. Org. Chem. 2019. V. 32. P. e4005. <https://doi.org/10.1002/poc.4005>
21. *Lin W., Long L., Chen B., Tan W.* // Chemistry. 2009. V. 15. P. 2305–2309. <https://doi.org/10.1002/chem.200802054>
22. *Yue Y., Huo F., Yin C., Escobedo J.O., Strongin R.M.* // Analyst. 2016. V. 141. P. 1859–1873. <https://doi.org/10.1039/C6AN00158K>
23. *Bai X., Ng K.K.H., Hu J.J., Ye S., Yang D.* // Annu. Rev. Biochem. 2019. V. 88. P. 605–633. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111754>
24. *Bartosz G.* // Clin. Chim. Acta. 2006. V. 368. P. 53–76. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.12.039>
25. *Zhang Y.R., Liu Y., Feng X., Zhao B.X.* // Sens. Actuators B Chem. 2017. V. 240. P. 18–36. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.08.066>
26. *Winterbourn C.C.* // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1840. P. 730–738. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.004>
27. *Gao P., Pan W., Li N., Tang B.* // Chem. Sci. 2019. V. 10. P. 6035–6071. <https://doi.org/10.1039/C9SC01652J>
28. *Fu Y., Finney N.S.* // RSC Adv. 2018. V. 8. P. 29051–29061. <https://doi.org/10.1039/C8RA02297F>
29. *Cao D., Zhu L., Liu Z., Lin W.* // J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev. 2020. V. 44. P. 100371. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2020.100371>
30. *Jiao Y., Zhu B., Chen J., Duan X.* // Theranostics. 2015. V. 5. P. 173–187. <https://doi.org/10.7150/thno.9860>
31. *Yuan L., Lin W., Xie Y., Chen B., Song J.* // Chemistry. 2012. V. 18. P. 2700–2706. <https://doi.org/10.1002/chem.201101918>

32. Wang L., Du W., Hu Z., Uvdal K., Li L., Huang W. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2019. V. 58. P. 14026–14043.
<https://doi.org/10.1002/anie.201901061>
33. Andina D., Leroux J.C., Luciani P. // *Chemistry*. 2017. V. 23. P. 13549–13573.
<https://doi.org/10.1002/chem.201702458>
34. Cao D., Liu Z., Verwilt P., Koo S., Jangili P., Kim J.S., Lin W. // *Chem. Rev.* 2019. V. 119. P. 10403–10519.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00145>
35. Kenmoku S., Urano Y., Kojima H., Nagano T. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. P. 7313–7318.
<https://doi.org/10.1021/ja068740g>
36. Koide Y., Urano Y., Hanaoka K., Terai T., Nagano T. // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. V. 133. P. 5680–5682.
<https://doi.org/10.1021/ja111470n>
37. Chen X., Lee K.A., Ha E.M., Lee K.M., Seo Y.Y., Choi H.K., Kim H.N., Kim M.J., Cho C.S., Lee S.Y., Lee W.J., Yoon J. // *Chem. Commun.* 2011. V. 47. P. 4373–4375.
<https://doi.org/10.1039/C1CC10589B>
38. Zhou J., Li L., Shi W., Gao X., Li X., Ma H. // *Chem. Sci.* 2015. V. 6. P. 4884–4888.
<https://doi.org/10.1039/C5SC01562F>
39. Bruno J.G., Herman T.S., Cano V.L., Stribling L., Kiel J.L. // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 1999. V. 35. P. 376–382.
<https://doi.org/10.1007/s11626-999-0111-8>
40. Adachi Y., Kindzelskii A.L., Petty A.R., Huang J.B., Maeda N., Yotsumoto S., Aratani Y., Ohno N., Petty H.R. // *J. Immunol.* 2006. V. 176. P. 5033–5040.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.8.5033>
41. Yang Y.K., Cho H.J., Lee J., Shin I., Tae J. // *Org. Lett.* 2009. V. 11. P. 859–861.
<https://doi.org/10.1021/ol802822t>
42. Zhang Z., Zheng Y., Hang W., Yan X., Zhao Y. // *Talanta*. 2011. V. 85. P. 779–786.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.04.078>
43. Zhang Z., Deng C., Meng L., Zheng Y., Yan X. // *Anal. Methods*. 2015. V. 7. P. 107–114.
<https://doi.org/10.1039/C4AY02281E>
44. Setsukinai K.I., Urano Y., Kakinuma K., Majima H.J., Nagano T. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 3170–3175.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M209264200>
45. Cohn C.A., Pedigo C.E., Hylton S.N., Simon S.R., Schoonen M.A. // *Geochem. Trans.* 2009. V. 10. P. 1–9.
<https://doi.org/10.1186/1467-4866-10-8>
46. Flemmig J., Zschaler J., Remmler J., Arnhold J. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. P. 27913–27923.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.364299>
47. Flemmig J., Schwarz P., Bäcker I., Leichsenring A., Lange F., Arnhold J. // *J. Immunol. Methods*. 2014. V. 415. P. 46–56.
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.09.003>
48. Shepherd J., Hilderbrand S.A., Waterman P., Heinecke J.W., Weissleder R., Libby P. // *Chem. Biol.* 2007. V. 14. P. 1221–1231.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.10.005>
49. Xu Q., Lee K.A., Lee S., Lee K.M., Lee W.J., Yoon J. // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. V. 135. P. 9944–9949.
<https://doi.org/10.1021/ja404649m>
50. Sun Z.N., Liu F.Q., Chen Y., Tam P.K.H., Yang D. // *Org. Lett.* 2008. V. 10. P. 2171–2174.
<https://doi.org/10.1021/ol800507m>
51. Yang D., Sun Z.N., Peng T., Wang H.L., Shen J.G., Chen Y., Tam P.K.H. // *Live Cell Imaging / Ed. Papkovsky D.* Humana Press, 2010. V. 591. P. 93–103.
<https://doi.org/10.1007/978-1-60761-404-3>
52. Hu J.J., Wong N.K., Gu Q., Bai X., Ye S., Yang D. // *Org. Lett.* 2014. V. 16. P. 3544–3547.
<https://doi.org/10.1021/ol501496n>
53. Murao S.L., Stevens F.J., Ito A., Huberman E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1988. V. 85. P. 1232–1236.
<https://doi.org/10.1073/pnas.85.4.1232>
54. Gai L., Mack J., Liu H., Xu Z., Lu H., Li Z. // *Sens. Actuators B Chem.* 2013. V. 182. P. 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.02.106>
55. Emrullahoğlu M., Üçüncü M., Karakuş E. // *Chem. Commun.* 2013. V. 49. P. 7836–7838.
<https://doi.org/10.1039/C3CC44463E>
56. Liu S.R., Wu S.P. // *Org. Lett.* 2013. V. 15. P. 878–881.
<https://doi.org/10.1021/ol400011u>
57. Long L., Zhang D., Li X., Zhang J., Zhang C., Zhou L. // *Anal. Chim. Acta*. 2013. V. 775. P. 100–105.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.03.016>
58. Zhang Y.R., Chen X.P., Zhang J.Y., Yuan Q., Miao J.Y., Zhao B.X. // *Chem. Commun.* 2014. V. 50. P. 14241–14244.
<https://doi.org/10.1039/C4CC05976J>
59. Wang L., Long L., Zhou L., Wu Y., Zhang C., Han Z., Wang J., Da Z. // *RSC Adv.* 2014. V. 4. P. 59535–59540.
<https://doi.org/10.1039/C4RA10633D>
60. Goswami S., Aich K., Das S., Pakhira B., Ghoshal K., Quah C.K., Bhattacharyya M., Fun H.K., Sarkar S. // *Chem. Asian J.* 2015. V. 10. P. 694–700.
<https://doi.org/10.1002/asia.201403234>
61. Liu Z., Li G., Wang Y., Li J., Mi Y., Guo L., Xu W., Zou D., Li T., Wu Y. // *RSC Adv.* 2018. V. 8. P. 9519–9523.
<https://doi.org/10.1039/C7RA13419C>
62. Jin L., Tan X., Zhao C., Wang Q. // *Anal. Methods*. 2019. V. 11. P. 1916–1922.
<https://doi.org/10.1039/C9AY00105K>
63. Shi L., Yu H., Zeng X., Yang S., Gong S., Xiang H., Zhang K., Shao G. // *New J. Chem.* 2020. V. 44. P. 6232–6237.
<https://doi.org/10.1039/D0NJ00318B>
64. Hu J.J., Wong N.K., Lu M.Y., Chen X., Ye S., Zhao A.Q., Gao P., Kao R.Y.-T., Shen J., Yang D. // *Chem. Sci.* 2016. V. 7. P. 2094–2099.
<https://doi.org/10.1039/C5SC03855C>
65. Chang C.Y., Song M.J., Jeon S.B., Yoon H.J., Lee D.K., Kim I.H., Suk K., Choi D.K., Park E.J. // *Am. J. Pathol.* 2011. V. 179. P. 964–979.
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.04.033>

66. Agrawal I., Sharma N., Saxena S., Arvind S., Chakraborty D., Chakraborty D.B., Jha D., Ghatak S., Epari S., Gupta T., Jha S. // *iScience*. 2021. V. 24. P. 101968–101978.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101968>
67. Zhang R., Zhao J., Han G., Liu Z., Liu C., Zhang C., Liu B., Jiang C., Liu R., Zhao T., Han M.Y., Zhang Z. // *J. Am. Chem. Soc.* 2016. V. 138. P. 3769–3778.
<https://doi.org/10.1021/jacs.5b12848>
68. Zhou Y., Wang Y.K., Wang X.F., Zhang Y.J., Wang C.K. // *Chin. Phys. B*. 2017. V. 26. P. 083102-1–083102-7.
<https://doi.org/10.1088/1674-1056/26/8/083102>
69. Lv J., Wang F., Wei T., Chen X. // *Ind. Eng. Chem. Res.* 2017. V. 56. P. 3757–3764.
<https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b00381>
70. Козлов С.О., Кудрявцев И.В., Грудина Н.А., Костевич В.А., Панасенко О.М., Соколов А.В., Васильев В.Б. // *Acta Biomedica Scientifica*. 2016. Т. 1. С. 86–91.
https://doi.org/10.12737/article_590823a4895537.04307905
71. Sokolov A.V., Kostevich V.A., Kozlov S.O., Donskyi I.S., Vlasova I.I., Rudenko A.O., Zakharova E.T., Vasilyev V.B., Panasencko O.M. // *Free Radic. Res.* 2015. V. 49. P. 777–789.
<https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1017478>
72. Lutsenko V.E., Grigorieva D.V., Gorudko I.V., Cherenkevich S.N., Gorbunov N.N., Kostevich V.A., Panasencko O.M., Sokolov A.V. // *Med. Acad. J.* 2019. V. 19. P. 63–71.
<https://doi.org/10.17816/MAJ19263-71>
73. Choi M.G., Lee Y.J., Lee K.M., Park K.Y., Park T.J., Chang S.K. // *Analyst*. 2019. V. 144. P. 7263–7269.
<https://doi.org/10.1039/C9AN01884K>
74. Yang J., Yao Y., Shen Y., Xu Y., Lv G., Li C. // *ZAAC*. 2020. V. 646. P. 431–436.
<https://doi.org/10.1002/zaac.202000127>
75. Yang J., Zheng W., Shen Y., Xu Y., Lv G., Li C. // *J. Lumin.* 2020. V. 226. P. 117460–117466.
<https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2020.117460>
76. Hansra P., Moran E.L., Fornasier V.L., Bogoch E.R. // *Inflammation*. 2000. V. 24. P. 141–155.
<https://doi.org/10.1023/A:1007033610430>
77. Zheng W., Yang J., Shen Y., Yao Y., Lv G., Hao S., Li C. // *Dyes Pigments*. 2020. V. 179. P. 108404–108410.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108404>
78. Zhang Y., Ma L., Tang C., Pan S., Shi D., Wang S., Li M., Guo Y. // *J. Mater. Chem. B*. 2018. V. 6. P. 725–731.
<https://doi.org/10.1039/C7TB02862H>
79. Bai X., Yang B., Chen H., Shen J., Yang D. // *Org. Chem. Front.* 2020. V. 7. P. 993–996.
<https://doi.org/10.1039/D0QO00081G>
80. Li J., Yin C., Liu T., Wen Y., Huo F. // *Sens. Actuators B Chem.* 2017. V. 252. P. 1112–1117.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.07.171>
81. Liu C., Jiao X., He S., Zhao L., Zeng X. // *Talanta*. 2017. V. 174. P. 234–242.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.012>
82. Jiao C., Liu Y., Pang J., Lu W., Zhang P., Wang Y. // *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 2020. V. 392. P. 112399–112405.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2020.112399>
83. Yang T., Sun J., Yao W., Gao F. // *Dyes Pigments*. 2020. V. 180. P. 108435–108442.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108435>
84. Xu J., Wang C., Ma Q., Zhang H., Tian M., Sun J., Wang B., Chen Y. // *ACS Omega*. 2021. V. 6. P. 14399–14409.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.1c01271>
85. Liu Y., Zhao Z.M., Miao J.Y., Zhao B.X. // *Anal. Chim. Acta*. 2016. V. 921. P. 77–83.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.03.045>
86. Song G.J., Ma H.L., Luo J., Cao X.Q., Zhao B.X. // *Dyes Pigments*. 2018. V. 148. P. 206–211.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.09.022>
87. Meng H., Huang X.Q., Lin Y., Yang D.Y., Lv Y.J., Cao X.Q., Zhang G.X., Dong J., Shen S.L. // *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 2019. V. 223. P. 117355–117360.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117355>
88. Zheng D., Qiu X., Liu C., Jiao X., He S., Zhao L., Zeng X. // *New J. Chem.* 2018. V. 42. P. 5135–5141.
<https://doi.org/10.1039/C8NJ00279G>
89. Liu L., Wei P., Yuan W., Liu Z., Xue F., Zhang X., Yi T. // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. P. 10971–10978.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04601>
90. Chen L., Park S.J., Wu D., Kim H.M., Yoon J. // *Dyes Pigments*. 2018. V. 158. P. 526–532.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.01.027>
91. Das S., Aich K., Patra L., Ghoshal K., Gharami S., Bhattacharyya M., Mondal T.K. // *Tetrahedron Lett.* 2018. V. 59. P. 1130–1135.
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.02.023>
92. Sun J., Zhang L., Hu Y., Fang J. // *Sens. Actuators B Chem.* 2018. V. 266. P. 447–454.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.03.124>
93. Huang Y., Zhang Y., Huo F., Liu Y., Yin C. // *Dyes Pigments*. 2020. V. 179. P. 108387–108393.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108387>
94. Luo P., Zhao X. // *ACS Omega*. 2021. V. 6. P. 12287–12292.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.1c01102>
95. Wu D., Chen L., Xu Q., Chen X., Yoon J. // *Acc. Chem. Res.* 2019. V. 52. P. 2158–2168.
<https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00307>
96. Imaizumi N., Kanayama T., Oikawa K. // *Analyst*. 1995. V. 120. P. 1983–1987.
<https://doi.org/10.1039/AN9952001983>
97. Prütz W.A. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1996. V. 332. P. 110–120.
<https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0322>

Fluorescent Probes for HOCl Detection in Living Cells

V. E. Reut*, I. V. Gorudko*, D. V. Grigorieva*, A. V. Sokolov**, ***, and O. M. Panasenko***, #

#Phone: +7(499)246-44-90, e-mail: o-panas@mail.ru

*Belarusian State University, prosp. Nezavisimosti 4, Minsk, 220030 Belarus

**FGBNU "Institute of Experimental Medicine", ul. Academica Pavlova 12, St. Petersburg, 197376 Russia

***Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, ul. Malaya Pirogovskaya 1a, Moscow, 119435 Russia

Hypochlorous acid (HOCl) plays important role not only in immune system protecting the organism from pathogens, but also, due to its high reactivity, provokes the development and complication of many diseases. Therefore, the development of highly sensitive and selective for HOCl biosensors, including fluorescent probes, for better understanding the roles of HOCl in living systems, is of a great importance. Nevertheless, there are many difficulties, associated with HOCl registration in biological probes (chemo- and photostability, cytotoxicity, fluorescence and absorption characteristics, selectivity, sensitivity etc.). Thus, the development of new chemosensors has been relevant for many years. In this review, we describe classification of small molecular probes for HOCl detection in biological systems, as well as summarize results of the development of chemosensors, their photophysical properties, and biological applications. Particular attention is paid to the achievements in this area over 2016–2021 years. A number of problems related to design and application of small molecular probes were formulated. Due to the absence of a "gold standard" among the HOCl chemosensors, associated among others with the commercial unavailability or complex methods of synthesizing new sensors, some recommendations are given on the field of chemosensors application mentioned. Trends in the development of fluorescent chemosensors for HOCl visualization in living cells were outlined.

Keywords: fluorescence, fluorescent probes, reactive oxygen species, reactive halogen species, hypochlorous acid, chemosensors



УДК 577.352

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ЛИПИДНОЙ МАТРИЦЫ НА МИКРООКРУЖЕНИЕ ЛЕВОФЛОКСАЦИНА В ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ФОРМАХ

© 2022 г. И. М. Ле-Дейген^{*, #}, А. С. Сафронова^{*}, И. М. Колмогоров^{*},
А. А. Скуреедина^{*}, Е. В. Кудряшова^{*}

^{*}Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/3

Поступила в редакцию 15.11.2021 г.

После доработки 17.12.2021 г.

Принята к публикации 21.12.2021 г.

Изучено взаимодействие антибактериального препарата левофлоксацина с липидным бислоем различного состава: 100%-ный дипальмитоилфосфатидилхолин и с добавлением 20% кардиолипина. Для монокомпонентных липосом обнаружено заглубление левофлоксацина в приполярную область на границе раздела фаз липид–вода. Установлена роль анионного липида в механизме взаимодействия активной молекулы с бислоем: левофлоксацин входит в микроокружение фосфатной группы, вытесняя воду, и не продвигается вглубь гидрофобной части бислоя. Впервые проведено изучение микроокружения левофлоксацина в липосоме методами ИК- и КД-спектроскопии. Подобранный подход на основе сочетания нескольких спектральных методов открывает перспективы дизайна новых лекарственных свойств и возможности предсказания характера взаимодействия активных молекул с биомембранами для прогнозирования их эффективности и потенциальных побочных эффектов.

Ключевые слова: липосомы, фторхинолоны, левофлоксацин, ИК-спектроскопия, КД-спектроскопия

DOI: 10.31857/S0132342322040145

ВВЕДЕНИЕ

Как в России, так и в мире актуальна задача терапии тяжелых инфекционных заболеваний, среди которых туберкулез и воспаление легких, в том числе вторичные бактериальные пневмонии, присоединяющиеся к внебольничным COVID-ассоциированным случаям. Антибактериальные препараты фторхинолонового ряда обладают высокой активностью и широким спектром действия, это делает их привлекательными для терапии инфекций легких, что подтверждается, например, включением фторхинолона левофлоксацина в протоколы лечения туберкулеза и вторичных бактериальных пневмоний. В частности, терапия левофлоксацином включена в алгоритм назначения антибактериальной терапии при SARS-CoV-2-ассоциированном повреждении легких у пациентов с COVID-19.

Сокращения: ДПФХ — дипальмитоилфосфатидилхолин; КЛ — кардиолипин; КД-спектроскопия — спектроскопия кругового дихроизма; ЛФ — левофлоксацин; ЛЛФ — липосомальная форма левофлоксацина.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (999) 800-89-55; эл. почта: i.m.deygen@gmail.com).

Для повышения эффективности терапии и снижения риска возникновения побочных эффектов перспективно ингаляционное введение левофлоксацина [1]. Проведены клинические испытания аэрозольного препарата на основе раствора левофлоксацина Aeroquin (MP-376, идентификатор испытания NCT01180634) для борьбы с инфекциями, в том числе вызываемыми *Pseudomonas aeruginosa*, при фиброзе легких [2], однако до конечного пациента препарат не дошел (проходит III фазу клинических испытаний). Необходимо создание систем доставки левофлоксацина для ингаляционного введения, в частности стоит задача повышения сродства систем доставки к тканям легкого [1]. Перспективным вариантом представляются липосомы, строение которых позволяет включать в них гидрофобные, гидрофильные и амфифильные соединения. Для дизайна систем доставки на основе липосомальных форм левофлоксацина необходимо глубокое понимание механизма взаимодействия липидного бислоя с активной молекулой. Известно, что липидный состав мембраны может оказывать существенное влияние на данный процесс [3]; ранее такой эффект в нашей лаборатории был показан

для фторхинолона IV поколения — моксифлоксацина [4].

Заряженные группы липидов, в первую очередь, фосфатные и карбонильные группы на поверхности мембраны, способны образовывать электростатические связи с фторхинолонами. Показано, что данный тип взаимодействий вносит существенный вклад в связывание активных молекул с бислоем [5]. Предположительно, электростатическое взаимодействие также может повысить степень загрузки и обеспечить большее удержание левофлоксацина (ЛФ) во внутренней сфере липосом.

Глубокое понимание механизма взаимодействия ЛФ с липосомами разного состава позволяет оптимизировать липосомальные системы доставки с заданными параметрами с целью контроля высвобождения и регулировки доз применения инкапсулированного антибактериального препарата. Цель настоящей работы — изучение механизма взаимодействия левофлоксацина с липосомальной мембраной в зависимости от ее состава.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для установления механизма взаимодействия ЛФ с липосомальным бислоем и определения факторов, влияющих на этот процесс, были поставлены следующие задачи: 1) определить, как в зависимости от липидного состава изменяется характер взаимодействия липосом с ЛФ, установить основные сайты связывания, определить эф-

фективность загрузки; 2) изучить состояние и микроокружение функциональных групп ЛФ методом спектроскопии кругового дихроизма (КД-спектроскопии).

В зависимости от pH ЛФ может существовать в нескольких формах (рис. 1). Ранее мы установили [4], что моксифлоксацин (антибактериальный препарат того же класса, что и ЛФ) взаимодействует с липидной матрицей в основном за счет протонированного азота гетероцикла. Однако у ЛФ протонированный азот (формы HX^{+-} , H_2X^+ [6, 7]) экранирован метильной группой, таким образом, характер взаимодействия с липидным бислоем у ЛФ может быть иным. Потенциальными сайтами связывания с липидным бислоем выступают ионогенные группы, в то время как заглубление в толщу бислоя малых органических молекул с большим числом полярных групп маловероятно, о чем свидетельствуют данные компьютерного моделирования, проведенного для мембраны на основе дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) и доксорубина [8].

Удобными и хорошо изученными модельными системами для выяснения роли электростатических взаимодействий при включении в липосомы малых органических молекул выступают липосомы ДПФХ 100%, в которых фосфатные группы липидов экранированы от взаимодействия положительно заряженными группами холина, и липосомы ДПФХ : кардиолипин (КЛ) 80 : 20% (*m/m*), обладающие выраженными анионными свой-

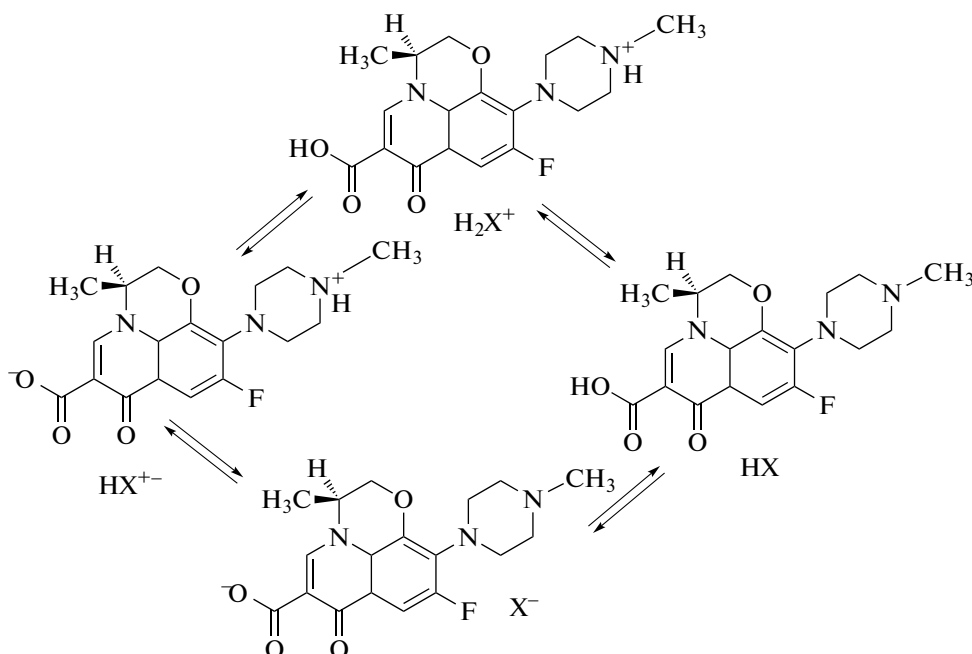


Рис. 1. Ионогенные формы левофлоксацина в растворе. Величины pK_a для переходов: $pK_{a1} = 7.31$; $pK_{a2} = 8.22$; $pK_{a3} = 7.14$; $pK_{a4} = 6.29$ [6, 7].

ствами. Предположительно, дополнительный отрицательный заряд на везикулах, привносимый за счет добавления КЛ, способен внести изменения в характер взаимодействия липосом с ЛФ за счет формирования дополнительных электростатических взаимодействий с гетероциклом фторхинолона.

Получение липосомальных форм левофлоксацина и определение эффективности включения. Из литературы известно, что липидный состав оказывает существенное влияние на физико-химические свойства липосомальных форм малых лекарственных молекул [9], в том числе антибактериальных препаратов. Для левофлоксацина показано, что добавка холестерина к липосомам из фосфатидилхолина яичного желтка значительно уменьшает эффективность включения ЛФ при пассивной загрузке [10] — от 20 до 9%, что указывает на неблагоприятное действие повышенной жесткости мембраны на эффективность загрузки.

В работе рассмотрены липосомы ДПФХ 100% с характерной величиной ζ -потенциала — 10 мВ и липосомы, содержащие 20% КЛ, с электрокинетическим потенциалом — 20 мВ. Включение левофлоксацина практически не влияло на ζ -потенциал ДПФХ-липосом и незначительно (сравнимо с величиной погрешности) снижало ζ -потенциал анионных липосом (табл. 1). Включение ЛФ в липосомы не приводило к значимому изменению размера везикул, что наблюдалось ранее для липосомальной формы моксифлоксацина [4].

Степень включения левофлоксацина в липосомы определяли по материальному балансу путем регистрации УФ-спектров промывных вод после диализа. Для ЛФ характерна полоса поглощения с максимумом интенсивности при $\lambda = 285\text{--}287$ нм (в зависимости от pH), соответствующая поглощению ароматического остова фторхинолона. Данный пик представляется удобным для анализа содержания препарата в растворе.

Были достигнуты высокие значения эффективности включения ЛФ: ~50%, что соответствовало ~4%-ному массовому соотношению ЛФ : липиды. Известно, что максимально возможное для малых лекарственных молекул соотношение 10% соответствует уже образованию нанокристаллов

лекарства внутри водной полости бислоя [11]. Ранее для моксифлоксацина [4] было достигнуто массовое соотношение 5–6% в зависимости от состава липидной матрицы. В экспериментах с ЛФ добавление в бислой анионного липида не приводило к достоверному повышению эффективности загрузки, что указывает на незначительный вклад электростатических взаимодействий, однако для уточнения характера взаимодействия необходимо дополнительно изучить липосомальные формы ЛФ спектральными методами анализа.

Определение сайтов связывания липосом различного состава с левофлоксацином методом ИК-спектроскопии. Для изучения механизма взаимодействия ЛФ с липосомальной мембраной, определения основных сайтов связывания и для выявления различий в структуре загруженных липосом разного состава предложено использовать метод ИК-спектроскопии Фурье.

ИК-спектроскопия Фурье — это высокоинформативный спектральный метод, подходящий для изучения сложных коллоидных систем, в том числе липосом [12, 13]. Данный метод позволяет детально изучить взаимодействие ЛФ с различными функциональными группами липидов. ИК-спектры липосом содержат ряд основных полос поглощения, информативных при анализе взаимодействия липосом с различными молекулами. На рис. 2 приведен ИК-спектр липосом ДПФХ 100%. Симметричным и асимметричным валентным колебаниям CH_2 -группы соответствуют полосы в области 2850 ± 1 и 2919 ± 1 см^{-1} . Эти полосы поглощения чувствительны к изменениям упаковки ацильных цепей липосом [14]. Полоса поглощения карбонильной группы расположена в области $1715\text{--}1750$ см^{-1} , она чувствительна к изменениям микроокружения на поверхности липид-вода. Для фосфатной группы фосфолипидов характерны две полосы валентных колебаний: νPO_2^- s 1088 см^{-1} и νPO_2^- as $1250\text{--}1230$ см^{-1} .

Аналитически значимая полоса νPO_2^- as представляет наибольший интерес как чувствительная к взаимодействию катионных лигандов с полярной головной частью липосом. Изменение положения полос поглощения и их формы указывает

Таблица 1. Основные параметры липосомальных форм левофлоксацина (ЛЛФ) в сравнении с контрольными незагруженными липосомами

Образец	Эффективность включения, %	ζ -Потенциал, мВ	Dh , нм (Z-Ave)
Липосомы ДПФХ 100%	—	-10.1 ± 0.5	103 ± 2
ЛЛФ ДПФХ 100%	55 ± 2	-10.3 ± 0.2	100 ± 2
Липосомы ДПФХ : КЛ 80 : 20	—	-20.1 ± 1.0	100 ± 2
ЛЛФ ДПФХ : КЛ 80 : 20	51 ± 7	-21.5 ± 1.0	103 ± 3

Примечание: 0.01 М натрий-фосфатный буферный раствор (pH 7.4), 22°C. Dh — гидродинамический радиус.

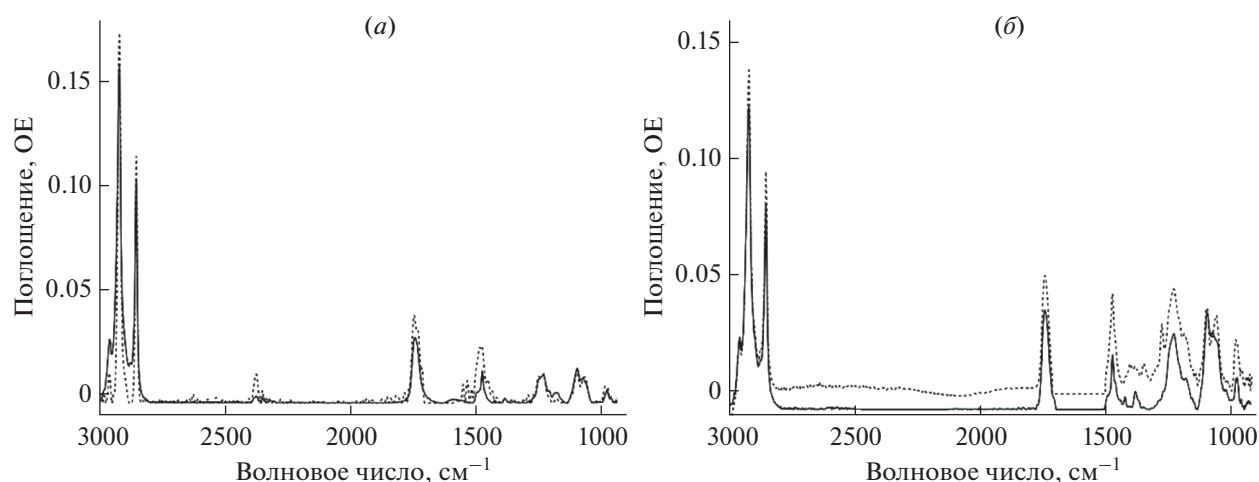


Рис. 2. ИК-спектры липосом: (а) — ДПФХ 100% (сплошная линия) и ДПФХ 100%, нагруженные левофлоксацином (пунктир); (б) — ДПФХ : КЛ 80 : 20% (сплошная линия) и ДПФХ : КЛ, нагруженные левофлоксацином (пунктир). Условия: 0.02 М натрий-фосфатный буферный раствор (рН 7.4), 22°C; концентрация липидов 5 мг/мл.

на изменение микроокружения соответствующих функциональных групп. Таким образом, анализ ИК-спектров позволяет выявлять основные сайты связывания лигандов, в том числе малых органических молекул [15].

Рассмотрим различия в ИК-спектрах ДПФХ-липосом и липосомальной формы левофлоксацина (ЛЛФ) ДПФХ (рис. 2, табл. 2). Включение ЛФ в липосомы не приводило к существенным изменениям в областях поглощения валентных колебаний CH_2 -групп, что свидетельствует о том, что гидрофобная часть бислоя не включена во взаимодействие с ЛФ. Это ожидаемо, т.к. существенное влияние на плотность упаковки цепей могут оказывать, как правило, молекулы с крупным гидрофобным фрагментом, например, гидрофобизированный доксорубин [16]. Для полосы фосфатной группы наблюдается незначительное изменение, связанное с увеличением интенсивности плеча пика 1240 см^{-1} . Данные изменения в спектре связаны со снижением степе-

ни гидратации фосфатной группы и могут свидетельствовать о двух процессах. Возможно электростатическое связывание фосфатной группы с катионным лигандом, обычно при этом смещается и основной пик 1223 см^{-1} [17]; с другой стороны, плечо 1240 см^{-1} может также быть связано с вытеснением из микроокружения фосфатной группы воды. Поскольку и в ЛФ, и в ДПФХ заряд экранирован от взаимодействия, а плечо 1260 см^{-1} не наблюдается в спектре, мы предполагаем, что изменения в области поглощения фосфатной группы связаны с заглублением ЛФ в бислой вплоть до границы раздела фаз липид–вода. Об этом также свидетельствуют изменения в области поглощения карбонильной группы: данная полоса претерпевает характерное расщепление, описанное ранее [17]. Компонента 1740 см^{-1} , соответствующая низкогидратированным карбонильным группам, характерна для электростатического взаимодействия на границе раздела фаз липид–вода. По-видимому, ЛФ частично вытесняет воду из

Таблица 2. Положение основных полос поглощения в ИК-спектрах липосомальной формы левофлоксацина ДПФХ 100% в сравнении с незагруженными липосомами

Образец	$\nu\text{CH}_2\text{ as}, \text{ см}^{-1}$	$\nu\text{CH}_2\text{ s}, \text{ см}^{-1}$	$\nu\text{CO}, \text{ см}^{-1}$	$\nu\text{PO}_2^-\text{ as}, \text{ см}^{-1}$
Липосомы ДПФХ 100%	2918	2850	1737	1223
Интерпретация	Гелеобразное состояние			
ЛЛФ ДПФХ 100%	2918	2850	1740, 1725	1221, 1240
Интерпретация	Включение ЛФ не влияет на гидрофобную часть бислоя		Взаимодействие с ЛФ на границе раздела фаз липид : вода	Вытеснение воды из микроокружения фосфатной группы

Примечание: 0.01 М натрий-фосфатный буферный раствор, рН 7.4, 22°C. Ошибка определения максимума полосы поглощения — 1 см^{-1} .

микроокружения карбонильной и фосфатной групп. Аналогичный характер взаимодействия мы наблюдали для моксифлоксацина [4]: ДПФХ-мембрана не способна к существенному электростатическому взаимодействию с фторхинолонами.

Для анионных липосом состава ДПФХ : КЛ 80 : 20% наблюдается иная спектральная картина (табл. 3). Сравнивая положение основных полос поглощения в спектрах незагруженных липосом ДПФХ и ДПФХ : КЛ 80 : 20%, следует отметить существенные различия в областях, характерных для карбонильной и фосфатной групп. Эти различия ожидаемы и соответствуют включению в состав липосом анионного липида КЛ.

Полоса поглощения карбонильной группы в спектре липосом ДПФХ : КЛ 80 : 20% расщеплена на две компоненты, соответствующие высоко- (1723 см^{-1}) и низкогидратированному (1739 см^{-1}) состояниям, а в спектре ДПФХ-липосом представляет собой единый пик. Включение ЛФ в бислои приводит к изменению вида полос в обоих случаях. У ДПФХ-мембраны мы наблюдали расщепление полосы за счет появления плеча, связанного с низкогидратированными карбонильными группами. Для смешанных анионных липосом включение в бислой ЛФ приводит к единообразному смещению полосы на 1740 см^{-1} . Компонента высокогидратированного состояния, по-видимому, соответствующая несвязанным карбонильным группам КЛ, исчезает. Вероятно, эти спектральные изменения связаны с взаимодействием данных функциональных групп с ЛФ и вытеснением молекул воды из их микроокружения. Таким образом, как для липосом ДПФХ 100%, так и для ДПФХ : КЛ 80 : 20% карбонильные группы липидов — важный сайт связывания ЛФ.

Примечательны изменения в области поглощения фосфатной группы. Здесь изменения в состоянии бислоя носят еще более выраженный характер по сравнению с липосомами ДПФХ 100%: существенно увеличиваются доли компонент, соответствующих низкогидратированным фосфат-

ным группам, связанных с ЛФ. Очевидно, включение КЛ в состав бислоя обуславливает более интенсивное взаимодействие ЛФ с везикулами на поверхности.

Полученные данные свидетельствуют о различии механизмов связывания ЛФ с липосомами различного состава. ЛФ, по-видимому, не способен существенным образом влиять на подвижность гидрофобных цепей бислоя, и взаимодействие происходит на поверхности раздела фаз липид—вода. Присутствие анионного липида КЛ, вероятно, усиливает это взаимодействие за счет образования электростатических связей. Однако, если сравнивать эти результаты с полученными ранее для моксифлоксацина [4], следует отметить, что способность ЛФ к взаимодействию с бислоем несколько меньше, что может быть объяснено двумя факторами. С одной стороны, моксифлоксацин — наиболее липофильный фторхинолон, а с другой стороны, азот в его гетероцикле не метилирован и открыт ко взаимодействию с липидами. Для того чтобы более детально рассмотреть взаимодействие ЛФ с бислоем, рассмотрим, как меняется микроокружение самого фторхинолона при включении в бислой методами ИК-спектроскопии Фурье и КД-спектроскопии.

Изучение состояния левофлоксацина в липосомах методом ИК-спектроскопии Фурье. Сравнение спектров свободного ЛФ со спектрами ЛЛФ позволит соотносить полученные спектральные данные для липосомальных форм с ионогенным состоянием фторхинолона.

ИК-спектр ЛФ наиболее информативен в диапазоне $1800\text{--}950\text{ см}^{-1}$: здесь расположены полосы поглощения 1456 и 979 см^{-1} , соответствующие колебаниям ароматического остова и пиперазольного фрагмента [18]. Эти полосы аналитически значимы и могут быть использованы для определения содержания ЛФ, а также его правовращающего стереоизомера офлоксацина в системе.

Рассмотрим влияние pH на спектры ЛФ, что позволит соотнести ИК-спектры ЛФ в матрицах

Таблица 3. Положение основных полос поглощения в ИК-спектрах липосомальной формы левофлоксацина ДПФХ : КЛ 80 : 20% в сравнении с незагруженными липосомами

Образец	$\nu\text{CH}_2\text{ as, см}^{-1}$	$\nu\text{CH}_2\text{ s, см}^{-1}$	$\nu\text{CO, см}^{-1}$	$\nu\text{PO}_2^-\text{ as, см}^{-1}$
Липосомы ДПФХ : КЛ 80 : 20	2919	2851	1739, 1723 (плечо)	1225
Интерпретация	Гелеобразное состояние			
ЛЛФ ДПФХ : КЛ 80 : 20	2918	2851	1740	1220, 1225, 1265
Интерпретация	Включение ЛФ не влияет на гидрофобную часть бислоя		Взаимодействие с ЛФ на границе раздела фаз липид : вода	Вытеснение воды из микроокружения фосфатной группы

Примечание: 0.01 М натрий-фосфатный буферный раствор, pH 7.4, 22°C. Ошибка определения максимума полосы поглощения — 1 см^{-1} .

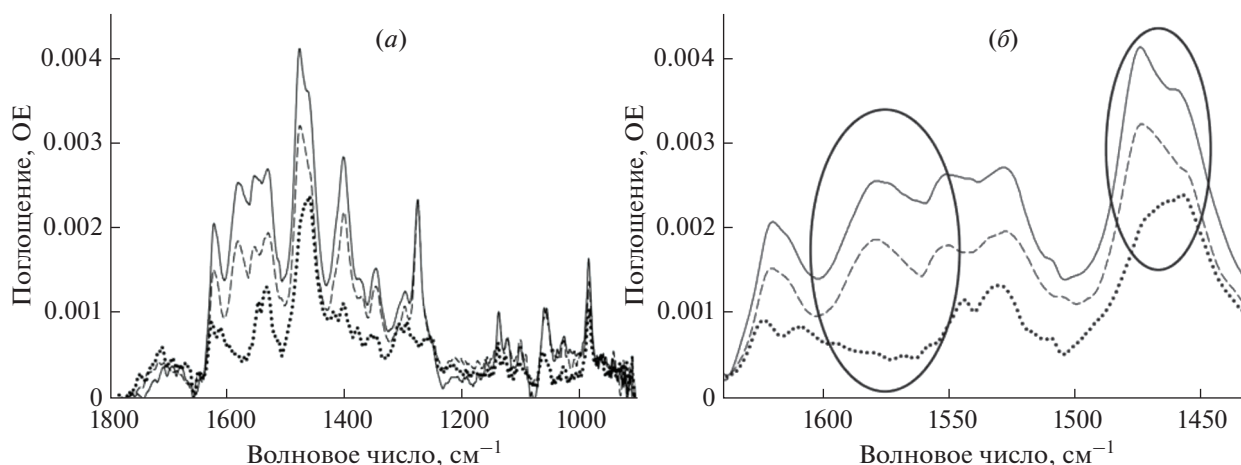


Рис. 3. ИК-спектры левофлоксацина (1 мг/мл) при pH 7.0 (сплошная линия), pH 4.0 (прерывистая) и pH 2.0 (точки) в области 1800–950 см^{-1} (а) и 1650–1450 см^{-1} (б).

систем доставки с ионногенным состоянием, которое будет преобладать в этой системе. В молекуле ЛФ присутствуют две ионогенные группы: карбоксильная группа, сопряженная с ароматической структурой хинолона, и пиперазольная группа.

Изменение pH существенно влияет на состояние молекулы, что сопровождается значительными изменениями в ИК-спектре молекулы при повышении pH с 2 до 4 и далее до pH 7 (рис. 3а). Существенные изменения наблюдаются в области 1640–1600 (область колебаний карбонильной и карбоксильной групп) и 1590–1400 см^{-1} (область колебаний ароматической структуры хинолона) (рис. 3б). Повышение pH приводит к появлению полосы 1580 см^{-1} , соответствующей депротонированной карбоксильной группе, а также к существенным изменениям в структуре полос 1470–1450 см^{-1} — полосы с основным вкладом валентных колебаний С—С ароматического кольца и полос 1400–1339 см^{-1} , относящихся к колебаниям связи С—N (ароматический третичный амин и амин пиперазольного кольца). Существенное изменение наблюдается также для области поглощения связи С=О карбоксильной группы (1270 см^{-1}): повышение pH приводит к проявлению данной полосы поглощения (рис. 3а).

Анализ ИК-спектров, полученных при разных значениях pH (рис. 3), позволил провести соотношение основных полос поглощения ЛФ с использованием литературных данных [18, 19]. Так, полосы 1730–1720 и 1622 см^{-1} соответствует валентным колебаниям связи С=О в карбоксильной и карбонильной группе соответственно, 1580 см^{-1} — полоса депротонированной карбоксильной группы, полосы поглощения 1606–1549 см^{-1} соответствуют колебаниям связей С=C в структуре хино-

лона, группа полос 1500–1400 см^{-1} относится к колебаниям связей С—С ароматического остова, которые могут перекрываться с колебаниями метильной группы связи $\text{CH}_3\text{—N}$, полосы поглощения 1390–1350 и 1208 см^{-1} , наиболее вероятно, относятся к колебаниям связи С—N (ароматический третичный амин), полоса поглощения 1339 см^{-1} чувствительна к протонированию пиперазольного кольца и соответствует связи С—N пиперазольной группы, полоса 1283–1270 см^{-1} отнесена к колебаниям связи С—О карбоксильной группы, полоса 1100 см^{-1} соответствует колебаниям связи С—О—С; колебаниям связи С—F соответствуют полосы в области 1053–1028 см^{-1} ; полоса 979 см^{-1} соответствует колебаниям пиперазольного остова колебания связей С—N и С—H.

При включении ЛФ в липосомы в ИК-спектре фторхинолона наблюдаются небольшие изменения (рис. 4). Единообразно изменяется форма полосы поглощения 1474 см^{-1} , соответствующей поглощению ароматического остова. Плечо 1458 см^{-1} , характерное для полосы поглощения в спектре свободного ЛФ, исчезает при включении в липосомы, что указывает на изменение микроокружения фторхинолона за счет взаимодействия с бислоем. Обращает на себя внимание снижение интенсивности полосы поглощения 1580 см^{-1} , соответствующей колебаниям депротонированной карбоксильной группы, причем наиболее выражен этот эффект для анионных липосом. Это хорошо согласуется с данными, представленными выше: очевидно, что взаимодействие ЛФ с липосомами ДПФХ: КЛ происходит в приповерхностном слое.

Изучение состояния левофлоксацина в липосомах методом КД-спектроскопии. КД-спектроскопия — высокоинформативный метод анализа

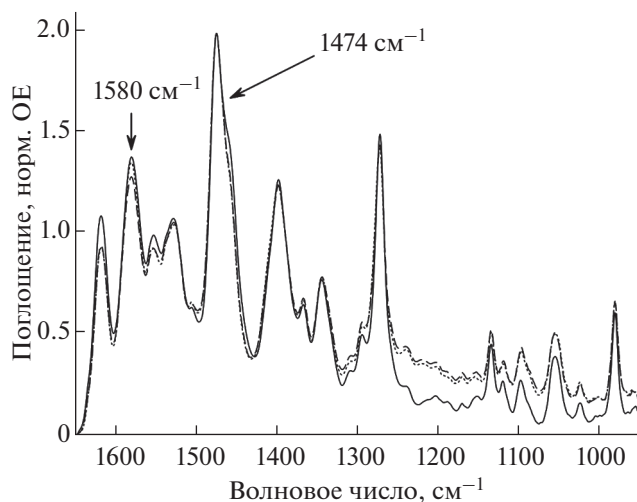


Рис. 4. Нормированные ИК-спектры свободного левофлоксацина (сплошная линия), левофлоксацина в липосомах ДПФХ (пунктир) и ДПФХ:КЛ (точки). Условия: 0.02 М натрий-фосфатный буферный раствор (рН 7.4), 22°C.

микроокружения и ионогенной формы оптически активных молекул, в частности фторхинолонов, в ахиральных матрицах, таких как липосомы. Изучение состояния хиральных молекул, таких как ЛФ, в липидных везикулах, — удобный способ определения механизма взаимодействия лекарств с бислоем.

В КД-спектре ЛФ наиболее информативна область в интервале 220–310 нм с характерными максимумами и минимумами эллиптичности [20]. Для того чтобы проанализировать изменения в спектрах КД при включении ЛФ в бислой, необходимо в независимых экспериментах про-

следить, как изменяется спектр ЛФ при изменении ионного состояния.

В зависимости от рН буферного раствора ЛФ находится в различных ионогенных формах (рис. 1), что отражается на КД-спектре (рис. 5а) [21]. В КД-спектре ЛФ наблюдаются два минимума: пик в области 287–300 нм соответствует сопряженной ароматической системе ЛФ (“первый минимум”), а пик при 222–231 нм в основном соответствует карбонильным и карбоксильным группам ЛФ (“второй минимум”). Помимо двух минимумов удается зафиксировать на спектре максимум в области 268–285 нм, однако его анализ затруднен: пик очень широкий.

При рН 4.0 основная форма — H_2X^+ с характерным видом спектра (первый минимум 297 ± 0.5 нм, второй минимум 222 ± 0.5 нм). В растворе с физиологическим значением рН 7.4 устанавливается равновесие между несколькими формами, а именно HX , HX^{+-} , X^- , что приводит к существенным изменениям в спектре, в первую очередь к смещению положения максимума на 16 нм в синюю область (268 ± 0.5 нм) и к смещению второго минимума в красную область на 6 нм (226 ± 0.5 нм). В щелочной среде (рН 9.2) преобладает форма X^- , завершается смещение первого минимума в синюю область: итоговое смещение при переходе от рН 4.0 (полностью протонированная форма, 287 ± 0.5 нм) до рН 9.2 составляет 10 нм (297 ± 0.5 нм).

КД-спектры ЛФ очень чувствительны к изменению ионогенного состояния молекулы. С другой стороны, полярность микроокружения ЛФ также влияет на спектр. Например, при переходе в апротонный полярный растворитель 1,4-диоксан, который в первом приближении соответствует полярной части липидного бислоя, КД-спектр меняется существенно. По сравнению с

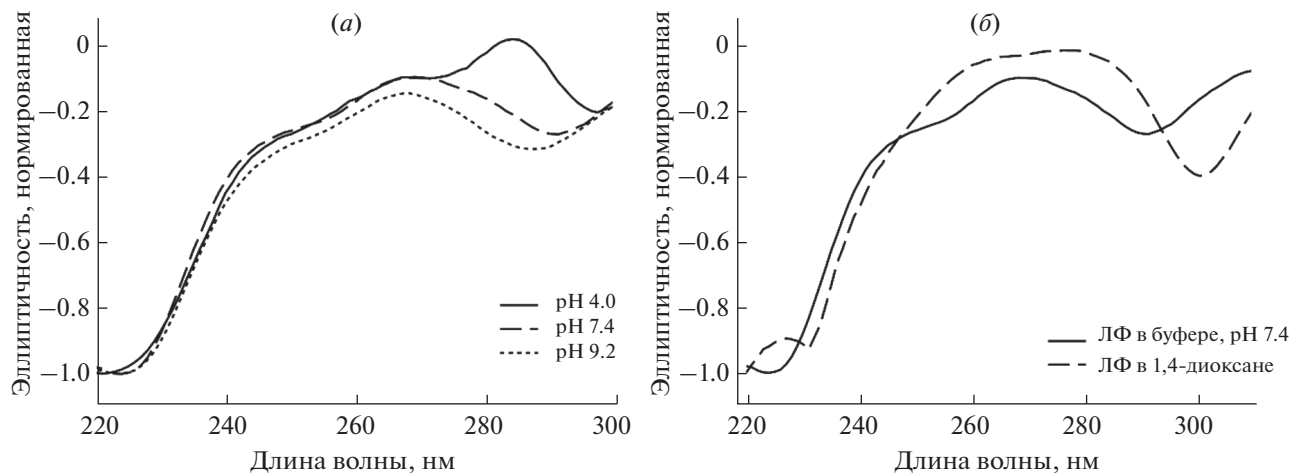


Рис. 5. Нормированные КД-спектры левофлоксацина: (а) — в различных буферных растворах: рН 4.0 (0.1 М раствор соляной кислоты), рН 7.4 (0.02 М натрий-фосфатный буферный раствор), рН 9.2 (0.02 М боратный буферный раствор); (б) — в различных средах: рН 7.4 (0.02 М натрий-фосфатный буферный раствор, 1,4-диоксан), 25°C.

Таблица 4. Положение основных полос в КД-спектре левофлоксацина в различных средах

Положение пика, нм	Функциональная группа	pH 4.0	pH 7.4	pH 9.2	1,4-Диоксан	ЛЛФ ДПФХ 100%	ЛЛФ ДПФХ : КЛ 80 : 20
Первый минимум	Сопряженная ароматическая система	297 ± 0.5	291 ± 0.5	287 ± 0.5	300 ± 0.5	296 ± 0.5	294 ± 0.5
Второй минимум	Карбонильные и карбоксильные группы + ароматический остов	222 ± 0.5	224 ± 0.5	223 ± 0.5	231 ± 0.5	229 ± 0.5	224 ± 0.5
Формы ЛФ	H_2X^+		NH , NH^{+-} , X^-	X^-	NH	Взаимодействие с бислоем на поверхности липид–вода	Взаимодействие преимущественно на поверхности бислоя

Примечание: эксперимент проведен в следующих средах: 0.1 М раствор соляной кислоты (pH 4.0); 0.02 М натрий фосфатный буферный раствор (pH 7.4); 0.01 М натрий-боратный буферный раствор (pH 9.2). Концентрация левофлоксацина во всех случаях составляла 2 мМ, 22°C.

водной средой, в 1,4-диоксане переход между разными ионогенными формами подавлен, и наблюдаемый спектр соответствует форме NH (рис. 5б). Относительно спектра раствора ЛФ в физиологическом pH спектр в 1,4-диоксане смещен единообразно в красную область, при этом наиболее ярко проявляется первый минимум (табл. 4). Это хорошо согласуется с литературными данными: так, при увеличении гидрофобности среды для тирозина и триптофана в КД-спектрах будет наблюдаться сдвиг в красную область [22].

Первый минимум в ближней УФ-области изменяется аналогично подобному минимуму поглощения у триптофана, сдвигаясь в красную об-

ласть при уменьшении полярности растворителя [22]. Второй минимум смещается при переходе в органический растворитель более заметно: на 9 нм в красную область, что ожидаемо для пика, соответствующего карбоксильным и карбонильным группам в ЛФ.

Первый минимум удобен для изучения состояния ЛФ в зависимости от pH среды: чем выше pH, тем дальше в синюю область сдвинут пик. Также первый минимум чувствителен к гидрофильности среды. Второй минимум удобен для оценки гидрофильно-гидрофобного баланса микроокружения ЛФ: при смене среды с водной на органическую пик смещается в красную область.

Влияние включения в липосомы на КД-спектр левофлоксацина. Рассмотрим изменения, наблюдаемые в КД-спектре ЛФ при включении его в липосомы (табл. 4, рис. 6).

Для ДПФХ-липосом включение ЛФ приводит к смещению первого минимума в спектре на 5 нм в красную область (с 291 на 296 нм) и второго минимума на 5 нм (с 224 до 229 нм). Данные изменения указывают на возможное протонирование карбоксильных групп и изменение микроокружения ЛФ на более гидрофобное. Эти данные подкрепляют предположение, сделанное на основе ИК-спектроскопии Фурье: ЛФ способен заглубляться в ДПФХ-бислой, взаимодействуя с границей раздела фаз липид–вода.

При введении в состав липосом анионного липида КЛ изменения в КД-спектре носят менее выраженный характер. Первый минимум аналогично смещается на 3 нм — до 294 нм, а второй остается неизменным. Взаимодействие ЛФ с липосомами ДПФХ : КЛ 80 : 20 не приводит к изменению гидрофильности микроокружения лекар-

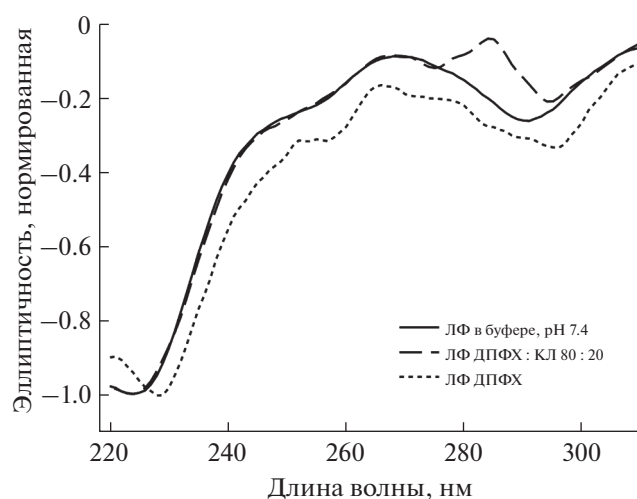


Рис. 6. Нормированные КД-спектры левофлоксацина в буферном растворе (0.02 М натрий-фосфатный буферный раствор, pH 7.4) и в липосомальных формах (ДПФХ : КЛ 80 : 20% и ДПФХ 100%), 25°C.

ственной молекулы; взаимодействие, по-видимому, носит поверхностный характер за счет вытеснения воды в микроокружении фосфатных групп липидов.

Полученные данные позволяют предположить, что в нейтральных липосомах ЛФ встраивается в бислой глубже относительно анионных липосом. Возможно, бислой, содержащий КЛ, за счет взаимодействия фосфатных групп КЛ с протонированным гетероциклом удерживает ЛФ у поверхности, не позволяя ему заглубиться в мембрану.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. В работе использованы левофлоксацин, 1,4-диоксан (Sigma-Aldrich, США); HCl, лимонная кислота (тв.), динатрия гидрофосфат (двенадцативодный кристаллогидрат), бура $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (Реахим, Россия); таблетки для приготовления натрий-фосфатного буферного раствора с pH 7.4 (ПанЭко, Россия); кардиолипин (КЛ) динатриевая соль, раствор в хлороформе (25 мг/мл); дипальмитоилфосфатидилхолин, раствор в хлороформе (ДПФХ) — препараты фирмы Avanti Polar Lipids (США). В работе использовали буферные растворы: 0.1 М солянокислый буферный раствор (pH 4.0); 0.02 М натрий-фосфатный буфер (pH 7.4); 0.01 М боратный буферный раствор (pH 9.2).

Получение липосом. Раствор липидов в хлороформе был взят в весовом соотношении ДПФХ : КЛ 80 : 20%, органический растворитель тщательно удаляли на вакуумном ротаторном испарителе (Ика, Германия) при температуре, не превышающей 55°C. Образующуюся тонкую пленку липидов диспергировали в 0.02 М натрий-фосфатном буфере (pH 7.4). Препарат в течение 5 мин подвергали воздействию ультразвуковой ванны (37 Гц). Далее препарат был обработан ультразвуком (22 кГц) в течение 600 с (2×300 с) в непрерывном режиме при постоянном охлаждении на диспергаторе 4710 (Cole-Parmer Instrument, США).

Получение липосомальных форм левофлоксацина. Для получения загруженных левофлоксацином липосом (ЛЛФ) методом пассивной загрузки была использована ранее описанная методика [4]. Липидную пленку диспергировали 0.01 М натрий-фосфатным буферным раствором (pH 7.4), содержащим левофлоксацин (4 мг/мл). Полученную суспензию в течение 5 мин подвергали воздействию ультразвуковой ванны (37 Гц), затем обрабатывали ультразвуком (22 кГц) в течение 600 с (2×300 с) в непрерывном режиме при постоянном охлаждении на диспергаторе 4710 (Cole-Parmer Instrument, США). Свободный ле-

вофлоксацин отделяли методом диализа против натрий-фосфатного буферного раствора (Serva MW cut-off 3500) в течение 2 ч с последующим определением степени включения ЛФ в везикулы.

УФ-спектроскопия. УФ-спектры левофлоксацина регистрировали на спектрометре УФ- и видимого диапазона UltraSpec 2100 pro (Amersham Biosciences, США) в интервале 200–400 нм в кварцевой кювете на 1 мл (Hellma Analytics, Германия). Основной характеристический пик левофлоксацина наблюдался при 287 нм.

ИК-спектроскопия. Спектры регистрировали с помощью ИК-Фурье-спектрометра Tensor 27 (Bruker, Германия), оснащенного МСТ-детектором, охлаждаемым жидким азотом, и термостатом (Huber, США). Измерения проводили в термостатируемой ячейке BioATR II (Bruker, Германия) с использованием элемента однократного отражения из ZnSe при 22°C и постоянной продувке системы сухим воздухом с помощью компрессора (JUN-AIR, Германия). На элемент внутреннего отражения наносили аликвоту (50 мкл) соответствующего раствора, спектр регистрировали трижды в интервале от 4000–950 cm^{-1} с разрешением 1 cm^{-1} ; производили 70-кратное сканирование и усреднение. Спектр фонового раствора регистрировался аналогично и автоматически вычитался из спектра образца. Для анализа спектров использовали программу Opus 7.0 (Bruker, Германия). При регистрации ИК-спектров липосом, загруженных ЛФ, в качестве фонового раствора использовали раствор ЛФ в равной концентрации. При регистрации ИК-спектров ЛФ в липосомах в качестве фонового раствора использовали суспензии соответствующих незагруженных липосом.

КД-спектроскопия. КД-спектры регистрировали на спектрометре кругового дихроизма J-815 (Jasco, Япония) с термостатированным кюветным отделением в интервале длин волн 310–220 нм. В типичном эксперименте образец, содержащий 0.25–0.5 мг/мл препарата с фторхинолоном в соответствующем растворителе, помещали при заданной температуре в кварцевую кювету с длиной пути 1 мм (Hellma Analytics, Германия).

Динамическое рассеяние света. Измерение размеров частиц и их ζ -потенциалов проводили с помощью анализатора размера частиц Zetasizer Nano S (Malvern, Англия; 4 мВт He–Ne-лазер, 633 нм) в термостатируемой ячейке при 22°C с использованием программного обеспечения Malvern.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованы липосомальные формы левофлоксацина и их свойства. Определено, что состав липосом (анионный либо нейтральный) не влияет на загрузку фторхинолона, удалось получить формы с относительно высокой эффективностью включения — с массовым процентным соотношением лекарство : липид 4%. Методом ИК-спектроскопии Фурье установлено, что у ДПФХ-липосом ЛФ заглубляется в приполярную область на границе раздела фаз липид–вода. При взаимодействии со смешанными анионными липосомами установлена роль анионного липида в механизме взаимодействия активной молекулы с бислоем: ЛФ входит в микроокружение фосфатной группы, вытесняя воду, и не продвигается глубже.

Предложенный механизм подтвержден данными КД-спектроскопии. Обнаружено, что КД-спектр ЛФ в интервале длин волн 220–350 нм содержит три пика, отвечающих за микроокружение функциональных групп ЛФ: минимум в интервале 285–305 нм, соответствующий состоянию сопряженной азотсодержащей ароматической структуры, который сдвигается в коротковолновую область при повышении pH и в длинноволновую область при переходе в апротонный органический растворитель (при понижении гидрофильности среды); минимум в интервале 220–235 нм, соответствующий состоянию карбоксильной и карбонильной групп, а также двойных связей, который незначительно смещается при изменении pH и сдвигается в длинноволновую область при понижении гидрофильности среды; минимум в интервале 265–285 нм, соответствующий состоянию ароматической структуры, который сдвигается в коротковолновую область при повышении pH и смещается в длинноволновую при понижении гидрофильности среды.

Полученные экспериментальные данные позволяют сделать вывод о механизме взаимодействия малых органических молекул, в первую очередь антибактериальных препаратов, с бислоем. Подобный подход на основе сочетания трех спектральных методов открывает перспективы создания новых лекарственных свойств и возможности предсказания характера взаимодействия активных молекул с биомембранами для прогнозирования их эффективности и потенциальных побочных эффектов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Правительства Москвы в рамках научного проекта 21-33-70035.

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. *Weers J.* // Adv. Drug Deliv. Rev. 2015. V. 85. P. 24–43. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.08.013>
2. *Geller D.E., Flume P.A., Staab D., Fischer R., Loutit J.S., Conrad D.J.* // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2011. V. 183. P. 1510–1516. <https://doi.org/10.1164/rccm.201008-1293OC>
3. *Andrade S., Ramalho M.J., Loureiro J.A., Pereira M.C.* // J. Mol. Liquids. 2021. V. 334. P. 116141. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116141>
4. *Le-Deygen I.M.* // Chem. Phys. Lipids. 2020. V. 228. P. 104891. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2020.104891>
5. *Matos C., Moutinho C., Lobão P.* // J. Membr. Biol. 2012. V. 245. P. 69–75. <https://doi.org/10.1007/s00232-011-9414-2>
6. *Ska-Szumko E.K., Grudzień M., Bellejewska-Kielak K., Pluciński F., Biernacka J., Mazurek A.P.* // Acta Chim. Slov. 2014. V. 61. P. 827–834. <https://journals.matheo.si/index.php/ACSi/article/view/562>
7. *Ross D.L., Riley C.M.* // Int. J. Pharm. 1992. V. 83. P. 267–272. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(82\)90032-1](https://doi.org/10.1016/0378-5173(82)90032-1)
8. *Yacoub T.J., Reddy A.S., Szleifer I.* // Biophys. J. 2011. V. 101. P. 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.06.015>
9. *Mohammed A.R., Weston N., Coombes A.G.A., Fitzgerald M., Perrie Y.* // Int. J. Pharm. 2004. V. 285. P. 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.07.010>
10. *Сорокоумова Г.М., Ясин Я.О.Х., Микулович Ю.Л., Смирнова Т.Г., Андреевская С.Н., Селищева А.А., Черноусова Л.Н., Швеиц В.И.* // Вестник МИТХТ. 2013. Т. 5. С. 72–76. <https://www.finechem-mirea.ru/jour/article/view/531>
11. *Barenholz Y.* // J. Control. Release. 2012. V. 160. P. 117–134. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>
12. *Bensikaddour H., Fa N., Burton I., Deleu M., Lins L., Schanck A., Brasseur R., Dufrène Y.F., Goormaghtigh E., Mingeot-Leclercq M.P.* // Biophys. J. 2008. V. 94. P. 3035–3046. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.08.015>
13. *Deygen I.M., Kudryashova E.V.* // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2016. V. 141. P. 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.01.030>
14. *Manrique-Moreno M., Howe J., Suwalsky M., Garidel P., Brandenburg K.* // Letters in Drug Design & Discovery. 2009. V. 7. P. 50–56. <https://doi.org/10.2174/157018010789869280>

15. *Tretiakova D., Le-Deigen I., Onishchenko N., Kuntsche J., Kudryashova E., Vodovozova E.* // *Pharmaceutics*. 2021. V. 13. P. 473.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040473>
16. *Deygen I.M., Seidl C., Kolmel D.K., Bednarek C., Heissler S., Kudryashova E.V., Braese S.* // *Langmuir*. 2016. V. 32. P. 10861–10869.
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b01023>
17. *Deygen I.M., Kudryashova E.V.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2014. V. 40. P. 547–557.
<https://doi.org/10.1134/S1068162014050057>
18. *Nisar J., Iqbal M., Iqbal M., Shah A., Akhter M.S., Uddin S., Khan R., Uddin I., Shah L.A., Khan M.S.* // *Zeitschrift Fur Physikalische Chemie*. 2020. V. 234. P. 117–128.
<https://doi.org/10.1515/zpch-2018-1273>
19. *Bhardwaj V., Bhardwaj T., Sharma K., Gupta A., Chauhan S., Cameotra S.S., Sharma S., Gupta R., Sharma P.* // *RSC Advances*. 2014. V. 4. P. 24935–24943.
<https://doi.org/10.1039/c4ra02177k>
20. *Chamseddin, Jira T.* // *Curr. Pharmaceut. Analysis*. 2013. V. 9. P. 121–129.
<https://doi.org/10.2174/157341213804806160>
21. *Ranjbar B., Gill P.* // *Chem. Biol. Drug Des.* 2009. V. 74. P. 101–120.
<https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2009.00847.x>
22. *Li R., Nagai Y., Nagai M.* // *J. Inorg. Biochem.* 2000. V. 82. P. 93–101.
[https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(00\)00151-3](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(00)00151-3)

Influence of Lipid Matrix Composition on Micro-Environment of Levofloxacin in Liposomal Forms

I. M. Le-Deygen^{*,#}, A. S. Safronova^{*}, I. M. Kolmogorov^{*}, A. A. Skuredina^{*}, and E. V. Kudryashova^{*}

[#]Phone: +7 (999) 800-89-55; e-mail: i.m.deygen@gmail.com

^{*}Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1/3, Moscow, 119991 Russia

We have studied the interaction of antibacterial drug levofloxacin with lipid bilayers of various compositions: 100% DPPC and with the addition of 20% cardiolipin. For DPPC liposomes, levofloxacin is deepened into the subpolar region at the lipid-water interface. The role of anionic lipid in the mechanism of interaction of an active molecule with a bilayer has been established: levofloxacin enters the microenvironment of the phosphate group, displacing water, and does not move deep into the hydrophobic part of the bilayer. For the first time, the study of the microenvironment of levofloxacin in the liposome by IR and CD spectroscopy was carried out. Such an approach based on a combination of several spectral methods opens up new prospects for the creation of new medicinal properties and the possibility of predicting the nature of the interaction of active molecules with biomembranes in order to predict their effectiveness and potential side effects.

Keywords: liposomes, fluoroquinolones, levofloxacin, FTIR spectroscopy, CD spectroscopy



УДК 577.112.6

ВЛИЯНИЕ ЛИПИДНЫХ КОМПОНЕНТОВ НА ИММУНОГЕННОСТЬ СИНТЕТИЧЕСКОГО ФРАГМЕНТА АНТИГЕНА NS4A ВИРУСА ГЕПАТИТА С¹

© 2022 г. А. Н. Белявцев*, **, #, Н. С. Шастина*, В. В. Куприянов**, Л. И. Николаева**,
М. В. Мельникова***, Е. Ф. Колесанова***, М. Ю. Шимчишина*, **, И. В. Капустин****

*ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (Институт тонких химических технологий
им. М.В. Ломоносова), Россия, 119571 Москва, просп. Вернадского, 86

**ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного
академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Россия, 123098 Москва, ул. Гамалеи, 18

***ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»,
Россия, 119121 Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8

****ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии
им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Россия, 125212 Москва, ул. Адмирала Макарова, 10

Поступила в редакцию 04.08.2021 г.

После доработки 19.08.2021 г.

Принята к публикации 12.10.2021 г.

Целью данного исследования было изучение влияния липидных компонентов на иммуногенность синтетического 24-членного пептида, содержащего В- и Th-эпитопы. Амидированный по С-концу синтетический пептид имел первичную структуру VIVGRILSGRPAVIPDREVLRYK, которая соответствует фрагменту антигена NS4A вируса гепатита С. Для усиления иммуногенности было выполнено ацилирование пептида по N-концевой α-аминогруппе путем присоединения липида 1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-О-сукцинат. Также получена липосомальная форма пептида с размером частиц 160 ± 20 нм и степенью включения пептида 80%. Препарат пептида в липосомах обладал стабильностью в течение трех месяцев. Изучена иммуногенность пептида, липопептида и пептида в липосомах по выработке антител В-клетками и цитокинов (IFN-γ и IL-2) специфическими CD4⁺-Т-лимфоцитами у иммунизированных лабораторных мышей. Наибольшей иммуногенностью обладал 24-членный пептид, включенный в фосфатидилхолиновые липосомы, что свидетельствует о перспективности использования данного пептида в дальнейших исследованиях по созданию кандидатной вакцины от гепатита С.

Ключевые слова: синтетический пептид, антиген NS4A вируса гепатита С, пептид в липосомах, липопептид, иммуногенность

DOI: 10.31857/S0132342322030046

ВВЕДЕНИЕ

Вирус гепатита С (ВГС) — этиологический агент гепатита С, который инфицирует гепатоциты и при развитии длительной хронической ин-

фекции может приводить к циррозу или гепатоцеллюлярной карциноме. В последние годы появились средства эффективной терапии гепатита С. Однако пока элиминация данной инфекции — недостижимая задача, т.к. до сих пор не создана профилактическая вакцина. В последние годы ведутся исследования, нацеленные на получение различных вариантов вакцин от гепатита С (рекомбинантных, векторных, субъединичных, пептидных и др.) [1]. Вакцинные препараты на основе синтетических пептидов привлекают разработчиков тем, что имеют минимальное количество побочных эффектов [2, 3].

Для обеспечения эффективности синтетических пептидных вакцин большое значение имеет правильный выбор целевых антигенных детерми-

¹ Дополнительные материалы для этой статьи доступны по doi 10.31857/S0132342322030046 для авторизованных пользователей.

Сокращения: ВГС — вирус гепатита С; НАФ — неполный адъювант Фрейнда; DMAP — 4-диметиламинопиридин; DMSO — диметилсульфоксид; DPBS — фосфатно-солевой буферный раствор Дульбекко; IL-2 — интерлейкин-2; IFN-γ — интерферон-гамма; NS4A — неструктурный полипептид 4А; Pam2Suc — N-[2,3-бис(пальмитоилокси)пропил]сукцинат; Pam2AP-Suc — 1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-О-сукцинат; PBS — фосфатно-солевой буфер; Th — Т-хелперный; TLR — Toll-подобный рецептор (Toll-like receptor).

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 246-05-55, доб. 934; эл. почта: belyavcev@mirea.ru).

нант и адьюванта [2]. Одно из перспективных современных направлений – использование в качестве адьювантов синтетических вакцин липофильных соединений. Показано, что некоторые из них способны взаимодействовать с Toll-подобными рецепторами (TLRs) и усиливать иммунный ответ на синтетические антигенные детерминанты [4].

Исторической основой идеи конъюгирования пептидного антигена с липофильным адьювантом было исследование Т.Р. Норр в начале 1980-х гг. [5]. При разработке синтетической пептидной вакцины против гепатита В он обнаружил, что гуморальный иммунный ответ значительно усиливался после конъюгации пептида, воспроизводящего эпитопы HBs-антигена вируса гепатита В, с N α ,N ϵ -дипальмитоиллизиним. В дальнейшем были обнаружены другие свойства природных липопептидов: митогенная активность трипальмитоилированного пентапептида из бактериальной мембраны *Escherichia coli* [6] и иммунная активность выделенного из мембраны *Mycoplasma fermentans* макрофаг-активирующего липопептида, содержащего липидный компонент S-[2,3-бис(пальмитоилокси)пропил]цистеин (Pam2Cys) [7]. Проявление иммуностимулирующей активности этими липофильными соединениями в составе диацильных и триацильных липопептидных лигандов сигнальных рецепторов связывают с наличием в их структуре патоген-ассоциированных молекулярных паттернов, которые распознаются этими рецепторами. Благодаря наличию подобных липидных фрагментов липопептиды, содержащие антигенные детерминанты, могут проявлять самоадьювантные свойства [8]. Еще одним способом повышения иммуногенности пептидов может служить их включение в липосомы [9, 10].

Ранее нами был синтезирован 24-членный пептид – фрагмент антигена NS4A вируса гепатита С, содержащий консервативный В-клеточный и Т-хелперный эпитопы антигена NS4A ВГС [11, 12], показана иммунореактивность этого пептида с антителами из сывороток больных гепатитом С [13]. Таким образом, данный пептид мог бы служить компонентом вакцины против гепатита С. Однако известно, что пептиды примерно такой длины, даже содержащие и В-, и Т-эпитопы, проявляют достаточно высокую иммуногенность только в присутствии адьювантов [1]. Поэтому целью данного исследования было изучение возможности повышения иммуногенности ранее синтезированного 24-членного пептида путем конъюгации с потенциальным липофильным адьювантом 1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-О-сукцинатом, а также после включения в наноразмерные фосфатидилхолиновые липосомы.

Считается, что защиту от ВГС-инфекции в значительной степени обеспечивает эффективная

продукция интерферона- γ (IFN- γ) и интерлейкина-2 (IL-2) CD4⁺-Т-лимфоцитами (Th1-путь) [14]. Поэтому мы исследовали как продукцию антител, так и секрецию указанных цитокинов Т-лимфоцитами после иммунизации лабораторных мышей различными препаратами на основе 24-членного синтетического пептида.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение конъюгата 24-членного пептида с липофильным адьювантом и липосомальной формы пептида. В качестве липофильного компонента, конъюгируемого с синтетическим пептидом, нами был выбран устойчивый к ферментативному расщеплению амидный аналог диацилглицеролипида – N-[2,3-бис(пальмитоилокси)пропил]сукцината (Pam2Suc) [15, 16]. Ранее было показано, что Pam2Suc обладает иммуностимулирующей активностью в составе липопептидов, реализующейся путем активации дендритных клеток через Toll-подобные рецепторы 2-го типа (TLR-2) [16]. Поэтому были основания полагать, что более стабильный амидный аналог глицеролипида будет обладать по крайней мере не меньшей иммуностимулирующей активностью.

Для разработки потенциального самоадьювантного препарата, представляющего собой конъюгат амидированного по С-концу пептида VIVGRILSGRPAVIPDREVLYRK (содержащего фрагмент последовательности антигена NS4A ВГС субтипа 1b [17]) с липофильным остатком, сначала был получен 1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-О-сукцинат (Pam2AP-Suc), имеющий структурное сходство с уже исследованным липофильным адьювантом Pam2Suc [16]. В структуре пропильного фрагмента Pam2Suc имеется одна аминокислотная группа (в 1-м положении), через которую он связан с сукцинильным остатком, а у пропильного фрагмента Pam2AP-Suc имеются две аминокислотные группы (в 1- и 3-м положениях), через которые он связан с остатками пальмитиновой кислоты. Pam2AP-Suc имеет структурное сходство с липофильными фрагментами лигандов TLR, иммуностимулирующее действие которых при взаимодействии с этими рецепторами уже установлено. Получение Pam2AP-Suc осуществляли ацилированием 1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-ола избытком янтарного ангидрида (4 экв.) в присутствии DMAP (2 экв.) в пиридине. Структура полученного соединения подтверждена методом ¹H-ЯМР-спектроскопии и элементным анализом.

Введение Pam2AP-Suc в структуру липопептида (рис. 1) проводили на смоле Ринка по окончании сборки последовательности 24-членного пептида (2.5 экв. липида на 1 экв. пептида) в смеси растворителей дихлорметан/ДМФА (1 : 1, v/v) при активации карбоксильной группы сочетанием

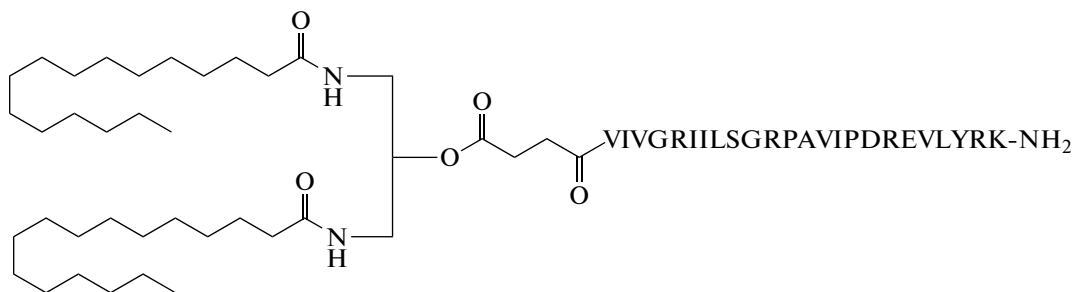


Рис. 1. Структура дипальмитоилированного липопептида Pam2AP-Suc-VIVGRIILSGRPAVIPDREVLRYK-NH₂.

Охума Pure, HBTU и 2,4,6-коллидина с последующим деблокированием функциональных групп липопептида и отщеплением его от твердой фазы действием трифторуксусной кислоты со скэвнджерами.

Липопептид был нерастворим в воде и образовывал устойчивые агрегаты, что существенно затруднило его очистку. Выделение липопептида осуществляли методом офВЭЖХ с УФ-детектированием при длине волны 205 нм, используя в качестве подвижной фазы элюент ацетонитрил/вода (с добавлением 0.1% трифторуксусной кислоты) при линейном градиенте ацетонитрила 5–100% за 20 мин (дополнительные материалы, рис. S1–S3). Молекулярная масса липопептида подтверждена масс-спектрометрическим анализом. Очищенный липопептид (степень чистоты по данным аналитической офВЭЖХ >90%) был липофильно высушен.

Липосомальная форма амидированного по С-концу 24-членного пептида была получена методом пассивной загрузки [18], с экструзией — пропусканием дисперсии мультислойных везикул фосфатидилхолина и пептида в стерильном PBS через поликарбонатный фильтр с размером пор 100 нм. Размер частиц определяли методом светодинамического рассеяния (дополнительные материалы, рис. S4), он составил 160 ± 20 нм при концентрации пептида 1 мг/мл и степени включения ~80%. Степень включения пептида в липосомы определяли методом гель-проникающей хроматографии на сефадексе G-25 с элюцией ФСБ по количеству элюировавшегося свободного пептида. Измерение размеров частиц липосом с включенным пептидом показало их стабильность в течение трех месяцев. В течение этого периода не обнаружено формирования осадка, образующегося при разрушении липосом.

Иммуногенность препаратов на основе 24-членного пептида. Сравнительный анализ иммуногенности полученных препаратов на основе 24-членного пептида проводили на модели лабораторных мышей (сток CD-1). Животных опытных групп ($n = 24$, по 6 на каждое вещество) иммунизировали индивидуальным препаратом в дозе 100 мкг на

мышь: 1) синтетическим пептидом, 2) дипальмитоильным липопептидом, 3) пептидом с неполным адъювантом Фрейнда (НАФ), 4) липосомальной формой пептида (пептид в липосомах). Применяли трехкратную схему иммунизации с интервалом в две недели. Животным контрольной группы ($n = 6$) вводили по той же схеме физиологический раствор. Через 10 дней после последней иммунизации проводили эвтаназию мышей, забор селезенки и крови, определяли гуморальный иммунный ответ и продукцию цитокинов: IFN- γ и IL-2.

Все вводимые препараты вызывали формирование В-клеточного ответа у лабораторных мышей (рис. 2). В течение всего периода наблюдения после иммунизации снижения веса животных и изменения общего состояния не отмечено, что говорит об отсутствии явного токсического эффекта у исследуемых препаратов. В-клеточный ответ был минимальным на свободный 24-членный пептид, в 5.5 раз выше на липопептид, в 12.7 раз выше на пептид с НАФ и в 20 раз выше на пептид в липосомах. Таким образом, максимальный В-клеточный ответ был зафиксирован у мышей, иммунизированных пептидом в липосомах, однако внутри групп имелись индивидуальные колебания в интенсивности иммунного ответа.

Результаты анализа продукции IFN- γ и IL-2 представлены на рис. 3. Максимальный уровень выработки IFN- γ среди исследуемых препаратов был зафиксирован у мышей, иммунизированных 24-членным пептидом в липосомах. Только при использовании этого препарата из группы исследуемых веществ показано достоверное превышение (в 4.6 раза) в выработке IFN- γ относительно контрольной группы животных ($p < 0.01$). Максимальный уровень выработки IL-2 среди исследуемых препаратов был зафиксирован у мышей, иммунизированных пептидом с НАФ (превышение в 2.9 раза относительно контрольной группы), однако отличия от контрольной группы в выработке IL-2 не были статистически достоверными ($p > 0.05$).

Уровень продукции цитокинов Т-лимфоцитами мышей, иммунизированных липопептидом,

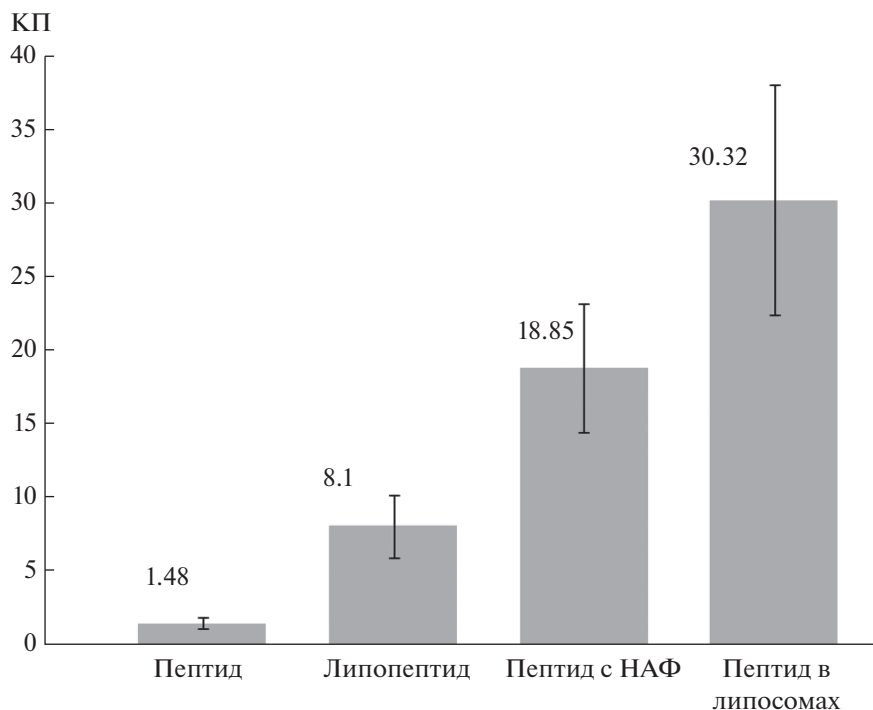


Рис. 2. Результат ИФА сывороток мышей, иммунизированных препаратами: пептид, липопептид, пептид с неполным адъювантом Фрейнда, пептид в липосомах. По оси ординат отмечена шкала единиц КП (коэффициент позитивности). КП – это отношение ОД образца сыворотки крови к пороговому значению ОД.

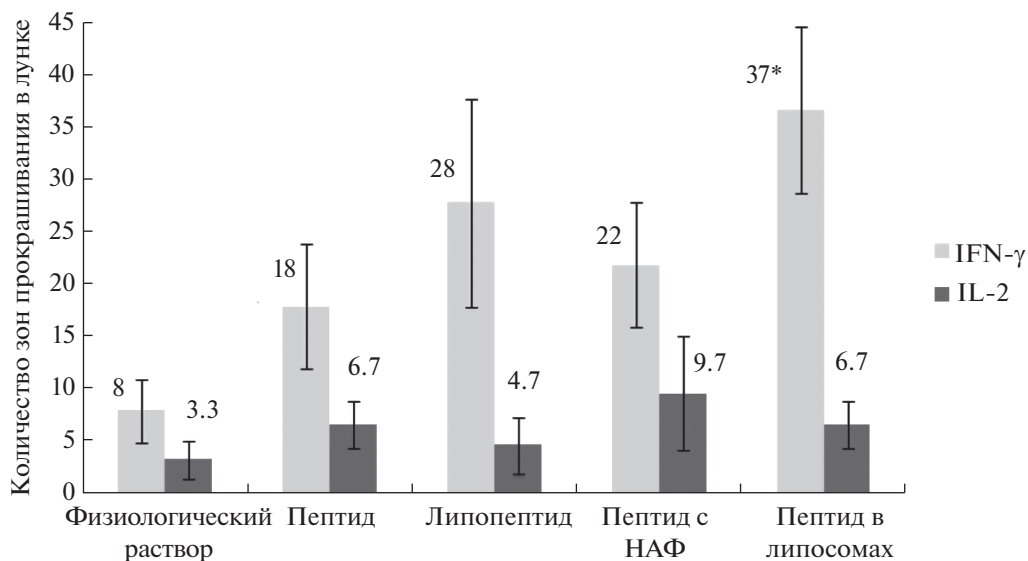


Рис. 3. Результаты анализа продукции IL-2 и IFN-γ Т-клетками иммунизированных мышей и контрольных животных (физиологический раствор). На оси абсцисс отмечены вещества, вводимые животным. * Достоверное отличие от контрольной группы ($p < 0.02$).

показывает, что конъюгация 24-членного пептида с 1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-О-сукцинатом в незначительной степени усиливает иммунный ответ относительно исходного пептида.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование. Спектры ^1H -ЯМР регистрировали на импульсном ЯМР-спектрометре DPX-300 (Bruker, Германия) с рабочей частотой 300 МГц и

записывали в дейтерированных растворителях с тетраметилсиланом в качестве внутреннего стандарта. Спектры в видимой и ультрафиолетовой областях регистрировали на спектрофотометре UV-1601 (Shimadzu, Япония). Размер частиц определяли методом динамического светорассеяния на приборах Delsa Nano C (Beckman Coulter Inc., США) и Zetasizer Nano ZS (Malvern, США). Для регистрации результатов ИФА использовали микропланшетный анализатор (фотометр) Stat-Fax 3200 (Awareness Technology Inc., США). Результаты анализа ELISpot регистрировали с помощью прибора AID ELISpot Reader (Autoimmun Diagnostika GmbH, Германия). Для отдельных стадий ИФА и ELISpot использовали термостатируемый инкубатор-шейкер (Biosan, Латвия). Липосомы получали с помощью миниэкструдера LiposoFast basic Avestin (США).

Реактивы. В работе использовали диметилформамид (о.с.ч.) (Компонент-Реактив, Россия); хлороформ (х.ч.), метанол (х.ч.), диэтиловый эфир (ч.д.а.), хлористый метилен (х.ч.), пиридин (ч.д.а.) (Химмед, Россия). Хлороформ очищали перегонкой над хлористым кальцием, хлористый метилен перегоняли над пентоксидом фосфора, диэтиловый эфир — над гидроксидом калия. DMF очищали молекулярными ситами. В работе использовали следующие реагенты: этиловый эфир циангидроксииминоацетата (Охута Pure), 2,4,6-коллиндин, *O*-(бензотриазол-1-ил)-*N,N,N',N'*-тетраметилуриония гексафторфосфат (HBTU) (Chemper, США); 4-диметиламинопиридин (DMAP), янтарный ангидрид, TFA (Sigma-Aldrich, США); соляную кислоту (Химмед, Россия); уксусную кислоту, триизопропилсилан (TIS), тиоанизол, соевый фосфатидилхолин (Lipoid GmbH, Германия). 1,3-(Дипальмитоиламино)пропан-2-ол был получен в лаборатории ранее по описанной методике [15]. Пептид VIVGRIILSGRPAVIPDREVLRYK-NH₂ был синтезирован ранее на амидной смоле Ринка [13]; часть пептида не удаляли со смолы и не снимали защитные группы с боковых функциональных групп аминокислотных остатков.

Хроматография. Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Sorbfil (Сорбполимер, Россия). Обнаружение пятен на хроматограммах осуществляли в УФ-свете, обработкой 10%-ной H₂SO₄ в метаноле, комплексом [ФМК + Ce₂SO₄], нингидрином с последующим нагреванием до 150°C во всех случаях.

Колоночную хроматографию проводили на Silica gel (0.040–0.063 мм) (Merck, Германия). Очистку липопептида производили методом полупрепаративной оФВЭЖХ на хроматографе Agilent 1100 с использованием диодно-матричного детектора. Применяли колонку Reprosilpur Basic C18 (250 × 4.6 мм I.D., S — 5 мкм), элюент — вода/ацетонитрил с 0.1% TFA при градиенте кон-

центрации ацетонитрила 5–100% за 20 мин, скорость потока 1 мл/мин, t_R = 18.4 мин. Оптическое поглощение элюента при аналитической и препаративной ВЭЖХ измеряли в диапазоне длин волн 205–220 нм.

Синтез 1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-О-сукцината. Раствор 200 мг (0.36 ммоль) 1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-ола, 88 мг (0.72 ммоль) DMAP, 143 мг (1.42 ммоль) янтарного ангидрида в пиридине (15 мл) кипятили в течение 8 ч, добавляли хлороформом (70 мл), затем полученный раствор промывали 0.1 М раствором HCl (1 × 75 мл) до слабокислой реакции, органическую фазу промывали водой (2 × 75 мл), сушили над сульфатом натрия, упаривали, целевое вещество выделяли методом колоночной адсорбционной хроматографии на силикагеле, элюируя системой растворителей хлороформ–метанол (2.5→5% метанола).

Выход 90 мг (37%), R_f 0.43 (хлороформ : метанол, 8.5 : 1.5), $T_{пл}$ 122–124°C (кристаллизация из гексана).

¹H-ЯМР-спектр (DMSO-*d*₆, δ , м.д.): 0.85 (т, 6H, 2CH₃, Pам), 1.21–1.28 (м, 48H, 24CH₂, Pам), 1.44–1.52 (м, 4H, 2 β -CH₂, Pам), 2.02–2.18 (м, 4H, 2 α -CH₂, Pам), 2.38–2.46 (м, 4H, 2CH₂, Suc), 4.07–4.34 (м, 4H, 2CH₂, проп), 4.71–4.93 (м, 1H, CH, проп), 6.47–6.69 (м, 2H, 2NH).

Синтез конъюгата 1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-О-сукцината с амидированным по С-концу 24-членным пептидом (липопептида). К связанному со смолой Ринка защищенному по боковым функциональным группам пептиду VIVGRIILSGRPAVIPDREVLRYK (0.08 ммоль) добавляли предварительно активированный по карбоксильной группе сочетанием Охута Pure, HBTU и 2,4,6-коллиндина 1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-О-сукцинат (0.2 ммоль), перемешивали смесь в течение 16 ч, затем промывали ДМФА и хлористым метиленом. Липопептид отщепляли от смолы Ринка и деблокировали его боковые функциональные группы действием трифторуксусной кислоты с добавлением по 2.5% скэвенджеров — тиоанизола, триизопропилсилана и воды, далее смывали с фильтра из пористого стекла хлористым метиленом, концентрировали на роторном испарителе, осаждали из хлористого метилена диэтиловым эфиром, отделяя осадок центрифугированием, высушивали и выделяли с помощью оФВЭЖХ.

Выход 0.054 г (20%); ESI-MS, m/z : найдено [$M + 3H$]³⁺ 1123.8; [$M + 4H$]⁴⁺ 843.1; [$M + 5H$]⁵⁺ 674.6; вычислено M_r (C₁₆₃H₂₈₈N₄₀O₃₅) 3368.34.

Получение липосомальной формы 24-членного пептида VIVGRIILSGRPAVIPDREVLRYK-NH₂. Раствор 34 мг фосфатидилхолина в хлороформе упаривали на роторном испарителе для получения липидной пленки, добавляли 2 мг 24-членно-

го пептида, растворенного в стерильном PBS (pH 7.4, 1 мг/мл), и встряхивали на вортексе для получения солюбилизованных с пептидом мультламеллярных везикул [19]. Полученные мультламеллярные везикулы пропускали через поликарбонатный фильтр (размер пор 100 нм) ручного экструдера 21 раз для получения однослойных липосом с включенным пептидом. Полученные липосомы пропускали через колонку с сефадексом G25 (эксклюзионную хроматографию проводили на колонке Illustra NAP-5 GE Healthcare Life Science (Великобритания) с сорбентом Sephadex G25 Medium), элюируя PBS, и определяли степень включения пептида в липосомы (по суммарной оптической плотности фракций, соответствующих свободному пептиду, рассчитывали количество и долю не включенного в липосомы пептида). На колонку наносили 0.5 мл раствора липосомальной формы пептида с концентрацией в нем пептида 1 мг/мл, после выхода фракций липосом с включенным пептидом собирали две фракции свободного пептида объемом по 2 мл (спектрофотометрически при 210 нм определена их оптическая плотность: 0.291 и 0.125). Затем по закону Бугера–Ламберта–Бера определяли концентрацию пептида в этих фракциях и рассчитывали эффективность включения (ЭВ) по формуле:

$$\text{ЭВ} = ((0.5 - V_1C_1 - V_2C_2)/0.5) \times 100\%,$$

где V – объем соответствующей фракции, C – концентрация пептида во фракции.

Размер липосом с включенным пептидом определяли методом динамического рассеяния света. Перед иммунизацией пептид в липосомах пропускали через стерилизующий фильтр 200 нм.

Иммунизация животных. Для иммунизации использовали лабораторных мышей-альбиносов (сток CD-1, питомник ФГБУН НИЦБМТ ФМБА России, филиал “Андреевка”, возраст 3 недели, вес 18–20 г, самки, $n = 30$). Животные были разделены на 5 групп по 6 особей. Каждая группа была иммунизирована индивидуальным препаратом: пептидом, липопептидом, пептидом с неполным адъювантом Фрейнда, пептидом в липосомах. Перед иммунизацией липопептид (1 мг) растворяли в 100 мкл 10%-ного DMSO/DPBS (раствор Дульбекко), после чего доводили до 1 мл DPBS. Доза антигенной нагрузки составляла 100 мкг на мышью для всех препаратов. Пятая группа была контрольной – животные получали инъекцию стерильного физиологического раствора (100 мкл). При иммунизации мышей был выполнен легкий наркоз медицинским эфиром. Введение образцов было выполнено подкожно в верхнюю часть спины. Прямые трехкратную схему иммунизации с интервалом в две недели. Для выявления наличия явных признаков токсического эффекта от вводимых соединений осуществляли ежедневный осмотр общего состояния мышей и взвешивание:

после первой инъекции каждые 3 дня, после второй – каждые 7-е сутки. Через 10 дней после последней иммунизации была выполнена эвтаназия мышей, забор селезенки и крови (после цервикальной дислокации и декапитации).

Клетки селезенки мышей культивировали, используя стерильные планшеты (Nunc, Дания), среду RPMI-1640 с аланилглутамином (ПанЭко, Россия) и сыворотку крови эмбриональную телячью (HyClone, США). Для подсчета клеток использовали набор Cell Counting Kit-8 (Sigma-Aldrich, США), для стимуляции клеток – набор PepTivator HCV 1b NS4 (Meltanyi Biotec, Германия).

Иммуноферментный анализ. Пептид, растворенный в 0.05 М карбонатно-бикарбонатном буфере (pH 9.25) в концентрации 0.01 мг/мл, сорбировали в течение 16 ч при температуре 4°C в лунки полистирольного планшета (Nunc, Дания). После блокирования свободных зон лунок в течение 1 ч при 37°C бычьим сывороточным альбумином в PBS (1 мг/мл; Sigma, США) проводили иммуноферментный анализ по методике, описанной в работе [13]. По завершении реакции регистрировали оптическую плотность (OD) в лунках на планшетном спектрофотометре при длине волны 450 нм. Статистически достоверно отличающимися от контроля считали величины OD, превышающие сумму среднего арифметического OD лунок, в которых анализировали образцы от контрольной группы мышей, и тройного стандартного отклонения.

Выделение лимфоцитов из селезенки мышей. Селезенку подопытных мышей гомогенизировали в DPBS (Thermo Fisher Scientific/Gibco, Великобритания) в конической пробирке с пластиковым пестиком. К гомогенату добавляли коллагеназу (100 ед./мл) и 3 мМ CaCl₂, инкубировали 3 ч при 37°C, периодически перемешивая. Клеточную суспензию фильтровали через стерильное сито с размером пор 30 мкм. Эритроциты удаляли с помощью лизирующего раствора следующего состава: 150 мМ хлорид аммония (11.85 г/л), 10 мМ бикарбонат калия, 0.1 мМ ЭДТА, pH 7.2–7.4. Отмывали клетки DPBS с 3-кратным осаждением центрифугированием в течение 5 мин при 300 g. Полученные образцы содержали спленоциты и Т-лимфоциты. После этого клетки подсчитывали в камере Горяева с окрашиванием трипановым синим, суспендировали в среде RPMI 1640 с аланилглутамином и 10% эмбриональной телячьей сыворотки, затем сеяли в 96-луночный планшет для ELISpot в концентрации 1×10^5 – 2.5×10^5 клеток на лунку. Клетки стимулировали пептидом VIVGRIILSGRPAVIPDREVLRYK-NH₂ (10 мкг/мл) и пептидами из набора PepTivator HCV 1b NS4 (10 мкг для стимуляции 1×10^8 клеток). Неспецифическую стимуляцию клеток проводили смесью форбол-12-миристан-13-ацетата

(20 нг/мл; Invitrogen, США) и иономицина (1 мкг/мл; Invitrogen, США).

Методика выполнения ELISpot. Для оценки продукции IFN- γ и IL-2 использовали тест-системы Mouse IL-2 ELISPOT Kit и Mouse Interferon gamma ELISPOT Kit (Abcam, Великобритания). Непосредственно перед экспериментом в стерильных условиях в лунки планшета добавляли клетки и оставляли в CO₂-инкубаторе на 15 ч. Затем неадсорбированные клетки удаляли из планшета и отмывали лунки 4 раза по 100 мкл PBS (pH 7.4) с 0.1% Tween 20 (с инкубацией 10 мин при 4°C после добавления PBS). Далее добавляли по 100 мкл антицитокиновых антител, конъюгированных с авидином, и инкубировали 1.5 ч при комнатной температуре. По завершении инкубации удаляли жидкость из планшета и добавляли по 100 мкл PBS (pH 7.4) с 0.1% Tween 20 (отмывка), повторяли 4 раза по 100 мкл (с интервалом 5 мин). Добавляли по 100 мкл конъюгата стрептавидина с щелочной фосфатазой и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Промывали 4 раза PBS (pH 7.4) с 0.1% Tween 20 по 100 мкл с интервалом 5 мин. Снимали с планшета верхнюю и нижнюю крышки и промывали в струе дистиллированной воды 3 раза. Удаляли избыток воды на фильтровальной бумаге и добавляли субстрат щелочной фосфатазы. Инкубировали 10–15 мин при комнатной температуре до появления пятен без фона. Затем промывали в струе дистиллированной воды 3 раза. Остатки воды удаляли на фильтровальную бумагу, планшет высушивали. Для более полного проявления пятен планшет оставляли в холодильнике при 4°C на ночь. Далее с использованием автоматического считывающего устройства AID ELISpot Reader регистрировали покрашенные зоны цитокинов.

Расчет статистической достоверности различий выполняли с использованием *t*-критерия Стьюдента и χ^2 Пирсона (статистически значимыми считали отличия при $p < 0.02$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При анализе влияния липидного компонента на иммуногенность синтетического 24-членного пептида VIVGRILSGRAVIPDREVLRYK-NH₂, фрагмента антигена NS4A ВГС, содержащего В- и Th-эпитопы, обнаружено значительное усиление иммуногенности при включении пептида в наноразмерные фосфатидилхолиновые липосомы. Липопептид, состоящий из 24-членного пептида и 1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-О-сукцината, был менее иммуногенным, чем немодифицированный пептид с неполным адъювантом Фрейнда.

Формирование высокого уровня иммунной активности после иммунизации 24-членным пептидом в липосомах показывает, что подобный

препарат как компонент кандидатной вакцины от гепатита С перспективен для дальнейших исследований.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Н.И. Журило за получение ЯМР-спектров, В.А. Щелконогову за содействие в получении липосомальной формы пептида и исследовании характеристик пептида в липосомах (работа выполнена при использовании оборудования Центра коллективного пользования РТУ МИРЭА (соглашение № 075-15-2021-689 от 01.09.2021, уникальный идентификационный номер 2296.61321X0010)), И.А. Вострову, И.Е. Соколову, Р.Г. Вахреневу и Е.А. Ручко за анализ реакционной смеси и выделение липопептида методом офВЭЖХ, А.В. Панову и Е.Я. Табор за содействие в приобретении необходимых тест-систем.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-33-90037).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Проведение данного исследования на лабораторных животных было одобрено Комитетом по биомедицинской этике при ФГБУ “НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Колесанова Е.Ф., Соболев Б.Н., Мойса А.А., Егорова Е.А., Арчаков А.И. // Биомед. химия. 2015. Т. 61. С. 254–264.
<https://doi.org/10.18097/PBMC20156102254>
2. Мойса А.А., Колесанова Е.Ф. // Биомед. химия. 2011. Т. 57. С. 14–30.
3. Рыжиков А.Б., Рыжиков Е.А., Богрянцева М.П., Усова С.В., Даниленко Е.Д., Нечаева Е.А., Пьянков О.В., Пьянкова О.Г., Гудымо А.С., Боднев С.А., Онхонова Г.С., Слепцова Е.С., Кузубов В.И., Рынчук Н.Н., Гинько З.И., Петров В.Н., Моисеева А.А., Торжкова П.Ю., Пьянков С.А., Трегубчик Т.В., Антонец Д.В., Гаврилова Е.В., Максюттов Р.А. // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11. № 2. С. 283–296.
<https://doi.org/10.15789/2220-7619-ASB-1699>
4. Schromm A.B., Howe J., Ulmer A.J., Wiesmuller K.H., Seyberth T., Jung G., Rössle M., Koch M.H.J., Gutschmann T., Brandenburg K. // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 11030–11037.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M700287200>

5. Hopp T.P. // *Mol. Immunol.* 1984. V. 21. P. 13–16.
[https://doi.org/10.1016/0161-5890\(84\)90084-1](https://doi.org/10.1016/0161-5890(84)90084-1)
6. Lex A., Wiesmüller K.H., Jung G., Bessler W.G. // *J. Immunol.* 1986. V. 137. P. 2676–2681.
7. Mühlradt P.F., Kieß M., Meyer H., Süßmuth R., Jung G. // *J. Exp. Med.* 1997. V. 185. P. 1951–1958.
<https://doi.org/10.1084/jem.185.11.1951>
8. Moyle P.M., Toth I. // *Curr. Med. Chem.* 2008. V. 15. P. 506–516.
<https://doi.org/10.2174/092986708783503249>
9. Schwendener R.A., Ludewig B., Cerny A., Engler O. // In: *Liposomes. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. V. 605 / Ed. Weissig V. New York: Humana Press, 2010. P. 163–175.
https://doi.org/10.1007/978-1-60327-360-2_11
10. Huang W.-C., Deng B., Lin C., Carter K.A., Geng J., Razi A., He X., Chitgupi U., Federizon J., Sun B., Long C.A., Ortega J., Dutta S., King C.R., Miura K., Lee S.-M., Lovell J.F. // *Nat. Nanotechnol.* 2018. V. 13. P. 1174–1181.
<https://doi.org/10.1038/s41565-018-0271-3>
11. Gerlach J.T., Ulsenheimer A., Grüner N.H., Jung M.-C., Schraut W., Schirren C.-A., Heeg M., Scholz S., Witter K., Zahn R., Vogler A., Zachoval R., Pape G.R., Diepolder H.M. // *J. Virol.* 2005. V. 19. P. 12425–12433.
<https://doi.org/10.1128/JVI.79.19.12425-12433.2005>
12. Pereboeva L.A., Pereboev A.V., Morris G.E. // *J. Med. Virol.* 1998. V. 56. P. 105–111.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9071\(199810\)56:2<105::aid-jmv1>3.0.co;2-c](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9071(199810)56:2<105::aid-jmv1>3.0.co;2-c)
13. Белявцев А.Н., Мельникова М.В., Шастина Н.С., Вахренев Р.Г., Шевченко Н.Г., Сапронов Г.В., Колесанова Е.Ф., Николаева Л.И. // *Биоорг. химия*. 2021. Т. 47. С. 341–347. [Belyavtsev A.N., Melnikova M.V., Shastina N.S., Vachrenov R.G., Shevchenko N.G., Sapronov G.V., Kolesanova E.F., Nikolaeva L.I. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2021. V. 47. P. 713–718.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162021030031>
14. Semmo N., Klenerman P. // *World J. Gastroenterol.* 2007. V. 13. P. 4831–4838.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i36.4831>
15. Mergen F., Lambert D.M., Poupaert J.H., Bidaine A. // *Chem. Phys. Lipids.* 1991. V. 59. P. 267–272.
16. Zeng W., Eriksson E., Chua B.Y., Grollo L., Jackson D. // *Amino Acids.* 2010. V. 39. P. 471–480.
<https://doi.org/10.1007/s00726-009-0463-0>
17. Sarwar M.T., Kausar H., Ijaz B., Ahmad W., Ansar M., Sumrin A., Ashfaq U.A., Asad S., Gull S., Shahid I., Hassan S. // *Viro. J.* 2011. V. 8. P. 317.
<https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-317>
18. Антонова Н.А., Сорокоумова Г.М., Федорова Т.Н., Стволинский С.Л., Абашмов Д.А., Попенко В.И., Швеиц В.И. // *Тонкие химические технологии*. 2016. Т. 11. С. 55–62.
<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2018-13-2-55-62>
19. Щелконогов В.А., Сорокоумова Г.М., Баранова О.А., Чеканов А.В., Ключкова А.В., Казаринов К.Д., Соловьева Э.Ю., Федин А.И., Швеиц В.И. // *Биомед. химия*. 2016. Т. 62. № 5. С. 577–583.
<https://doi.org/10.18097/PBMC20166205577>

Effect of Lipid Components on Immunogenicity of Synthetic Fragment of Hepatitis C Virus NS4A Antigen

A. N. Belyavtsev*, **, #, N. S. Shastina*, V. V. Kupriyanov**, L. I. Nikolaeva**, M. V. Melnikova***, E. F. Kolesanova***, M. Yu. Shimchishina*, **, and I. V. Kapustin****

*Phone: +7 (495) 246-05-55, e-mail: belyavtcev@mirea.ru

*Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University, prosp. Vernadskogo 86, Moscow, 119571 Russia

**Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, ul. Gamaleya 18, Moscow, 123098 Russia

***Institute of Biomedical Chemistry, ul. Pogodinskaya 10, Moscow, 119121 Russia

****Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, ul. Admirala Makarova 10, Moscow, 125212 Russia

The aim of this study was to investigate the effect of lipid components on the immunogenicity of a synthetic 24-peptide containing B- and Th-epitopes. The synthetic amidated at the C-terminus peptide had the primary structure VIVGRIILSGRPAVIPDREVLYRK, that is corresponds to fragment of the NS4A antigen of the hepatitis C virus. To enhance the immunogenicity, the peptide was acylated at the N-terminus with a lipophilic compound 1,3-(dipalmitoylamino)propane-2-O-succinate. A liposomal form of the peptide with a particle size of 160 ± 20 nm and a degree of peptide inclusion of 80% was also obtained. The particle size stability of this preparation has been shown for 3 months. The immunogenicity of peptide, lipopeptide and peptide in liposomes was studied for the production of antibodies by B-cells and cytokines (IFN- γ and IL-2) by specific CD4⁺ T-lymphocytes in laboratory mice. The 24-mer peptide included in phosphatidylcholine liposomes had the highest immunogenicity, that indicates the prospects of using this peptide in further research on the design of a vaccine against hepatitis C.

Keywords: antigen NS4A HCV, synthetic peptide, lipophilic adjuvant, liposome peptide, immunogenicity, lipopeptide



УДК 577.112.6

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЙ ФРАГМЕНТ РЕЦЕПТОРА КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГЛИКИРОВАНИЯ (RAGE) СПОСОБЕН ИНГИБИРОВАТЬ ОЛИГОМЕРИЗАЦИЮ БЕТА-АМИЛОИДА

© 2022 г. Т. Д. Волкова*,[#], А. В. Аветисян**, Д. О. Короев*, А. В. Камынина*, ***, С. М. Баласанянц****, Р. А. Симонян**, О. М. Вольпина*

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

**Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119992 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

***Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), Россия, 141701 Долгопрудный, Институтский пер., 9

****Department of Biological Sciences, University of Illinois at Chicago, 900 South Ashland Avenue, MBRB 4168, Chicago, Illinois, 60607 USA

Поступила в редакцию 18.10.2021 г.

После доработки 09.12.2021 г.

Принята к публикации 11.12.2021 г.

Ранее обнаружено, что синтетический фрагмент (60–76) внеклеточного домена рецептора конечных продуктов гликирования (RAGE) оказывает защитное действие на животных и клеточных моделях болезни Альцгеймера. Было высказано предположение, что этот эффект обусловлен взаимодействием пептида с бета-амилоидом (Аβ), одним из лигандов RAGE, путем ингибирования образования токсичных олигомеров Аβ. Цель настоящего исследования — изучить с помощью методов физической химии способность пептида (60–76) предотвращать олигомеризацию Аβ40 в растворе в сравнении с укороченным пептидом (65–76), не способствующим сохранению памяти мышей. Динамику образования фибрилл Аβ40 в присутствии пептидов оценивали с помощью тиюфлавина Т, относительные размеры олигомеров определяли методом динамического светорассеяния, связывание пептидов с Аβ40 исследовали флуоресцентным титрованием. С помощью двух методов было показано, что пептид (60–76) RAGE способен значительно (более чем на 90%) подавлять образование олигомеров и фибрилл Аβ40, в отличие от пептида (65–76). Кроме того, показано, что протективная активность и способность пептидов ингибировать олигомеризацию Аβ40 не коррелируют с их связыванием с мономерным/тетрамерным Аβ40. Нами получено *in vitro* подтверждение гипотезы о том, что протективная активность синтетического фрагмента (60–76) RAGE связана с его способностью ингибировать олигомеризацию Аβ.

Ключевые слова: рецептор конечных продуктов гликирования, синтетические пептиды, болезнь Альцгеймера, бета-амилоид, олигомеризация, динамическое светорассеяние, тиюфлавин Т

DOI: 10.31857/S0132342322040194

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что процесс олигомеризации и образования фибрилл бета-амилоида (Аβ), происходящий в мозге человека при болезни Альцгеймера (БА), играет решающую роль в развитии нейродегенерации. Фибриллы образуют отложе-

ния вместе с тау-белком [1–5], в то время как растворимые олигомеры, которые не достигли размера фибрилл, связаны с нейротоксичностью Аβ [6–8], что было показано *in vitro* [9–16] и *in vivo* [15]. Отметим, что олигомеризация и образование фибрилл — результаты патологического накопления Аβ в головном мозге. Один из путей транспорта Аβ из кровотока в мозг опосредуется рецептором конечных продуктов гликирования (RAGE) [17]. RAGE локализуется на мембранах эндотелия, а также на мембранах нейронов, астроцитов и микроглии [18–21]. При развитии БА наблюдается сверхэкспрессия этого рецептора, что приводит к

Сокращения: Аβ — бета-амилоид; БА — болезнь Альцгеймера; БЭ-мыши — мыши, подвергнутые операции обонятельной бульэктомии; P1 — пептид (60–76); P2 — укороченный пептид (65–76); RAGE — рецептор конечных продуктов гликирования; ThT — тиюфлавин Т.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (495) 336-57-77; эл. почта: tdvol@mx.ibch.ru).

чрезмерному накоплению А β в головном мозге [18, 20, 22, 23]. А β – один из лигандов RAGE, активирующих патогенные сигнальные каскады в микроглии [24, 25], которые стимулируют общие негативные эффекты, такие как неконтролируемое воспаление, дисфункция митохондрий, окислительный стресс и повреждение нейронов [18, 26, 27]. Таким образом, RAGE способен опосредовать нейротоксический эффект А β , проявляющийся в ускорении развития когнитивных нарушений и патологических изменений в нейронах [28]. RAGE связывает все формы А β : мономерные, олигомерные и фибриллярные; кроме того, с помощью набора антител к RAGE было показано, что различные формы А β , в зависимости от уровня его олигомеризации, связываются с разными участками рецептора. В частности, фибриллы А β связываются с доменом C2, а растворимые олигомеры – с доменом V [29].

Ранее нами было показано, что синтетический фрагмент (60–76) V-домена RAGE при интраназальном введении проявляет терапевтический эффект на животных моделях БА, предотвращая нарушение пространственной памяти у бульбэктомизированных (БЭ) и трансгенных мышей 5xFAD – моделях БА, в которых мыши проявляют поведенческие, биохимические и морфологические признаки заболевания [30, 31]. Введение пептида также предотвращает как накопление А β в головном мозге, так и патологические изменения в нейронах [32]. Способность пептида (60–76) предотвращать токсические эффекты А β в смешанной первичной культуре нейронов и астроцитов также была продемонстрирована ранее [33]. Показана специфическая активация RAGE пептидом (60–76), которая приводит к высвобождению глутамата преимущественно из астроцитов [34]. Косвенные данные, указывающие на возможность взаимодействия пептида с А β , были получены после интраназального введения флуоресцентно меченного аналога мышам 5xFAD. В результате наблюдалась совместная локализация пептида с амилоидными бляшками в срезах мозга [32]. Обнаружена также способность пептида связывать А β в растворе [33, 35]. Принимая во внимание все полученные данные, мы предположи-

ли, что механизм защитной активности пептида может осуществляться через его взаимодействие с А β путем ингибирования образования токсичных олигомеров.

Цель данной работы состояла в изучении двумя физико-химическими методами – динамического светорассеяния (ДСР) и анализа связывания с флуоресцентным красителем тиюфлавином Т – способности синтетического пептида (60–76) RAGE, обладающего защитной активностью, предотвращать олигомеризацию А β в растворе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 приведена последовательность пептида (60–76) (P1) и выбранного для сравнения его укороченного фрагмента (65–76) (P2), который не проявлял активности на животной модели БА [32, 36]. В исследованиях мы использовали А β 40 – одну из двух основных аллоформ А β , присутствующих в амилоидных бляшках [37, 38]. Растворимость А β 40 намного выше, а скорость олигомеризации – ниже, чем у изоформы А β 42, что позволяет работать с водными растворами точной концентрации и дает время для манипуляций на лабораторных приборах [39]. Размер частиц в растворе А β 40 после его агрегации и влияние пептидов P1 и P2 на эту агрегацию изучали с помощью динамического светорассеяния (ДСР). Одновременно с этим способность пептидов ингибировать образование протофибрилл и фибрилл А β 40 в растворе анализировали по изменению флуоресценции тиюфлавина Т. Кроме того, способность пептидов P1 и P2 напрямую связываться с А β 40 изучали с помощью флуоресцентного титрования.

Определение размеров олигомеров А β 40 в растворах методом динамического светорассеяния. Для изучения влияния фрагментов RAGE на олигомеризацию А β 40 использовали метод динамического светорассеяния. Вначале определяли размеры молекул А β 40 в исходных растворах, приготовленных по различным методикам. На рис. 1а показано распределение частиц по размерам в растворе дезагрегированного А β 40, на рис. 1б –

Таблица 1. Результаты ингибирования олигомеризации А β 40 фрагментами RAGE и их способность предотвращать нарушение пространственной памяти бульбэктомизированных мышей в модели болезни Альцгеймера

Обозначение	Фрагмент	Аминокислотная последовательность	Ингибирование олигомеризации А β 40		Связывание с А β 40 (флуоресцентное титрование)	Защита памяти БЭ-мышей [13]
			ДСР	ThT		
P1	60–76	AWKVLSPQGGGPWDSVA	+	+	+	+
P2	65–76	SPQGGGPWDSVA	–	±	+	–

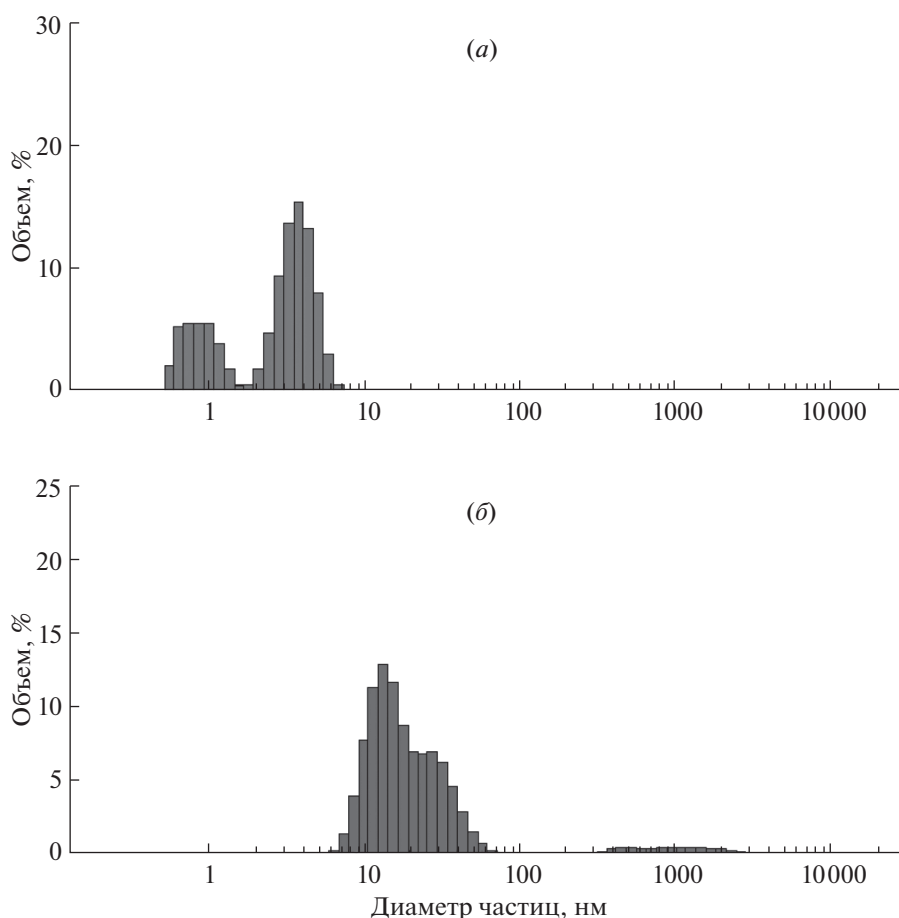


Рис. 1. Распределение размеров олигомеров исходного раствора Аβ40, измеренное методом ДРС: (а) — дезагрегированный Аβ40; (б) — неагрегированный Аβ40.

для Аβ40, растворенного в воде без предварительной дезагрегации.

В растворе дезагрегированного Аβ40 можно видеть два пула частиц (рис. 1а). Первый включает мелкие частицы со средним гидродинамическим диаметром 0.9 нм, что соответствует диаметру мономеров. Второй пул содержит частицы со средним диаметром 3.8 нм, которые представляют собой димеры, тримеры и тетрамеры Аβ40 [40]. В растворе Аβ40, не подвергавшегося дезагрегации, не обнаружено мелких частиц, что означает отсутствие мономеров, димеров, тримеров и тетрамеров. Вместо этого обнаружен пул с широким спектром частиц размером 8–80 нм (рис. 1б), а кроме того, есть немного крупных частиц диаметром 200–2000 нм, которые представляют собой высокоолигомеризованные молекулы. Для всех дальнейших исследований был использован дезагрегированный Аβ40 (рис. 1а).

Далее раствор дезагрегированного Аβ40 с пептидами или без них подвергали агрегации, т.е. инкубировали в условиях, способствующих агрегации, а затем методом динамического светорассе-

яния определяли размер всех молекул Аβ40 в смеси (рис. 2).

Анализ распределения частиц по размерам подтвердил, что олигомеризация Аβ40 прошла. В растворе Аβ40 без пептидов имелся только один пул агрегатов со средним значением гидродинамического диаметра 2500 нм (рис. 2а). После инкубации Аβ40 в присутствии пептида Р1 распределение частиц по размерам в растворе резко изменилось. На рис. 2б можно увидеть два пула мелких частиц, подобных тем, которые представлены на рис. 1а. Это означает, что в смеси осталось большое количество мелких частиц диаметром 1–6 нм. Кроме того, есть два небольших пула более крупных агрегатов со средним диаметром 500 и 1100 нм, которые, тем не менее, намного меньше, чем в случае “чистого” Аβ40. После инкубации Аβ40 в присутствии пептида Р2 распределение частиц в растворе было аналогично тому, которое наблюдалось для Аβ40 без пептида. На графике представлен только один пул очень крупных агрегатов со средним диаметром 1500 нм, что немного ниже, чем в случае чистого Аβ40, но зна-

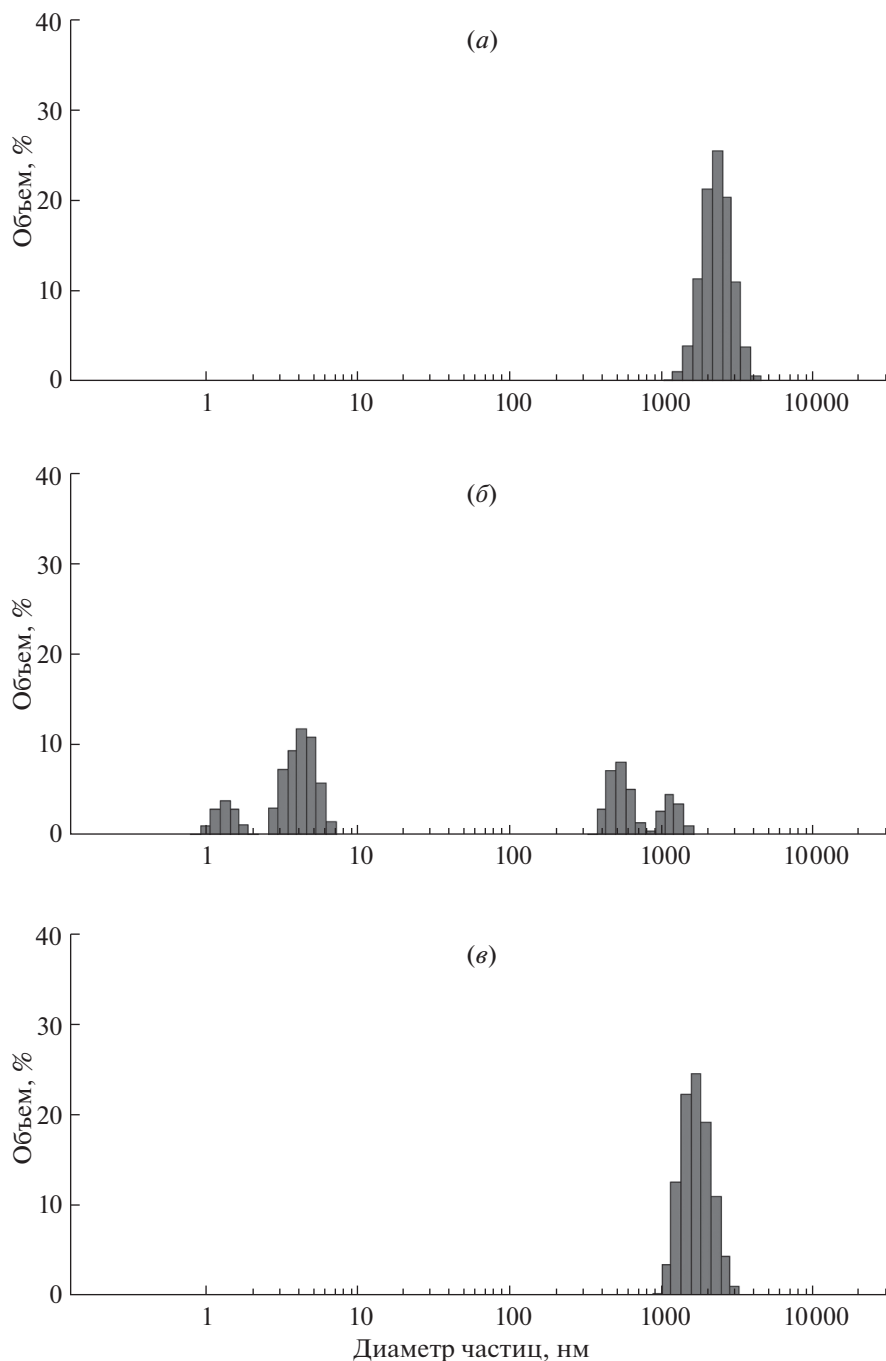


Рис. 2. Распределение размеров олигомеров Аβ40 после 40-часовой инкубации, измеренное методом ДРС: (а) — только Аβ40; (б) — Аβ40 с Р1; (в) — Аβ40 с Р2.

чительно выше, чем в смеси Аβ40 с Р1 (рис. 2в). Мелких частиц в растворе не осталось. Таким образом, методом динамического светорассеяния доказано, что Р1 значительно ингибирует олигомеризацию Аβ40 и предотвращает образование крупных агрегатов, в то время как Р2 практически не может влиять на процесс олигомеризации Аβ40.

Изучение фибриллогенеза Аβ40 в присутствии фрагментов RAGE по изменению флуоресценции тиофлавина Т. Следующей задачей исследования было выяснение способности пептидов RAGE влиять на образование фибрилл Аβ40 — крупных олигомеров вытянутой структуры, входящих в состав амилоидных бляшек в мозге больных БА. Для этого динамику олигомеризации Аβ40 в присутствии двух пептидов изучали методом флуо-

ресцентной спектрофотометрии с использованием красителя тиофлавина Т (ThT), который позволяет детектировать образование β -структуры, специфичной для протофибрилл и фибрилл А β . Перед добавлением буфера А β 40 дезагрегировали так же, как и в других исследованиях, так что содержание олигомеров в начале эксперимента было на самом низком уровне. Ранее мы показали, что синтетический А β 40, используемый в этом эксперименте, способен образовывать характерные β -складчатые фибриллы бета-амилоида в водных растворах [41].

Данные флуоресценции, полученные для А β 40 в присутствии Р1 или Р2, сравнивали с данными для А β 40 в отсутствие пептидов (рис. 3). Экспериментальные данные демонстрируют типичную кривую агрегации амилоида с 10-часовой лаг-фазой, в которой не происходит изменения флуоресценции (фаза нуклеации). За ней следует 6-часовая фаза элонгации, в которой образование амилоидных протофибрилл и фибрилл проявляется увеличением флуоресценции ThT. Явное существование лаг-фазы означает отсутствие амилоидных фибрилл в наших начальных препаратах. Во время фазы элонгации флуоресценция ThT увеличивалась в 15 раз в растворе чистого А β 40. В присутствии Р1 флуоресценция ThT увеличивалась менее чем в 2 раза, следовательно, данный пептид ингибировал процесс образования фибрилл А β 40 более чем на 90%. В присутствии Р2 флуоресценция ThT также была ниже, чем в отсутствие пептидов, но заметно выше, чем в присутствии Р1. Пептид Р2 подавлял образование протофибрилл и фибрилл А β 40 только на 50%.

Влияние пептидов на олигомеризацию А β 40, изученное методом ДРС, показало, что Р1, который обладает защитной активностью на живот-

ных и клеточных моделях БА, значительно ингибирует процесс олигомеризации А β 40 в растворе, в то время как неактивный укороченный фрагмент (65–76) (Р2) практически не оказывает такого действия. Одновременно в исследовании с помощью ThT было показано, что Р1 ингибирует образование фибрилл А β 40 более чем на 90%. Эффект Р2 был намного меньше. Следует отметить, что с помощью флуоресценции ThT можно выявить только β -структуры фибрилл, в отличие от анализа методом ДРС, который позволяет идентифицировать весь спектр олигомеров. Следовательно, только метод ДРС отражает объективное различие в способности Р1 и Р2 ингибировать процесс олигомеризации А β .

Флуоресцентное титрование фрагментов RAGE с помощью А β 40. Для того чтобы найти объяснение различного влияния пептидов Р1 и Р2 на олигомеризацию А β 40, мы решили исследовать прямую способность их связывания с А β . Для этого проводили флуоресцентное титрование обоих пептидов при помощи А β 40. Входящий в состав пептидов триптофан изменяет свою флуоресценцию в момент связывания пептида с лигандом, поэтому его удобно использовать как источник флуоресценции при титровании [42]. Это позволило избежать введения флуоресцентной метки и таким образом сохранить нативные свойства пептидов. Концентрация Р1, который содержит два остатка Trp, составляла 0.5 мкМ, а концентрация Р2, имеющего только один остаток Trp, — 2 мкМ для усиления сигнала. Раствор А β 40, как и в предыдущих экспериментах, предварительно готовили в условиях, минимизирующих содержание олигомеров в растворе. Начальная концентрация А β 40 составляла 200 нМ. Данные экспериментов по флуоресценции были представлены в виде графика отношения $1/\Delta F$ по сравнению с $1/[S]$, где $[S]$ — концентрация А β 40 в кювете, ΔF — разница между измерениями интенсивности в отсутствие А β 40 и в присутствии А β 40 с определенной концентрацией (рис. 4).

Были вычислены константы диссоциации: для Р1 $K_d = 1.41 \pm 0.29$ мкМ (рис. 4а), для Р2 $K_d = 0.51 \pm 0.08$ мкМ (рис. 4б). Результаты флуоресцентного титрования в настоящем исследовании показали, что оба пептида образуют комплексы с А β 40, причем, как следует из рассчитанных K_d , Р2 образует с А β 40 даже более стабильный комплекс, чем Р1. Очевидно, что метод флуоресцентного титрования не может объяснить различную способность пептидов ингибировать олигомеризацию А β . Интересно, что в работе Камунина et al. [33] по результатам флуоресцентного титрования Р2 не связывался с А β 40, тогда как K_d для Р1 была практически идентична значению, полученному в настоящем исследовании. Вероятно, это связано с тем, что А β 40 не подвергался дезагрегации в рабо-

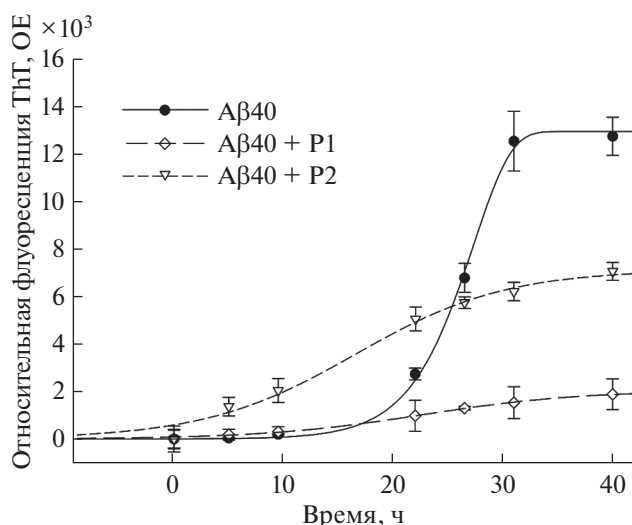


Рис. 3. Кинетика образования фибрилл А β 40.

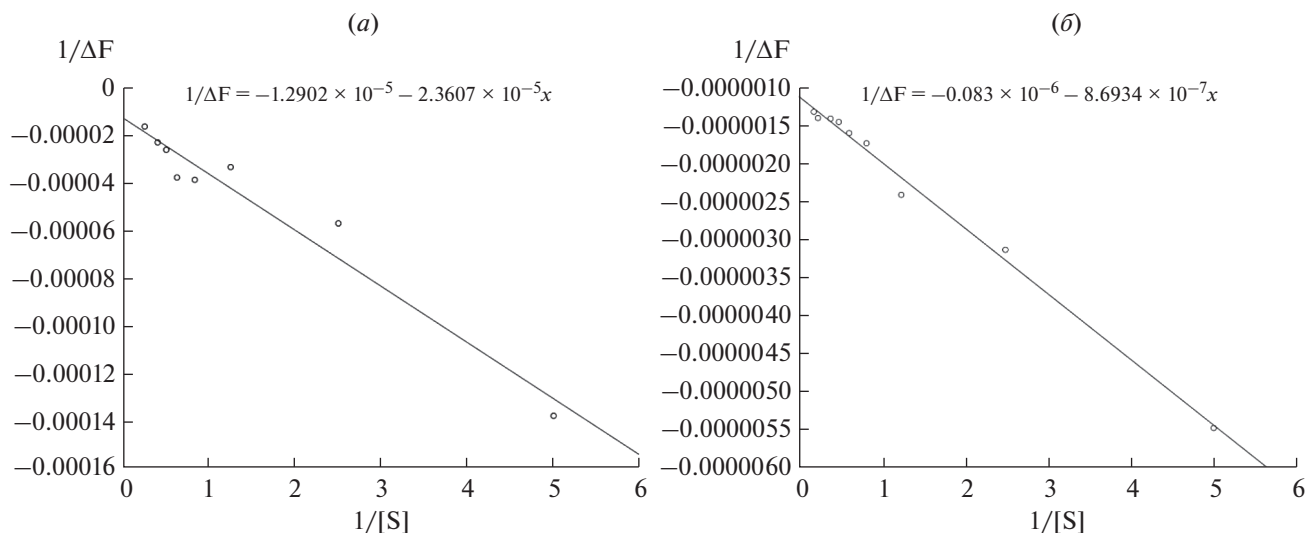


Рис. 4. Флуоресцентное титрование пептидов с помощью Аβ40: (а) — Р1 в концентрации 0.5 мкМ; (б) Р2 в концентрации 2 мкМ. Кривые изменения интенсивности флуоресценции триптофана $1/\Delta F$ в зависимости от концентрации $1/[S]$ Аβ40 при измерении на длине волны 520 нм. Показаны результаты одного из пяти независимых экспериментов.

те Kamynina et al. [33]. Возможно, Р2 образует комплексы только с мономерами-тетрамерами Аβ40, но не может связываться с олигомерами. В то же время Р1 способен связываться с любой формой Аβ40. Эти результаты демонстрируют, что связывания пептида с мономерами-тетрамерами Аβ40 недостаточно для ингибирования образования крупных олигомеров и фибрилл. Вероятно, для подавления олигомеризации требуется также связывание пептида с малыми и средними олигомерами.

Все результаты, полученные в данной работе, объединены в табл. 1.

В последнем столбце табл. 1 представлены ранее полученные данные тестирования пространственной памяти у мышей, подвергнутых обонятельной бульбэктомии (БЭ) после интраназального введения Р1 или Р2 [32]. Из табл. 1 видно, что защитную активность проявляет только Р1, который способен ингибировать процесс олигомеризации Аβ, что показано двумя методами — по изменению флуоресценции ThT и с помощью ДРС. В то же время способность пептидов Р1 и Р2 ингибировать олигомеризацию Аβ не коррелирует с их связыванием с мономерным/тетрамерным Аβ40.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез пептидов. Фрагменты RAGE человека (Q15109, UniProtKB/SwissProt) и Аβ40 человека (P05067.3, UniProtKB/Swiss-Prot) были синтезированы твердофазным методом на полимере Ванга с использованием Fmoc/But-схемы и очищены с помощью ВЭЖХ, как описано ранее [32, 41]. Гомогенность пептидов составляла >95%.

Дезагрегация бета-амилоида (1–40). Лиофилизированный синтетический Аβ40 растворяли в 1,1,1,3,3,3-гексафторпропан-2-оле (HFIP) (99%; Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1 мг/мл и разделяли на аликвоты. HFIP выпаривали в потоке газообразного аргона, пептидную пленку растворяли в DMSO (Sigma-Aldrich, США) до конечной концентрации 20 мг/мл. Этот раствор энергично встряхивали и выдерживали при -20°C в течение 12 ч перед добавлением буфера.

Формирование олигомеров и фибрилл Аβ40. К 250 мкг Аβ40 в 12.5 мкл DMSO добавляли 1850 мкл буфера (20 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl, pH 7.4) и сразу же встряхивали в течение 30 с. Для приготовления смеси Аβ40 и одного из фрагментов RAGE 200 мкг Р1 либо 140 мкг Р2 растворяли в 1850 мкл буфера и добавляли к 250 мкг Аβ40 в DMSO, после чего встряхивали в течение 30 с. Образцы перемешивали при 37°C в течение 40 ч.

Динамическое светорассеяние. Измерения динамического рассеяния света (ДРС) проводили на анализаторе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Великобритания) с использованием лазерного источника с $\lambda = 633$ нм и детекции при угле рассеяния 173° . Образцы получали из дезагрегированного Аβ40 или дезагрегированного Аβ40, инкубированного в условиях образования олигомеров и фибрилл с пептидами или без них. В кювету ДРС переносили 100 мкл полученного раствора на 20 мин. Данные рассеяния света были проанализированы для оценки распределения частиц по размерам и их усредненного по z гидродинамического диаметра (d_h) с применением уравнения Стокса–Эйнштейна, предполагающего сферическую форму частиц.

Анализ фибриллогенеза А β 40 с использованием тиофлавина Т. Образование фибрилл А β 40 отслеживали по связыванию тиофлавина Т [43] с помощью флуоресцентного планшетного ридера Clariostar Plus (BMG LABTECH, Германия). Раствор А β 40 или А β 40 в смеси с одним из пептидов объемом 75 мкл отбирали в указанное время и смешивали с 25 мкл 50 мкМ раствора ThT в лунках планшета из черного полистирола (SPL) для обнаружения флуоресценции тиофлавина Т. Конечная концентрация А β 40 составляла 25 мкМ, пептидов — 50 мкМ, ThT — 12.5 мкМ. Флуоресценцию образцов измеряли при $\lambda_{\text{возб}} = 450$ нм, $\lambda_{\text{исп}} = 486$ нм. В каждый момент времени из каждого раствора отбирали по четыре аликвоты, затем их добавляли в лунки планшета и измеряли флуоресценцию ThT в каждой лунке не менее четырех раз на разной высоте. Вычитали фоновую флуоресценцию буфера. В каждой точке рассчитывали среднее значение и стандартную ошибку среднего (SEM).

Флуоресцентное титрование. Флуоресцентное титрование синтетических пептидов проводили, как описано ранее [33]. Концентрация пептида P1 составляла 0.5 мкМ, пептида P2 — 2 мкМ. К ним добавляли дезагрегированный А β 40, предварительно растворенный в DMSO, в увеличивающихся концентрациях: 200, 400, 800, 1200, 1600, 2000, 2500, 3000, 4000 и 5000 нМ. Максимум интенсивности флуоресценции обнаружен при 355 нм. В программе Statistica 10 (StatSoft, США) набор интенсивностей был представлен на графике с координатами $1/[S]$ относительно $1/\Delta F$ [42]. Для каждого пептида проводили три независимых измерения константы диссоциации (K_d). Значения K_d представляли, как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведенных исследованиях выявлено, что биологически активный синтетический фрагмент (60–76) RAGE оказывает влияние на процесс олигомеризации А β . Методами динамического светорассеяния и анализа флуоресценции тиофлавина Т показано, что пептид (60–76), оказывающий протективное действие на пространственную память мышей в экспериментальных моделях болезни Альцгеймера, значительно подавляет образование олигомеров и фибрилл А β 40. Неактивный укороченный фрагмент (65–76) этого пептида такой способностью не обладает. В то же время ингибирование олигомеризации А β пептидами (60–76) и (65–76) и их защитная активность не коррелируют со связыванием пептидов с мономерным/тетрамерным А β 40.

Таким образом, нами получено подтверждение гипотезы о том, что протективная активность синтетического пептида (60–76) RAGE связана с

его способностью ингибировать образование токсичных олигомеров А β . Выявлен один из возможных механизмов реализации протективного действия пептида (60–76), перспективного для разработки терапии болезни Альцгеймера.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-04-00624).

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. Glenner G.G., Wong C.W. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1984. V. 120. P. 885–890. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(84\)80190-4](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(84)80190-4)
2. Hardy J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 2095–2097. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2095>
3. Hardy J.A., Higgins G.A. // Science. 1992. V. 256. P. 184–185. <https://doi.org/10.1126/science.1566067>
4. Masters C.L., Simms G., Weinman N.A., Multhaup G., McDonald B.L., Beyreuther K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 4245–4249. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.12.4245>
5. Selkoe D.J. // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1994. V. 53. P. 438–447. <https://doi.org/10.1097/00005072-199409000-00003>
6. Gandy S., Simon A.J., Steele J.W., Lublin A.L., Lah J.J., Walker L.C., Levey A.I., Kraft G.A., Levy E., Checler F., Glabe C., Bilker W.B., Abel T., Schmeidler J., Ehrlich M.E. // Ann. Neurol. 2010. V. 68. P. 220–230. <https://doi.org/10.1002/ana.22052>
7. Kaye R., Lasagna-Reeves C.A. // Alzheimer's Disease: Advances for a New Century. 2013. V. 3. P. 67–78. <https://doi.org/10.3233/978-1-61499-154-0-67>
8. Klein W.L., Kraft G.A., Finch C.E. // Trends Neurosci. 2001. V. 24. P. 219–224. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01749-5](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01749-5)
9. Harper J.D., Wong S.S., Lieber C.M., Lansbury P.T. // Chem. Biol. 1997. V. 4. P. 119–125. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(97\)90255-6](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(97)90255-6)
10. Hartley D.M., Walsh D.M., Ye C.P.P., Diehl T., Vasquez S., Vassilev P.M., Teplow D.B., Selkoe D.J. // J. Neurosci. 1999. V. 19. P. 8876–8884. <https://doi.org/10.1523/Jneurosci.19-20-08876.1999>
11. Lambert M.P., Barlow A.K., Chromy B.A., Edwards C., Freed R., Liosatos M., Morgan T.E., Rozovsky I., Trommer B., Viola K.L., Wals P., Zhang C., Finch C.E.,

- Krafft G.A., Klein W.L.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 6448–6453.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6448>
12. *Nilsberth C., Westlind-Danielsson A., Eckman C.B., Condron M.M., Axelman K., Forsell C., Stenlund C., Luthman J., Teplow D.B., Younkin S.G., Naslund J., Lannfelt L.* // Nat. Neurosci. 2001. V. 4. P. 887–893.
<https://doi.org/10.1038/Nn0901-887>
13. *Oda T., Wals P., Osterburg H.H., Johnson S.A., Pasinetti G.M., Morgan T.E., Rozovsky I., Stine W.B., Snyder S.W., Holzman T.F., Krafft G.A., Finch C.E.* // Exp. Neurol. 1995. V. 136. P. 22–31.
<https://doi.org/10.1006/exnr.1995.1080>
14. *Walsh D.M., Hartley D.M., Kusumoto Y., Fezoui Y., Condron M.M., Lomakin A., Benedek G.B., Selkoe D.J., Teplow D.B.* // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 25945–25952.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.36.25945>
15. *Walsh D.M., Klyubin I., Fadeeva J.V., Cullen W.K., Anwyl R., Wolfe M.S., Rowan M.J., Selkoe D.J.* // Nature. 2002. V. 416. P. 535–539.
<https://doi.org/10.1038/416535a>
16. *Walsh D.M., Lomakin A., Benedek G.B., Condron M.M., Teplow D.B.* // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 22364–22372.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.35.22364>
17. *Banks W.A.* // Immunotherapy. 2010. V. 2. P. 1–3.
<https://doi.org/10.2217/Imt.09.72>
18. *Lue L.F., Walker D.G., Brachova L., Beach T.G., Rogers J., Schmidt A.M., Stern D.M., Du Yan S.* // Exp. Neurol. 2001. V. 171. P. 29–45.
<https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7732>
19. *Miller M.C., Tavares R., Johanson C.E., Hovanesian V., Donahue J.E., Gonzalez L., Silverberg G.D., Stopa E.G.* // Brain Res. 2008. V. 1230. P. 273–280.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.06.124>
20. *Yan S.D., Chen X., Fu J., Chen M., Zhu H.J., Roher A., Slattery T., Zhao L., Nagashima M., Morser J., Migheli A., Nawroth P., Stern D., Schmidt A.M.* // Nature. 1996. V. 382. P. 685–691.
<https://doi.org/10.1038/382685a0>
21. *Yan S.D., Zhu H.J., Fu J., Yan S.F., Roher A., Tourtelotte W.W., Rajavashisth T., Chen X., Godman G.C., Stern D., Schmidt A.M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 5296–5301.
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.10.5296>
22. *Leclerc E., Fritz G., Vetter S.W., Heizmann C.W.* // Biochim. Biophys. Acta. 2009. V. 1793. P. 993–1007.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.11.016>
23. *Walker D., Lue L.F., Paul G., Patel A., Sabbagh M.N.* // Expert Opin. Investig. Drugs. 2015. V. 24. P. 393–399.
<https://doi.org/10.1517/13543784.2015.1001490>
24. *Cai Z.Y., Liu N.N., Wang C.L., Qin B.Y., Zhou Y.J., Xiao M., Chang L.Y., Yan L.J., Zhao B.* // Cell. Mol. Neurobiol. 2016. V. 36. P. 483–495.
<https://doi.org/10.1007/s10571-015-0233-3>
25. *Pugazhenth S., Qin L.M., Reddy P.H.* // Biochim. Biophys. Acta. 2017. V. 1863. P. 1037–1045.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.04.017>
26. *Fang F., Lue L.F., Yan S.Q., Xu H.W., Luddy J.S., Chen D., Walker D.G., Stern D.M., Yan S.F., Schmidt A.M., Chen J.X., Yan S.S.* // FASEB J. 2010. V. 24. P. 1043–1055.
<https://doi.org/10.1096/fj.09-139634>
27. *Mao Y.X., Cai W.J., Sun X.Y., Dai P.P., Li X.M., Wang Q., Huang X.L., He B., Wang P.P., Wu G., Ma J.F., Huang S.B.* // Cell Death Dis. 2018. V. 9. P. 674.
<https://doi.org/10.1038/S41419-018-0718-3>
28. *Deane R., Singh I., Sagare A.P., Bell R.D., Ross N.T., LaRue B., Love R., Perry S., Paquette N., Deane R.J., Thiagarajan M., Zarcone T., Fritz G., Friedman A.E., Miller B.L., Zlokovic B.V.* // J. Clin. Invest. 2012. V. 122. P. 1377–1392.
<https://doi.org/10.1172/JCI58642>
29. *Sturchler E., Galichet A., Weibel M., Leclerc E., Heizmann C.W.* // J. Neurosci. 2008. V. 28. P. 5149–5158.
<https://doi.org/10.1523/Jneurosci.4878-07.2008>
30. *Koroeev D.O., Volpina O.M., Volkova T.D., Kamynina A.V., Samokhin A.N., Filatova M.P., Bobkova N.V.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 361–365.
<https://doi.org/10.1134/S1068162019050054>
31. *Volpina O.M., Koroeev D.O., Volkova T.D., Kamynina A.V., Filatova M.P., Zaporozhskaya Y.V., Samokhin A.N., Aleksandrova I.Y., Bobkova N.V.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2015. V. 41. P. 638–644.
<https://doi.org/10.1134/s1068162015060187>
32. *Volpina O.M., Samokhin A.N., Koroeev D.O., Nesterova I.V., Volkova T.D., Medvinskaya N.I., Nekrasov P.V., Tarnikova O.G., Kamynina A.V., Balasanyants S.M., Voronina T.A., Kulikov A.M., Bobkova N.V.* // J. Alzheimers Dis. 2018. V. 61. P. 1061–1076.
<https://doi.org/10.3233/jad-170483>
33. *Kamynina A.V., Esteras N., Koroeev D.O., Bobkova N.V., Balasanyants S.M., Simonyan R.A., Avetisyan A.V., Abramov A.Y., Volpina O.M.* // Front. Neurosci. 2018. V. 12. P. 681.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00681>
34. *Kamynina A., Esteras N., Koroeev D.O., Angelova P.R., Volpina O.M., Abramov A.Y.* // J. Cell. Physiol. 2021. V. 236. P. 6496–6506.
<https://doi.org/10.1002/jcp.30324>
35. *Avetisyan A., Balasanyants S., Simonyan R., Koroeev D., Kamynina A., Zinovkin R., Bobkova N., Volpina O.* // Neurochem. Int. 2020. V. 140. P. 104799.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104799>
36. *Koroeev D.O., Volpina O.M., Volkova T.D., Kamynina A.V., Filatova M.P., Balasanyants S.M., Samokhin A.N., Bobkova N.V.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2017. V. 43. P. 150–154.
<https://doi.org/10.1134/s1068162017020066>
37. *Gravina S.A., Ho L.B., Eckman C.B., Long K.E., Otvos L., Younkin L.H., Suzuki N., Younkin S.G.* // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 7013–7016.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.13.7013>
38. *Iwatsubo T., Odaka A., Suzuki N., Mizusawa H., Nukina N., Ihara Y.* // Neuron. 1994. V. 13. P. 45–53.
[https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90458-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90458-8)
39. *Olivero G., Grilli M., Chen J.Y., Preda S., Mura E., Govoni S., Marchi M.* // Front. Aging Neurosci. 2014. V. 6. P. 166.
<https://doi.org/10.3389/Fnagi.2014.00166>
40. *Bitan G., Kirkitadze M.D., Lomakin A., Vollers S.S., Benedek G.B., Teplow D.B.* // Proc. Natl. Acad. Sci.

- USA. 2003. V. 100. P. 330–335.
<https://doi.org/10.1073/pnas.222681699>
41. Volkova T.D., Korojev D.O., Kamynina A.V., Filatova M.P., Avetisyan A.V., Volpina O.M. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 217–222.
<https://doi.org/10.1134/s1068162020020181>
42. Huang Y.K., Chou R.H., Yu C. // J. Biol. Chem. 2016. V. 291. P. 14300–14310.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M116.722215>
43. Levine H. // Protein Sci. 1993. V. 2. P. 404–410.
<https://doi.org/10.1002/pro.5560020312>

Protective Fragment of the Receptor for Advanced Glycation End Products Is Able to Inhibit Amyloid Beta Oligomerization

T. D. Volkova^{*, #}, A. V. Avetisyan^{**}, D. O. Korojev^{*}, A. V. Kamynina^{*, ***}, S. M. Balasanyants^{****}, R. A. Simonyan^{**}, and O. M. Volpina^{*}

[#]Phone: +7 (495) 336-57-77; e-mail: tdvol@mx.ibch.ru

^{*}Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^{**}Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology MSU, ul. Leninskie Gory 1/40, Moscow, 119991 Russia

^{***}Research Center for Molecular Mechanisms of Aging and Age Related Diseases, Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, 141701 Russia

^{****}Department of Biological Sciences, University of Illinois at Chicago, 900 South Ashland Avenue, MBRB 4168, Chicago, Illinois, 60607 USA

It was found earlier that a synthetic fragment (60–76) of the extracellular domain of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) has a protective effect in animal and cellular models of Alzheimer's disease. It has been suggested this effect is due to the interaction of the peptide with amyloid beta ($A\beta$), one of the RAGE ligands, by inhibiting the formation of toxic $A\beta$ oligomers. The aim of this study was to investigate, using physical chemistry methods, the ability of the (60–76) peptide to prevent $A\beta$ 40 oligomerization in solution in comparison with a non-protective truncated peptide (65–76). The dynamics of the $A\beta$ 40 fibril formation in the presence of peptides was evaluated using thioflavin-T, the relative sizes of oligomers were determined by dynamic light scattering, the binding of peptides to $A\beta$ 40 was investigated by fluorescence titration. Using two methods, it has been shown that the protective peptide of the (60–76) RAGE sequence is able to significantly (by more than 90%) suppress the formation of $A\beta$ 40 oligomers and fibrils, in contrast to the non-protective peptide (65–76). In addition, the ability of peptides to inhibit $A\beta$ 40 oligomerization and their protective activity do not correlate with their binding to monomeric/tetrameric $A\beta$ 40. Thus, we obtained *in vitro* confirmation of the hypothesis that the protective activity of the (60–76) RAGE synthetic fragment is related to its ability to inhibit $A\beta$ oligomerization.

Keywords: receptor for advanced glycation end products, synthetic peptides, Alzheimer's disease, amyloid beta, oligomerization



УДК 577.121.2:597.552.5

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ И ПРОТЕОЛИЗ БЕЛКОВ ПЕЧЕНИ САДКОВОЙ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СРЕДОВЫХ ФАКТОРОВ

© 2022 г. Н. П. Канцерова*, #, Е. Д. Тушина*, И. В. Суховская*, Л. А. Лысенко*

*Институт биологии — обособленное подразделение ФГБУН ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Россия, 185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

Поступила в редакцию 05.08.2021 г.

После доработки 07.09.2021 г.

Принята к публикации 18.09.2021 г.

В эксперименте показана динамика взаимосвязанных показателей — уровня окислительной модификации (карбонилирования) тканевых белков и активности протеиназ, осуществляющих контроль качества и утилизацию поврежденных, в том числе окисленных, белков (протеасом) — в печени культивируемой радужной форели (*Oncorhynchus mykiss* Walb.), как в периоды, благоприятствующие росту рыб, так и при воздействии естественных неблагоприятных факторов. Оба показателя демонстрировали корреляцию с темпом роста рыб, отражающим уровень общего метаболизма и окислительных процессов: содержание белковых карбониллов — положительную ($r = 0.42, p < 0.01$), а активность протеасом — отрицательную ($r = -0.46, p < 0.01$). При действии повреждающих факторов физиологическая динамика образования и утилизации белковых карбониллов нарушалась. Так, кратковременная гипоксия, вызванная падением уровня растворенного в воде кислорода, и метаболическая депрессия по окончании подледного периода приводили к уменьшению окислительного повреждения белков печени рыб, а инфекционные патогены, напротив, — к накоплению окисленных белков, менее выраженному при введении в рацион растительной добавки с антиоксидантной активностью. Активность протеасом, играющих ведущую роль в поддержании протеостаза клетки в условиях окислительного стресса, в рассматриваемых нами ситуациях повышалась лишь при воздействии множественных стрессоров — гипоксии с последовавшим инфицированием рыб. Экспериментальный рацион, содержащий натуральные биоактивные вещества, не изменял физиологическую динамику окисления белков и скорости их утилизации у рыб, растущих в оптимальных условиях, но способствовал сохранению баланса в этой системе и, в целом, повышению устойчивости рыб к действию повреждающих факторов.

Ключевые слова: белковые карбонилы, протеасомы, радужная форель, гипоксия, температура среды, бактериальная инфекция

DOI: 10.31857/S0132342322030083

ВВЕДЕНИЕ

Окислительные процессы лежат в основе энергообмена клетки и служат источником свободных радикалов — активных форм кислорода (АФК), азота и др., которые участвуют в физиологических процессах, но, образуясь в избытке, способны повреждать клеточные компоненты — органеллы, мембраны и макромолекулы. Свободно-радикальные процессы усиливаются при старении, действии прооксидантов и неблагоприятных средо-

вых факторов [1–3] и, в случае их преобладания над эффективностью антиоксидантной системы (АОС), приводят к оксидативному стрессу и накоплению поврежденных макромолекул, в том числе продуктов окислительной модификации белков (ОМБ) [4]. По современным представлениям, АОС включает не только классические ферменты (каталазу, SOD, GPx, GST и др.) и молекулярные антиоксиданты (глутатион, ретинол, токоферолы), но и ряд транскрипционных факторов (например, Nrf2) и протеиназы контроля качества белков [5]. Контроль качества клеточных белков (в том числе элиминация окисленных (карбонилированных), аминокислотные остатки в которых необратимо модифицированы альдегидными или кетонowymi группами, и в силу этого утративших нативную структуру и биологическую функцию [6])

Сокращения: АГ — арабиногалактан; АОС — антиоксидантная система; АФК — активные формы кислорода; ДГК — дигидрокверцетин; МДА — малоновый диальдегид; ОМБ — окислительная модификация белков; ПОЛ — перекисное окисление липидов; 2,4-ДНФГ — 2,4-динитрофенилгидразин.

Автор для связи: (тел.: +7 (8142) 76-98-10; эл. почта: nkantserova@yandex.ru).

осуществляется путем их протеолитической деградации в аутофаголизосомах [7] и протеасомах [5]. В печени рыб преобладает протеасомный путь гидролиза окисленных белков, включающий энергозависимые этапы их распознавания протеиназами и, в ряде случаев, селективного мечения убиквитином [8]. Убиквитин-протеасомная система (УПС) включает 20S и 26S протеасомные комплексы, в полости которых расщепляются мономерные неубиквитинированные или меченные убиквитином полипептиды [9]; недостаточность протеасомной активности приводит к накоплению дефектных белков.

Помимо физиологической зависимости окислительных процессов в организме рыб от темпа их роста и эффективности АОС, снижающихся с возрастом, уровень белкового окисления у искусственно выращиваемой рыбы зависит от действия множественных стрессоров. Так, в условиях садкового рыбоводства радужная форель *Oncorhynchus mykiss* Walb. подвержена воздействию слабой проточности воды, высокой плотности посадки, летнего подъема температуры воды и ассоциированного с ними кислородного голодания [10, 11]. Стрессоры приводят к снижению темпов роста рыбы, распространению бактериальных инфекций, повышению летальности [12–14]. В современной аквакультуре отдается приоритет стимуляции естественной резистентности выращиваемых видов к повреждающим факторам и сопутствующему окислительному стрессу путем использования натуральных антиоксидантов. Показано, что экстракты гвоздики *Eugenia caryophyllus* и корицы *Cinnamomum zeylanicum*, богатые фенольными соединениями с антиоксидантной активностью, снижают степень перекисного окисления липидов (ПОЛ) в скелетных мышцах нильской тилпии *Oreochromis niloticus* [15]. При введении в состав корма солодки *Glycyrrhiza glabra* и астрагала *Astragalus membranaceus* усиливается ответная реакция АОС печени желтого окуня *Perca flavescens* на кратковременные гипер-, гипотермию и гипоксию [16]. Стимулирующий потенциал веществ из лиственничного сырья – дигидрокверцетина (ДГК), флавоноида с доказанной антиоксидантной, противовоспалительной и противовирусной активностью [17, 18], и арабиногалактана (АГ), полисахарида с пребиотическим и иммуномодулирующим действием, – успешно применяется в медицине и ветеринарии [18, 19], но недостаточно изучен в аквакультуре [20–22]. Преимущество использования подобных соединений заключается прежде всего в их безопасности для живых организмов и окружающей среды.

Цель настоящей работы – изучение уровня карбонилированных белков и протеолитической активности протеасом в печени садковой радужной форели, выращенной на стандартном или обогащенном ДГК и АГ корме, при воздействии

сезонных изменений средовых факторов, включая повреждающие (летнюю гипертермию, кислородное голодание и бактериальные патогены).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведено сравнение биохимических и физиологических показателей у двух групп радужной форели, получавших в течение двух выростных сезонов стандартный коммерческий корм (BioMag, Дания) без добавок (контрольные садки) или с добавкой, включавшей 25 мг ДГК и 50 мг АГ на 1 кг корма (опытные садки). В этот период на выращиваемую в садках форель действовали следующие неблагоприятные факторы: бактериальная инфекция, сезонное повышение температуры воды, гипоксия.

Рост и выживаемость форели. Статистически достоверные различия по темпу роста форели, выращиваемой в течение двух выростных сезонов на стандартном (контроль) и обогащенном смесью ДГК и АГ (опыт) корме, обнаружены не были (табл. 1). Тем не менее можно говорить о тенденции к более высокой скорости роста рыб, выращенных на экспериментальном рационе, поскольку к концу эксперимента средняя масса рыб контрольной группы составила 1947.3 ± 314.7 г, опытной – 2289.3 ± 120.3 г. Несмотря на ранее описанное активирующее влияние смеси ДГК и АГ на механизмы роста мышечной ткани радужной форели (снижение отрицательной регуляции миогенеза миостатином, повышение уровня экспрессии гена тяжелой цепи миозина) при кратковременном действии неблагоприятных факторов

Таблица 1. Относительный темп роста радужной форели, выращиваемой на стандартной диете (контроль) и с добавлением смеси ДГК + АГ (опыт)

Год	Дата	Относительный темп роста, % массы/сутки	
		контроль	опыт
2017	14.07	2.2 ± 1.2	1.7 ± 0.8
	26.07	2.7 ± 0.4	2.7 ± 0.9
	12.08	2.8 ± 1.4	3.7 ± 0.9
	28.08	3.5 ± 1.6	4.3 ± 1.0
	12.09	4.3 ± 1.4	5.3 ± 0.6
	16.11	4.4 ± 0.9	4.2 ± 0.7
2018	12.05	2.2 ± 0.9	2.2 ± 0.6
	27.06	2.7 ± 1.2	3.4 ± 0.9
	17.07	3.5 ± 1.5	3.7 ± 1.3
	24.08	3.9 ± 1.3	4.8 ± 1.6
	18.09	4.1 ± 1.5	4.9 ± 0.7

Примечание: данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения ($n = 60$).

[21], добавка, по-видимому, не обладает способностью к стимуляции роста рыб в долгосрочной перспективе.

Летальность среди рыб контрольной и опытной групп была сходной в начале периода наблюдений (июнь 2017 г.) — 0.96 против 0.95% и достоверно различалась ($p < 0.05$, значения в контроле и опыте соответственно) на пике инфекционного заболевания (середина июля — начало августа 2017 г.) — 2.18 против 0.67%, в период низких температур (подледный период декабрь 2017 г. — апрель 2018 г.) — 3.15 против 0.19%, в период высоких температур (конец июля — начало августа 2018 г.) — 1.15% против 0.82%. Полученные результаты согласуются с отмеченной ранее способностью растительных добавок повышать выживаемость культивируемых видов рыб, например, нильской тиляпии — на 11% при введении в состав корма экстракта прополиса и алое [23], морского окуня *Dicentrarchus labrax*, инфицированного *Photobacterium damsela*, при скармливании 5% экстракта морских водорослей *Gracilaria* sp. [24].

Окислительная модификация белков печени форели. Окислительная модификация белков печени садковой форели, оцениваемая по концентрации карбонилированных групп в их составе, варьировала в ходе наблюдения вслед за изменением внешних факторов и различалась в ряде случаев у рыб контрольной и опытной групп. Относительно низкое содержание белковых карбониллов в печени форели, выловленной по окончании подледного периода (май 2018 г.; рис. 1), по всей видимости, связано со сниженным уровнем общего метаболизма, включая окислительные процессы, у рыб в ходе зимовки. Описанная реакция была в равной степени выражена у рыб, выращенных на контрольном или обогащенном ДГК и АГ рационе (1.4 ± 0.3 против 1.3 ± 0.3 нмоль/мг белка). Содержание белковых карбониллов, аналогично скорости весового прироста, повышалось в соответствии с сезонным ростом температуры воды (в пределах температурного оптимума *O. mykiss* 14–19°C) у рыб, обитающих в благоприятных для роста условиях и в отсутствие повреждающих факторов (рис. 1). Сезонное накопление окисленных белков в печени форели, коррелирующее с весовым приростом рыб ($r = 0.42$, $p < 0.01$) и достигающее максимума к концу выростного сезона, особенно ярко проявилось в 2018 г. Положительная сезонная динамика ОМБ нарушалась при действии некоторых средовых факторов. Так, при кратковременной гипоксии, вызванной резким падением растворенного в воде кислорода до 5.0 мг/л (при оптимуме >7.0 мг/л для форели) 11–19 июля 2017 г., в печени исследуемых рыб наблюдалось двукратное снижение уровня белковых карбониллов — с 4.2 ± 0.5 до 1.9 ± 0.3 нмоль/мг белка ($p < 0.05$; рис. 1). Это согласуется с имеющимися данными

о том, что гипоксия и аноксия приводят к снижению продукции АФК [25], карбонилированных белков и продуктов ПОЛ в органах и клетках (включая иммунные) рыб, а возвращение к нормоксии — к постепенному восстановлению их уровня [26, 27]. Гипоксия нередко (как и в нашем эксперименте) провоцирует бактериальное заражение рыб; предполагают [27], что повышению восприимчивости рыб к инфекциям способствует вызванная гипоксией дисфункция иммунных клеток крови, цитотоксическое действие которых зависит от АФК. Последовавшее за кислородным голоданием спонтанное инфицирование форели бактериальными патогенами (вторая половина июля 2017 г.) и, возможно, антибиотикотерапия энрофлоксацином (начало августа) вызвали двукратное повышение уровня белковых карбониллов, сохранившееся в контрольной группе рыб до конца выростного сезона 2017 г., в опытной — с частичной отменой эффекта (рис. 1). Бактериальные инфекции, по данным многих исследователей [24, 28], приводят к развитию окислительного стресса и, как следствие, к увеличению содержания белковых карбониллов и продуктов ПОЛ у рыб, а натуральные антиоксиданты способны замедлить окисление белков и липидов в этих условиях [24, 29].

Положительная сезонная динамика ОМБ также нарушалась в период повышения температуры воды сверх оптимальных для форели значений (август 2018 г.; рис. 1), критичного для жизнестойкости особей в целом. Сочетанное действие гипертермии и вызванного ею снижения уровня растворенного кислорода (показатели связаны обратной зависимостью) до нижней границы оптимума *O. mykiss* привело к умеренному снижению ОМБ и, вероятно, других кислород-зависимых процессов (энергопродукции, иммунных реакций цитотоксичности) в тканях рыб. При этом ведущим действующим на рыб фактором, по всей видимости, стала именно умеренная гипоксия, поскольку изолированное влияние гипертермии, по данным литературы, оказывает противоположный биологический эффект — разобщение дыхательной цепи митохондрий, утечку протонов, неполное восстановление кислорода и увеличение продукции АФК [30, 31].

Достоверная разница по содержанию карбонильных производных белков в печени форели контрольной и опытной групп наблюдалась в конце каждого выростного сезона; их содержание было ниже у рыб, получавших с кормом ДГК и АГ, чем у рыб контрольной группы ($p < 0.05$): в 2017 г. — 2.5 ± 0.5 против 4.1 ± 0.6 , в 2018 — 3.5 ± 0.6 против 6.5 ± 1.2 нмоль/мг белка (рис. 1). Полученные результаты, свидетельствующие о способности добавки снижать степень окисления клеточных белков в период нормального роста и при действии повреждающих факторов, согласу-

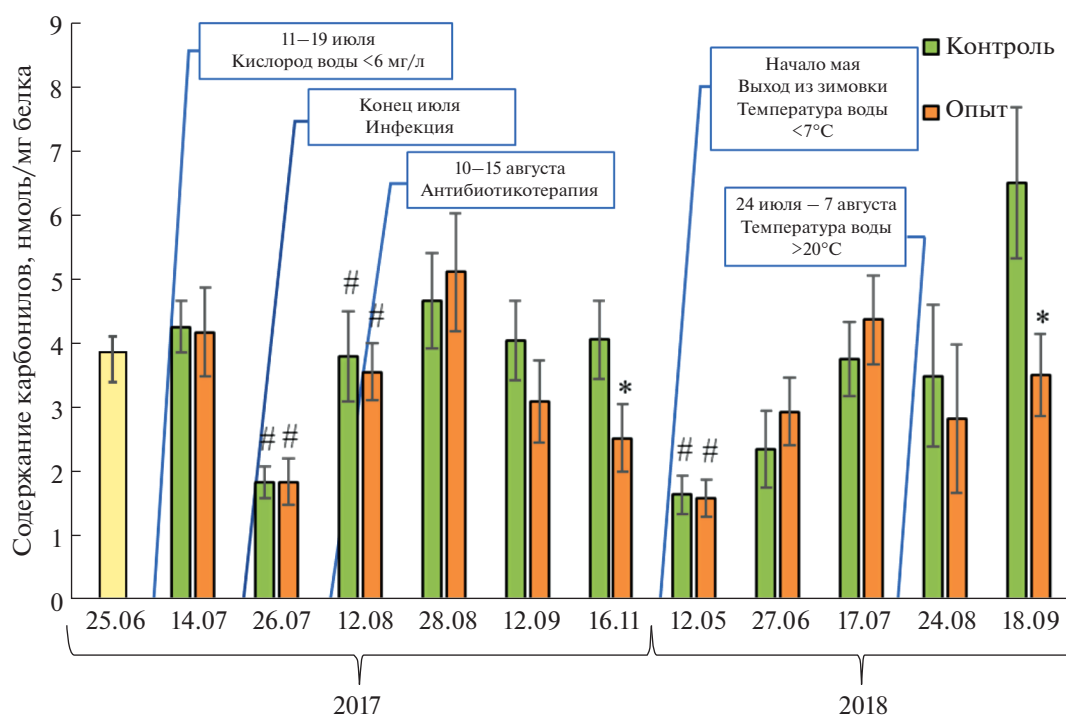


Рис. 1. Содержание карбонилированных белков в печени садковой форели, выращиваемой на стандартной диете (контроль) и с добавлением смеси ДГК + АГ (опыт). * Различия достоверны между контролем и опытом. # Различия достоверны между значениями в текущую и предыдущую дату взятия материала ($p < 0.05$).

ются с ранее описанными эффектами других антиоксидантов близкой ДГК структуры. Например, природный флавоноид ресвератрол снижал *in vitro* уровень МДА и белковых карбонил в эритроцитах человека, обработанных *трет*-бутилгидропероксидом [32], а также возраст-зависимое накопление окисленных белков в скелетных мышцах камбалы [33] и мыши [34].

Интенсивность протеасомного протеолиза в печени радужной форели. Полученные данные указывают на физиологически обусловленную зависимость изученных параметров — активности протеасом и белкового окисления — от общего уровня белкового обмена, повышенного в периоды, благоприятные для роста рыб и, напротив, сниженного при действии субоптимальных факторов, включая температурный (гипо- и гипертермию). В нашем эксперименте подтверждено, что более высокий темп роста и метаболизма и сопутствующий им базальный уровень окислительных процессов у молоди рыб компенсируется развитой антиоксидантной системой [34, 35]. Аналогично скорости роста рыб, эффективность АОС, оцениваемая по активности протеасом в печени, была максимальной у рыб первого года жизни, а на втором демонстрировала возрастной регресс (рис. 2). Возрастное снижение интенсивности внутриклеточного белкового обмена и про-

теолитических процессов обнаружено у многих организмов, включая рыб [35, 36].

В благоприятный для роста рыб сезон 2018 г. уровень активности протеасом в их печени положительно коррелировал ($r = 0.325$, $p < 0.05$) с содержанием карбонилированных белков, сходным образом для садковой форели контрольной и опытной групп; однако взаимосвязь нарушалась при действии множественных повреждающих факторов в 2017 г. ($r = -0.11$). Наблюдаемая зависимость отличалась от ранее описанной для клеточных культур, испытывающих внешние воздействия или возрастные изменения, включая астроциты крысы [37], кератиноциты человека при старении [38], фибробласты кожи человека при воздействии УФ-излучения [39], в которых при снижении протеасомной активности возрастало содержание окисленных белков. Как следует из наших и ранее опубликованных наблюдений, подобная взаимосвязь прослеживается не всегда, что предполагает неоднозначную зависимость двух показателей друг от друга и многофакторность их регуляции. Так, в нашей работе повышенная активность протеасом не повлияла на содержание окисленных белков в печени форели при понижении температуры среды (ноябрь 2017 г., по сравнению с сентябрем 2017 г.; рис. 1, 2), аналогично ранее описанному эффекту акклимации молоди рыб семейства Anarhichadidae к гипотер-

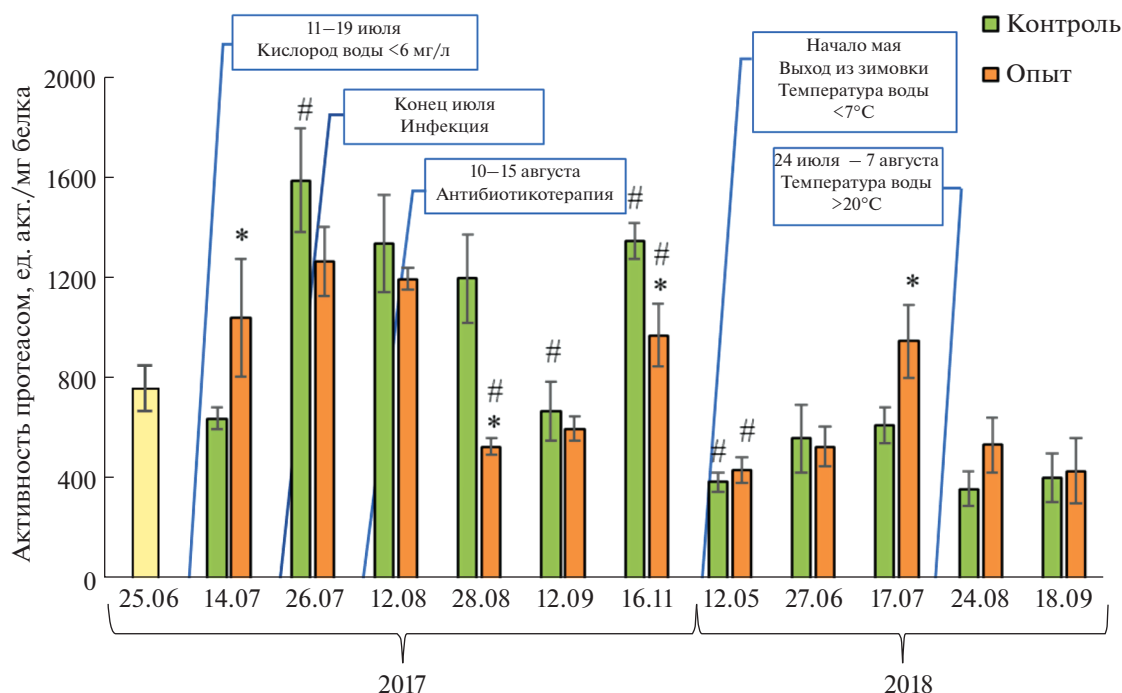


Рис. 2. Химотрипсиноподобная активность протеасом в печени садковой форели, выращиваемой на стандартной диете (контроль) и с добавлением смеси ДГК + АГ (опыт). * Различия достоверны между контролем и опытом. # Различия достоверны между значениями в текущую и предыдущую дату взятия материала ($p < 0.05$).

мии, сопровождавшемся активацией 20S протеасом в скелетных мышцах при отсутствии влияния на ОМБ [40]. По другим свидетельствам [41], высокая нагрузка на антиоксидантную систему радужной форели, вызванная действием сточных вод, приводила к повышению содержания окисленных белков в печени, но не к изменению активности 20S протеасомы. К настоящему моменту данные об особенностях регуляции протеасом у рыб практически отсутствуют, вместе с тем известно, что активность их каталитических субъединиц регулируется на трансляционном и посттрансляционном уровнях [42]. Установлено, что 20S протеасома более устойчива к воздействию окислительного стресса, чем 26S протеасома; кроме того, последняя в условиях окислительного стресса диссоциирует на коровую частицу 20S и регуляторные комплексы 19S [5], что увеличивает тотальную неселективную (убиквитин-независимую) активность 20S протеасом в клетках. Известно, что 4-гидроксиноненал, продукт ПОЛ, способен связываться с 20S протеасомой и инактивировать ее [43]. Кроме того, показано [5, 42, 44], что накопление сильно окисленных белков может приводить к образованию устойчивых к протеолизу агрегатов, которые подвергаются убиквитинированию и связываются с протеасомами, ингибируя их активность. Таким образом, на активность протеасом могут влиять различные факторы — как эндогенные (продукты окисления

белков и липидов, возраст организма), так и экзогенные (средовые факторы, токсиканты).

В нашем эксперименте особенно выраженное стимулирующее действие на протеасомный механизм утилизации окисленных белков оказал фактор инфицирования рыб. Известно, что провоспалительные сигнальные пути, активирующиеся при инфекции, приводят к усилению катаболических процессов в клетках и подавляют транскрипцию факторов иммунной защиты [45, 46]. У рыб, содержащихся на контрольном рационе, в ответ на действие инициирующего фактора — гипоксии и, возможно, латентной стадии инфекции (14 июля, рис. 2) — наблюдалась инактивация протеасом (644.7 ± 45.2 , $p \leq 0.05$), сопоставимая с ранее описанным эффектом подавлением протеасомной активности у рыб в гипоксических условиях [47], вместе с тем у особей, получавших обогащенный ДГК и АГ корм, в этих условиях развивалась обратная реакция — срочная активация протеасом (1045.8 ± 233.1 , $p \leq 0.05$). Вероятно, активация защитного клеточного механизма — протеасомного пути, развивающаяся в более короткий срок в присутствии биодобавки, отражает один из механизмов ее гепатопротекторного действия, подтвержденного, в частности, для ДГК-содержащего лекарственного средства Legalon® [17, 18]. Гипоксия, как мы предполагаем, сыграла триггерную роль в развитии у рыб бактериальной инфекции, в связи с чем гипоксическое состоя-

ние сменилось окислительным стрессом, который предсказуемо привел к активации протеасомного пути. Более выраженный протеасомозависимый ответ у рыб контрольной группы (26 июля, рис. 2) позволяет предположить у них окислительный стресс большей силы. Как показано ранее, именно 20S протеасомы путем убиквитин-независимого протеолиза поддерживают протеостаз клетки в условиях окислительного стресса [48, 49].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Схема эксперимента и отбор проб. Исследования проводили на форелевом хозяйстве Республики Карелия с июня 2017 г. по сентябрь 2018 г. В июне 2017 г. самок форели (1+) сходной массы 100 ± 2.3 г поместили в садки (5 тыс. особей на садок) и выращивали по сентябрь 2018 г. на дифференцированном рационе в соответствии со схемой эксперимента. В течение двух выростных сезонов (с мая по сентябрь) форель контрольной группы получала стандартный коммерческий корм (BioMar, Дания) без добавок, форель экспериментальной группы — стандартный корм с добавлением смеси ДГК и АГ (25 и 50 мг на кг корма соответственно); дозировка рекомендована производителем (ОАО “Аметис”, Россия; сертификат № 396-08.17); скармливание добавки проводили двухнедельными курсами с двухнедельными перерывами. По окончании выростного сезона 2017 г. обе выборки форели были оставлены на подледный период в тех же садках. В мае 2018 г. рыба (возраст 2+) была выведена из голодания, отсортирована по размеру, и особи среднего размера (733 ± 62.1 и 770 ± 87.1 г для контрольного и опытного садков соответственно) включены в продолжение эксперимента в 2018 г.

Ежедневно фиксировали температуру воды в садках и содержание растворенного кислорода оксиметром Seven2Go Pro S9 (Mettler Toledo, Швейцария). В период наблюдений 2017 г. максимальная температура воды в водоеме составляла 17°C , при этом содержание растворенного кислорода было высоким (7.0–10.9 мг/л), за исключением периода его резкого падения (11–19 июля) до 6.0 мг/л, в отдельные дни — до 5 мг/л (при оптимуме для форели >7.0 мг/л). В 2018 г., с 17 июля по 22 августа, отмечался температурный максимум $19\text{--}22^\circ\text{C}$ (при оптимуме для форели $14\text{--}19^\circ\text{C}$), сопровождавшийся снижением уровня растворенного кислорода до 7.2–8.0 мг/л, минимального за выростной сезон 2018 г.

Помимо естественных вариаций средовых факторов, форель подверглась действию спорадического фактора — бактериальных патогенов. Во второй половине июля 2017 г. у форели обеих групп манифестировала бактериальная геморрагическая септицемия, вызванная ассоциацией

Pseudomonas putida и *Cytophaga psychrophila* (заключение микробиологической экспертизы № 939/22 от 23.08.2017, ФГБНУ “ФНЦ — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко” РАН), в связи с чем рыба обеих групп была подвергнута антибактериальной терапии энрофлоксацином (25 мг/кг рыбы; 10–15 августа 2017 г.). Рыба получала антибиотик с кормом.

В ходе эксперимента, с 25 июня 2017 г. (до введения добавки, нулевая точка) и далее каждые две недели выростного сезона 2017 г. и ежемесячно — в 2018 г., проводили измерения массы и длины форели. Относительный темп роста (% массы/сутки) рассчитывали по формуле: $(W_2 - W_1)/W_1/(t_2 - t_1) \times 100$, где W_1 — начальный вес, W_2 — конечный вес рыб, $(t_2 - t_1)$ — количество суток между измерениями (табл. 1). В те же сроки на льду отбирали образцы (100–200 мг) печени рыб (от 8 особей из каждого садка). Образцы хранили в жидком азоте до начала анализа.

Реагенты и оборудование. В работе использовали химические реагенты, ингибиторы и субстраты протеиназ (Sigma-Aldrich, США), гомогенизатор TissueLyser LT (Qiagen, Германия), центрифугу Allegra 64R (Beckman Coulter, США), мультимодальный планшетный ридер CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия).

Получение препаратов протеиназ. Паренхиму печени гомогенизировали в 20 mM Tris-HCl-буфере (pH 7.5) с добавлением 150 mM NaCl, 5 mM ЭДТА-Na, 20 mM ДТТ, 0.1%-ного Triton X-100, 1 mM ATP, 5 mM MgCl_2 , ингибиторов протеиназ (1 mM PMSF, 1 мкг/мл лейпептина, 1 мкг/мл пепстатина) в соотношении 1 : 10 (w/v) и центрифугировали (20000 g, 20 мин).

Анализ протеолитической активности протеасом. Химотрипсиноподобную (ХТП) активность протеасом определяли по гидролизу флуорогенного олигопептида Suc-LLVY-AMC. Реакционная смесь содержала 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM ДТТ, 5 mM MgCl_2 , 1 mM ATP и 30 мкМ субстрат. Флуоресценцию образцов измеряли при длине волны 380 (ex) и 440 нм (em). Истинную ХТП-активность протеасом рассчитывали за вычетом активности примесных протеиназ, определенной в присутствии 5 мкМ MG132, ингибитора ХТП-активности протеасом. Активность (ед. акт.) выражали в условных единицах показаний флуориметра и нормализовали по содержанию в пробах белка.

Содержание белковых карбонильных групп оценивали по методу Levine et al. [50]. К 100 мкл исследуемого образца, полученного при гомогенизации ткани в 20 mM Tris-HCl-буфере, pH 7.5 (соотношение 1 : 10, w/v) и дальнейшем центрифугировании (20000 g, 20 мин), добавляли 500 мкл 0.2%-ного

2,4-ДНФГ, растворенного в 2 М HCl (опыт), или 500 мкл 2 М HCl (контроль). Реакционную смесь инкубировали 1 ч в темноте при комнатной температуре, затем добавляли 500 мкл 20%-ной ТХУ, выдерживали 10 мин при 4°C и центрифугировали (10000 g, 10 мин). Осадок промывали дважды смесью этанол : этилацетат (1 : 1), высушивали и растворяли в 1 мл 6 М гуанидингидрохлорида при нагревании до 90°C. Продукты реакции кетонных и альдегидных функциональных групп с 2,4-ДНФГ — 2,4-динитрофенилгидразоны — регистрировали спектрофотометрически при 370 нм. Количественное содержание динитрофенилгидразонов рассчитывали с использованием коэффициента их молярной экстинкции, равного $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, и выражали в нм/мг белка.

Анализ содержания белка. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд [51] с использованием BSA в качестве стандарта.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ результатов проводили при помощи критерия Краскела—Уоллиса с последующим сравнением выборок с использованием критерия Манна—Уитни. Коэффициенты корреляции между сравниваемыми показателями определяли по Пирсону.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе работы изучен уровень карбонилированных белков и протеолитической активности протеасом в печени садковой радужной форели, выращенной на стандартном или обогащенном ДГК и АГ корме, при воздействии средовых факторов (летней гипертермии, кислородного голодания и бактериальной инфекции). Изученная в работе динамика содержания окисленных клеточных макромолекул и активности протеасомного пути их утилизации оказалась тесно связана с процессами роста рыб и, по всей видимости, интенсивностью обменных процессов, включая белковый метаболизм и окислительные пути энергопродукции, приводящие к генерации АФК. Нами установлена зависимость уровня белкового окисления в печени форели от сезонной вариативности природных факторов, включая повреждающие — гипо- и гипертермию, гипоксию, бактериальную инфекцию. В условиях окислительного стресса, вызванного инфекционным заболеванием, избыточное образование белковых карбониллов приводит к активации протеасом — компонентов АОС, отвечающих за деградацию необратимо поврежденных окислением белковых молекул. Наблюдаемое накопление окисленных тканевых белков, вызванное действием на организм повреждающих средовых факторов, может быть следствием как их избыточного образования, так и подавления путей их элиминации; по нашим данным, обогащение ра-

циона кормовой растительной добавкой с антиоксидантным действием способствует поддержанию баланса этих процессов.

Основным показанием к практическому применению изученной добавки может служить профилактика заболеваемости и повышение естественной резистентности рыб в условиях искусственного выращивания, связанного с действием неблагоприятных факторов различной природы (погодных, инфекционных, антропогенных). Учитывая природное происхождение ДГК и АГ, получаемых водно-спиртовой экстракцией из отходов заготовки лиственницы, и, как следствие, их безопасность, нетоксичность, биоразлагаемость, становится очевидным преимуществом изученной добавки в сравнении с применяемыми в рыбоводной практике антибиотиками, гормонами, вакцинами, как для здоровья выращиваемой рыбы, так и для экосистем водоемов, используемых для садкового рыбоводства.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность О.Н. Кремневу за организацию работы на форелевом хозяйстве.

Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования ФИЦ “Карельский научный центр РАН”.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Садковый эксперимент и камеральная обработка биологического материала выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-74-20098). Фундаментальные сведения о биологической роли протеасом у рыб изучены в рамках государственного задания КарНЦ РАН FMEN-2022-0006.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работы проведены на самках радужной форели с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского сообщества (86/609/ЕС), и правил проведения работ с экспериментальными животными.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Parvez S., Raisuddin S. // Environ. Toxicol. Pharmacol. 2005. V. 20. P. 112–117.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.11.002>
2. Lu Y., Wu Z., Song Z., Xiao P., Liu Y., Zhang P., You F. // Fish Shellfish Immunol. 2016. V. 58. P. 125–135.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.09.008>

3. *Johnstone J., Nash S., Hernandez E., Rahman M.S.* // *Mar. Environ. Res.* 2019. V. 149. P. 40–49.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.05.017>
4. *Шлапакова Т.И., Костин Р.К., Тягунова Е.Е.* // *Биоорг. химия.* 2020. Т. 46. С. 466–485. [*Shlapakova T.I., Kostin R.K., Tyagunova E.E.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. P. 657–674.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162020050222>
5. *Vasilopoulou M.A., Ioannou E., Roussis V., Chondrogianni N.* // *Redox Biol.* 2021. V. 41. P. 101897.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101897>
6. *Nyström T.* // *EMBO J.* 2005. V. 24. P. 311–317.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600599>
7. *Siemieniuk E., Kolodziejczyk L., Skrzydlewska E.* // *Toxicol. Mech. Methods.* 2008. V. 18. P. 519–524.
<https://doi.org/10.1080/15376510701624001>
8. *Старкова Н.Н., Королева Е.П., Ротанова Т.В.* // *Биоорг. химия.* 2000. Т. 26. С. 83–96. [*Starkova N.N., Koroleva E.P., Rotanova T.V.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2000. V. 26. P. 71–84.]
<https://doi.org/10.1007/BF02759152>
9. *Ardley H.C., Robinson P.A.* // *Essays Biochem.* 2005. V. 41. P. 15–30.
<https://doi.org/10.1042/EB0410015>
10. *Каницерова Н.П., Чутова М.В., Лысенко Л.А., Тушина Е.Д., Родин М.А., Крупнова М.Ю., Суховская И.В.* // *Биоорг. химия.* 2020. Т. 46. С. 729–735. [*Kantserova N.P., Churova M.V., Lysenko L.A., Tushina E.D., Rodin M.A., Krupnova M.Yu., Sukhovskaya I.V.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. P. 1181–1186.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162020060114>
11. *Skov P.V., Larsen B.K., Frisk M., Jokumsen A.* // *Aquaculture.* 2011. V. 319. P. 446–452.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.07.008>
12. *Ackerman P.A., Forsyth R.B., Mazur C.F., Iwama G.K.* // *Fish Physiol. Biochem.* 2000. V. 23. P. 327–336.
<https://doi.org/10.1023/A:1011107610971>
13. *Palmisano A.N., Winton J.R., Dickhoff W.W.* // *Mar. Biotechnol.* 2000. V. 2. P. 329–338.
<https://doi.org/10.1007/s101260000005>
14. *Tort L.* // *Dev. Comp. Immunol.* 2011. V. 35. P. 1366–1375.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.002>
15. *Sary C., Carbonera F., Todesco H., Nunes do Prado I., Visentainer J.V., Oliveira M., da Silva M.C., Ribeiro R.P., Lewandowski V.* // *Aquac. Res.* V. 50. P. 673–679.
<https://doi.org/10.1111/are.13944>
16. *Elabd H., Wang H.-P., Shaheen A., Yao H., Abbass A.* // *Aquac. Rep.* 2017. V. 8. P. 21–30.
<https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2017.09.002>
17. *Teselkin Y.O., Babenkova I.V., Kolhir V.K., Baginskaya A.L., Tjukavkina N.A., Kolesnik Y.A., Selivanova I.A., Eichholz A.A.* // *Phytother. Res.* 2020. V. 14. P. 160–162.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1573\(200005\)14:3<160::aid-ptr555>3.0.co;2-y](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1573(200005)14:3<160::aid-ptr555>3.0.co;2-y)
18. *Weidmann A.E.* // *Eur. J. Pharmacol.* 2012. V. 684. P. 19–26.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.03.035>
19. *Ma C., Zu Y., Li J., Li W., Liu S.* // *Ind. Crop. Prod.* 2017. V. 95. P. 324–331.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.10.040>
20. *Awad E., Awaad A.S., Esteban M.A.* // *Fish Shellfish Immunol.* 2015. V. 43. P. 43–50.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.12.009>
21. *Kantserova N.P., Lysenko L.A., Churova M.V., Tushina E.D., Sukhovskaya I.V., Nemova N.N.* // *Int. Aquat. Res.* 2020. V. 12. P. 63–73.
[https://doi.org/10.22034/IAR\(20\).2020.671431](https://doi.org/10.22034/IAR(20).2020.671431)
22. *Fokina N.N., Lysenko L.A., Ruokolainen T.R., Sukhovskaya I.V., Kantserova N.P., Nemova N.N.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2020. V. 56. P. 356–362.
<https://doi.org/10.1134/S0003683820030035>
23. *Dotta G., de Andrade J.I.A., Garcia P., Alves Jesus G.F., Mourinho J.L.P., Mattos J.J., Dias Bainy A.C., Martins M.L.* // *Fish Shellfish Immunol.* 2018. V. 79. P. 175–180.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.05.024>
24. *Peixoto M.J., Ferraz R., Magnoni L.J., Pereira R., Gonçalves J.F., Caldach-Giner J., Pérez-Sánchez J., Ozório R.O.A.* // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 16134.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-52693-6>
25. *Lushchak V.I., Bagnyukova T.V.* // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2006. V. 144. P. 283–289.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.02.014>
26. *Lushchak V.I., Bagnyukova T.V., Lushchak O.V., Storey J.M., Storey K.B.* // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005. V. 37. P. 1319–1330.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.01.006>
27. *Maita M.* // *J. Aquac. Res. Develop.* 2015. V. 6. P. 6.
<https://doi.org/10.4172/2155-9546.S1.002>
28. *Adeyemi J.A.* // *Fish Physiol. Biochem.* 2014. V. 40. P. 347–354.
<https://doi.org/10.1007/s10695-013-9847-x>
29. *Griffiths H.R.* // *Nutr. Res Rev.* 2002. V. 15. P. 3–17.
<https://doi.org/10.1079/NRR200134>
30. *Becker D., Brinkmann B.F., Zeis B., Paul R.J.* // *Biol. Cell.* 2011. V. 103. P. 351–363.
<https://doi.org/10.1042/BC20100145>
31. *Paital B., Chainy G.B.* // *J. Therm. Biol.* 2014. V. 41. P. 104–111.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2014.02.013>
32. *Pandey K.B., Rizvi S.I.* // *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2009. V. 34. P. 1093–1097.
<https://doi.org/10.1139/H09-115>
33. *Wilson W.N., Baumgarner B.L., Watanabe W.O., Alam M.S., Kinsey S.T.* // *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2015. V. 183. P. 27–35.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.12.014>
34. *Olesen J., Ringholm S., Nielsen M.M., Brandt C.T., Pedersen J.T., Halling J.F., Goodyear L.J., Pilegaard H.* // *Exp. Gerontol.* 2013. V. 48. P. 1274–1284.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.07.015>
35. *Almroth B.C., Johansson A., Förlin L., Sturve J.* // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2010. V. 155. P. 442–448.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.01.012>
36. *Nemova N.N., Lysenko L.A., Kantserova N.P.* // *Russ. J. Dev. Biol.* 2016. V. 47. P. 161–172.
<https://doi.org/10.1134/S1062360416040068>

37. Zheng J., Bizzozero O.A. // J. Neurochem. 2010. V. 115. P. 1556–1567.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07062.x>
38. Petropoulos I., Conconi M., Wang X., Hoenel B., Brégère F., Milner Y., Friguet B. // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. 2000. V. 55. P. 220–227.
<https://doi.org/10.1093/gerona/55.5.b220>
39. Catalgol B., Ziaja I., Breusing N., Jung T., Höhn A., Alper-tunga B., Schroeder P., Chondrogianni N., Gonos E.S., Petropoulos I., Friguet B., Klotz L.O., Krutmann J., Grune T. // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. P. 30076–30086.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.044503>
40. Lamarre S.G., Le François N.R., Driedzic W.R., Blier P.U. // J. Exp. Biol. 2009. V. 212. P. 1294–12301.
<https://doi.org/10.1242/jeb.028290>
41. Almroth B.C., Albertsson E., Sturve J., Förlin L. // Eco-toxicol. Environ. Saf. 2008. V. 70. P. 370–380.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.01.023>
42. Grune T., Jung T., Merker K., Davies K.J. // Int. J. Bio-chem. Cell Biol. 2004. V. 36. P. 2519–2530.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.04.020>
43. Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. // Free Radic. Biol. Med. 1991. V. 11. P. 81–128.
[https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90192-6)
44. Jung T., Höhn A., Grune T. // Redox Biol. 2014. V. 2. P. 99–104.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.008>
45. Pooley N.J., Tacchi L., Secombes C.J., Martin S.A.M. // BMC Genomics. 2013. V. 14. P. 747.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-747>
46. Sassin W. // Beacon J. Stud. Ideol. Ment. Dimens. 2020. V. 3. P. 020440211.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.4459199>
47. Abu-El-Rub E., Sequiera G.L., Sareen N., Yan W., Moudgil M., Golam Sabbir M., Dhingra S. // Cell Death Dis. 2019. V. 10. P. 90.
<https://doi.org/10.1038/s41419-019-1359-x>
48. Pickering A.M., Davies K.J. // Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 2012. V. 109. P. 227–248.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397863-9.00006-7>
49. Raynes R., Pomatto L.C., Davies K.J. // Mol. Aspects Med. 2016. V. 50. P. 41–55.
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.05.001>
50. Levine R.L., Williams J.A., Stadtman E.R., Shacter E. // Methods Enzymol. 1994. V. 233. P. 346–357.
[https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(94)33040-9)
51. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
<https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

Oxidative Modification and Proteolysis of Hepatic Proteins in Reared Rainbow Trout Impacted by Environmental Variables

N. P. Kantserova*,[#], E. D. Tushina*, I. V. Sukhovskaya*, and L. A. Lysenko*

[#]Phone: +7 (8142) 76-98-10; e-mail: nkantserova@yandex.ru

*Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences,
ul. Pushkinskaya 11, Petrozavodsk, 185910 Russia

The experiment shows the dynamics of related indices, such as the level of oxidative modification (carbonylation) of tissue proteins and the activity of proteases of quality control and utilization of damaged and oxidized proteins (proteasomes), in the liver of cultivated rainbow trout both during periods favorable for fish growth, as well as when impacted by unfavorable environmental variables. Both parameters showed a correlation with fish growth rate corresponding with the level of total metabolism and oxidative processes, while positive for the content of protein carbonyls ($r = 0.42$, $p < 0.01$) and negative for the activity of proteasomes ($r = -0.46$, $p < 0.01$). In fish affected by damaging factors, the physiological dynamics of the generation and utilization of protein carbonyls had been disturbed. Thus, short-term hypoxia caused by a drop in the level of dissolved oxygen and metabolic depression at the end of the wintering period both have led to a decrease in oxidative damage to proteins in fish liver, whereas infectious pathogens resulted in the accumulation of oxidized proteins, less pronounced if the diet included a plant supplement with antioxidant activity. The activity of proteasomes, which play a key role in maintaining cell proteostasis under oxidative stress, increased in fish under multiple stressors, including hypoxia and subsequent infection. The experimental diet containing natural bioactive substances did not change the physiological dynamics of protein oxidation and the rate of their utilization in fish growing under optimal conditions whereas maintained a balance in this system and, in general, increased fish resistance to the effect of unfavorable factors.

Keywords: protein carbonyls, proteasomes, rainbow trout, hypoxia, water temperature, bacterial infection



УДК 547.792.1:615.225.2

НИТРОАЗОЛОПИРИМИДИНЫ: ВЛИЯНИЕ НА АДЕНОЗИНОВЫЙ РЕЦЕПТОР A1 И ВНУТРИГЛАЗНОЕ ДАВЛЕНИЕ У КРЫС

© 2022 г. К. В. Саватеев*, В. Л. Русинов*, С. К. Котовская*, А. А. Спасов***, Л. В. Науменко**, А. С. Таран***, А. А. Бригадирова**, Д. С. Яковлев***, К. Т. Султанова***, Н. М. Щербакова**

*ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», Россия, 620002 Екатеринбург, ул. Мира, 19

**ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 400131 Волгоград, пл. Павших Борцов, 1

***ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр», Россия, 400131 Волгоград, пл. Павших Борцов, 1

Поступила в редакцию 04.10.2021 г.

После доработки 31.10.2021 г.

Принята к публикации 11.11.2021 г.

На основании роли аденозинового рецептора A1 в модуляции внутриглазного давления, повышение которого — важный фактор развития глаукомы, и структурного анализа среди известных ингибиторов данного рецептора были отобраны и синтезированы шесть соединений ряда 5(7)-алкиламино-6-нитроазолопиримидинов и 8-алкилазоло[5,1-*b*]пуринов. Показано, что данные гетероциклы проявляют слабое сродство к аденозиновому рецептору A1 на модели аденозинзависимого изменения хронотропного эффекта *in vitro* с использованием изолированных предсердий белых мышей. С другой стороны, тиадiazоло[3,2-*a*]пиримидины и триазоло[5,1-*b*]пурин продемонстрировали гипотензивное действие в экспериментах *in vivo* на крысах: при использовании соединения-лидера (5-метил-8-(гидроксиэтил)триазоло[5,1-*b*]пурин, 0.2%-ный раствор) офтальмотонус снижался на 34% через 3 ч, нежелательный резорбтивный эффект не наблюдался. Кроме того, с помощью МТТ-теста на линии клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 было показано, что гетероциклы, оказывающие влияние на ВГД, демонстрируют 1–2 порядка меньшую цитотоксичность, чем препарат сравнения доксорубин.

Ключевые слова: азолопиримидины, азолупурины, аденозиновые рецепторы, аденозин, внутриглазное давление, глаукома

DOI: 10.31857/S0132342322040182

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время глаукома — одна из ведущих причин необратимой слепоты в мире. Количество больных глаукомой даже по самым оптимистичным прогнозам будет непрерывно расти [1], что коррелирует с тенденцией по увеличению числа инвалидов по зрению вследствие глаукомы [2].

Несмотря на определенные успехи в изучении патогенеза и разработке схем лечения данного заболевания, снижение внутриглазного давления (ВГД) остается первоочередной задачей при терапии глаукомы [3].

В местной медикаментозной терапии глаукомы используются препараты с различным меха-

низмом действия: как снижающим продукцию ВГД (β -адреноблокаторы, ингибиторы карбоангидразы II, α -адреномиметики), так и улучшающим ее отток (аналоги простагландинов, м-холинмиметики, α -адреномиметики). В последнее время в литературе обсуждается появление новых классов препаратов, снижающих ВГД путем воздействия на определенные биологические мишени. К ним относятся препараты, снижающие офтальмотонус путем повышения трабекулярного оттока — ингибиторы Rho-киназы [4], соединения, обладающие сродством к III подтипу мелатониновых рецепторов, способные снижать ВГД концентрационно-зависимым образом [5], доноры оксида азота и препараты, воздействующие на глобулярные белки, содержащиеся в клетках трабекулярной сети и шлеммова канала, а также антагонисты рецепторов аденозина.

Сокращения: A1 AP — аденозиновый рецептор A1; ВГД — внутриглазное давление; ЧСС — частота сердечных сокращений.

Автор для связи: (эл. почта: i-krafttt@yandex.ru).

Было показано, что аденозиновый рецептор A_1 (A_1 AR) экспрессируется в переднем сегменте человеческого глаза и представляет собой привлекательную мишень для контроля за ВГД [6]. Новые исследования в этой области установили, что данный рецептор активно представлен в дренажной системе глаза, в частности в протоках с водянистой влагой, и играет значительную роль в модуляции ВГД [7, 8].

Так, избыток аденозина — эндогенного агониста A_1 -рецептора — в передней камере глаза приводит к развитию глазной гипертензии [9]. Соответственно, поиск новых ингибиторов данного подтипа аденозиновых рецепторов — перспективное направление для снижения ВГД.

Цель данной работы — синтез гетероциклов азолазинового ряда и исследование их влияния на аденозиновый рецептор A_1 и внутриглазное давление у крыс для установления возможной взаимосвязи между ингибирующей активностью и гипотензивным действием.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез гетероциклов азолазинового ряда. Ранее нами было показано, что нитросодержащие азолазины — это близкие структурные аналоги известных антагонистов аденозинового рецептора A_{2a} [10]. При этом известно, что сайты связывания A_{2a} - и A_1 -рецепторов близки по структуре, что, с одной стороны, диктует необходимость поиска селективных эффекторов, с другой стороны, можно заключить, что эффекторы A_{2a} -рецептора будут иметь сродство и к сайту связывания аденозинового рецептора A_1 . Для исследования антагонистического эффекта были синтезированы алкиламин-содержащие нитроазолопиримидины (III–V) по разработанному нами ранее методу последовательного хлордезоксигенирования с помощью смеси хлористого фосфорилла и пиридина и нуклеофильного замещения атома галогена на алкаламины (схема 1) [11–13]. Подобная стратегия была использована и при синтезе 5-алкиламино-6-нитро-1,3,4-тиадиазола[3,2-*a*]пиримидин-8-онов, содержащих фрагменты *n*-хлорфенилэтиламина (VIII) и тирамина (IX) (схема 2).

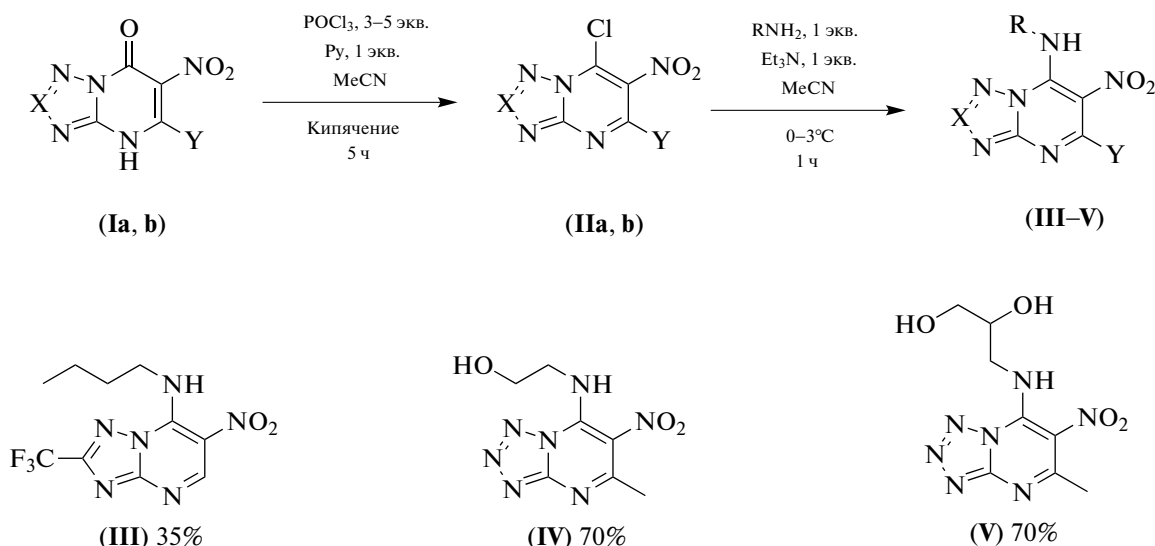


Схема 1. Двухстадийный синтез 6-нитро-7-алкиламиноазоло[1,5-*a*]пиримидинов (III–V).

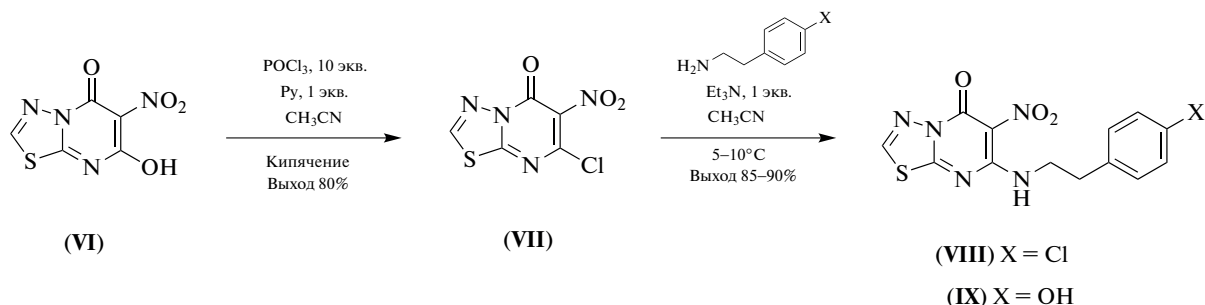


Схема 2. Синтез 5-алкиламино-6-нитро-1,3,4-тиадиазола[3,2-*a*]пиримидин-7-онов (VIII) и (IX).

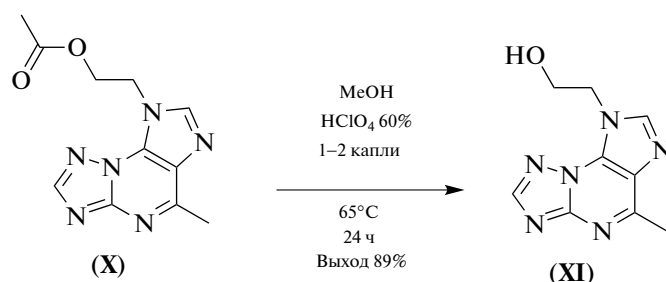


Схема 3. Снятие ацильной защиты с гидроксильной группы гетероцикла (X) с получением 5-метил-8-(2-гидроксиэтил)-1,2,3-триазоло[5,1-*b*]пурина (XI).

Кроме того, был получен 5-метил-8-(2-гидроксиэтил)триазоло[5,1-*b*]пурин (XI), который представляет собой структурный аналог трициклических ингибиторов аденозиновых рецепторов. С этой целью было выполнено снятие ацильной защиты с гидроксигруппы полученного ранее триазоло[5,1-*b*]пурина (X) с помощью каталитического количества хлорной кислоты при кипячении в метаноле (схема 3).

Фармакологические свойства синтезированных гетероциклов. Антагонистическая активность по отношению к аденозиновому рецептору A₁ *in vitro*. Исследование антагонистического действия синтезированных азолоазинов (III–V), (VIII), (IX) и (XI) в концентрации 10 мкМ в отношении аденозинового рецептора A₁ проведено на модели аденозинзависимого изменения хронотропного эффекта *in vitro* с использованием изолированных предсердий белых мышей. Было обнаружено, что наибольшую антагонистическую активность проявляют гетероциклы 6-нитроазолопиримидинового ряда (III–V), в то время как соответствующие тиадиазолопиримидины (VIII), (IX) и триазолопурин (XI) фактически не оказывали статистически значимого действия на A₁ AP. Однако все исследуемые соединения уступали по данному показателю препарату сравнения кофеину (табл. 1). Тем не менее полученные результаты позволяют рассматривать триазоло[1,5-*a*]пиримидиновый скаффолд как перспективную основу для поиска структур с более высоким родством к данной биологической мишени.

Офтальмогипотензивные свойства соединений *in vitro*. Влияние соединений на уровень ВГД изучали на беспородных интактных крысах методом тонометрии. Показано, что все исследуемые соединения обладают офтальмогипотензивными свойствами. Так, при изучении действия гетероцикла (VIII) выявлено повышение офтальмотонуса на 10% в течение 60 мин, после чего происходило незначительное снижение ВГД до исходных значений (рис. 1а) как в тестовом, так и в контрольном глазах, что выступает показателем нежелательного резорбтивного эффекта. Однако к третьему часу ВГД тестового глаза снижалось на 20%, а в контрольном глазу не изменялось.

Исследования соединения (IX) продемонстрировали, что в течение 60 мин после его закапывания в тестовый глаз ВГД практически не изменялось. Однако ко второму часу исследования наблюдалось снижение ВГД на 13% и к третьему часу – на 18% (рис. 1б). В контрольном глазу динамика ВГД находилась в пределах нормы, что свидетельствует об отсутствии системного действия изучаемого соединения.

Закапывание в тестовый глаз азоло[5,1-*b*]пурина (XI) приводило к снижению офтальмотонуса на 26% уже к первому часу исследования, на 30% через 2 ч и достигала максимального эффекта (34%) через 3 ч (рис. 1в). В контрольном глазу ВГД изменялось в диапазоне 1–2 мм рт. ст., что свидетельствует об отсутствии системного действия изучаемого соединения (XI).

При этом оказалось, что наиболее активные в отношении A₁ AP гетероциклы (III–V) не приводят к снижению ВГД в исследуемых концентрациях. По всей видимости, влияние соединений (VIII), (IX) и (XI) на ВГД не связано с ингибиро-

Таблица 1. A₁-антагонистическая активность синтезированных гетероциклов

Соединение или препарат	Подавление отрицательного хронотропного эффекта аденозина, Δ%
(III)	36.9 ± 5.4
(IV)	32.5 ± 3.8
(V)	45.9 ± 3.7
(VIII)	0.5 ± 0.5*
(IX)	2.5 ± 2.5*
(XI)	2.5 ± 1.1*
Кофеин	60.5 ± 3.7

Примечание. Концентрация исследуемых соединений и кофеина составляла 10 мкМ. Данные представлены в виде среднего арифметического значения ± стандартная ошибка среднего арифметического значения. * *p* < 0.05 по сравнению с показателями, полученными для кофеина (критерий Краскела–Уоллиса с постестом Данна для множественных сравнений).

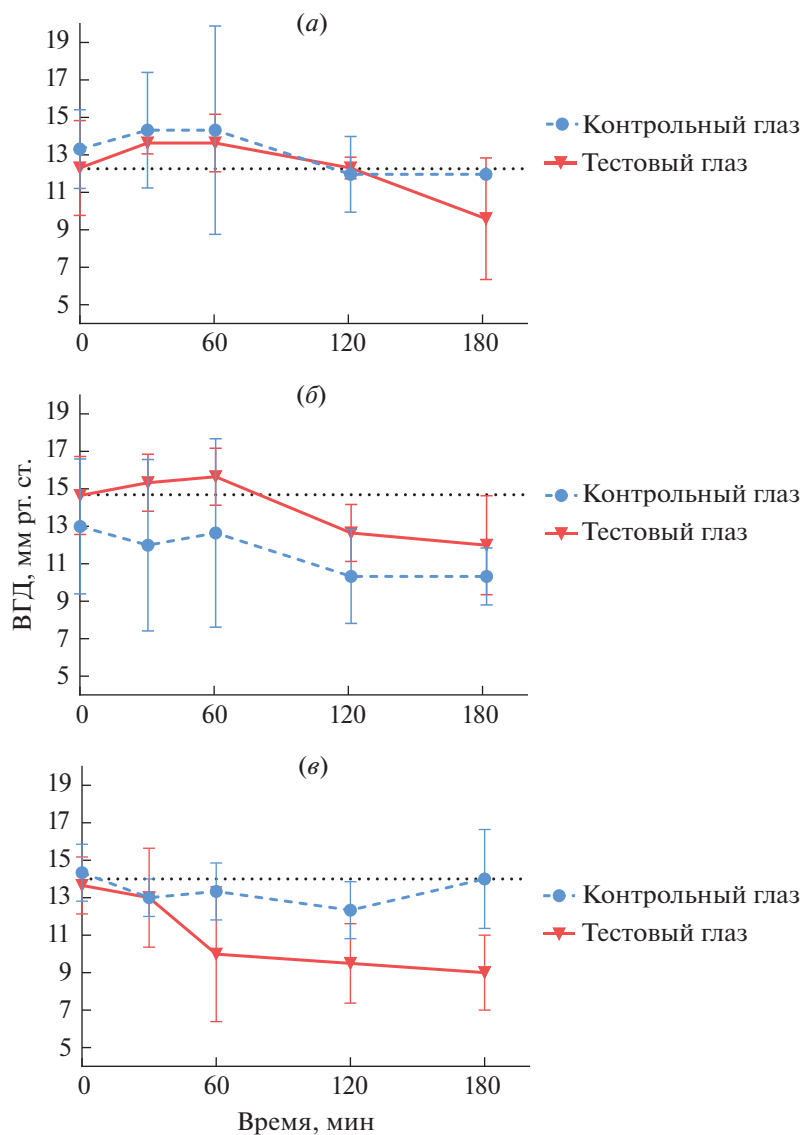


Рис. 1. Влияние соединений (VIII) (а), (IX) (б) и (XI) (в) на внутриглазное давление intactных крыс.

ванием A_1 AP, а задействует другой механизм биологического действия.

Цитотоксичность соединений. На заключительном этапе с целью предварительной оценки токсикологических характеристик наиболее активных соединений (VIII), (IX) и (XI) была изучена их цитотоксичность в МТТ-тесте на линии клеток человека HepG2. Для 6-нитротиадиазоло[3,2-*a*]пиримидинов (VIII) и (IX) цитотоксичность LC_{50} составила 0.073 и 0.072 мМ соответственно, что в 30–40 раз меньше, чем у препарата сравнения доксорубина. Наименьшее цитотоксическое действие выявлено для триазоло[5,1-*b*]пурина (XI), уровень LC_{50} для которого превышает 1 мМ и находится за пределами максимальных исследованных концентраций (табл. 2), превосходя по безопасности доксорубин более чем в 500 раз.

Было показано, что с точки зрения сродства к A_1 AP наиболее выгоден 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидиновый (III) и тетразоло[1,5-*a*]пиримидиновый скаффолд (IV,V), тогда как 1,3,4-тиадиазоло[3,2-*a*]пиримидины (VIII), (IX) и 1,2,4-триазо-

Таблица 2. Цитотоксичность соединений (VIII), (IX) и (XI) в сравнении с доксорубином на клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 (МТТ-тест)

Соединение или препарат	LC_{50} , мМ
(VIII)	0.073
(IX)	0.072
(XI)	>1
Доксорубин	0.002

ло[5,1-*b*]пурин (XI) не проявили статистически значимого ингибирующего эффекта в отношении этого рецептора. С другой стороны, полученные 6-нитроазоло[1,5-*a*]пиримидины уступали в сродстве к A₁ AP препарату сравнения кофеину, что свидетельствует о необходимости дальнейшей структурной модификации для создания более мощных ингибиторов.

Обратная закономерность наблюдалась при исследовании офтальмогипотензивных свойств полученных гетероциклов: азоло[1,5-*a*]пиримидины (III–V) не оказывали влияния на ВГД крыс, в то время как тиадиазоло[3,2-*a*]пиримидины (VIII), (IX) и триазоло[5,1-*b*]пурин (XI) продемонстрировали гипотензивное действие. При этом соединение-лидер, 5-метил-8-(гидроксиэтил)триазоло[5,1-*b*]пурин (XI), снижало офтальмотонус на 34% через 3 ч, не проявляя нежелательного резорбтивного эффекта. Кроме того, было показано, что гетероциклы, оказывающие влияние на ВГД, демонстрируют значительно меньшую цитотоксичность, чем препарат сравнения доксорубин.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез гетероциклов азолоазинового ряда.

Спектры ¹H- и ¹³C-ЯМР полученных соединений регистрировали на спектрометре Avance II (400 и 100 МГц соответственно; Bruker, Германия) при температуре 25°C, внутренний стандарт TMS, растворитель DMSO-*d*₆ и CDCl₃. Элементный анализ выполняли на анализаторе 2400 CHN (PerkinElmer, США). Контроль за ходом реакций осуществляли при помощи ТСХ на пластинках Silufol UV-254 (Imid LTD, РФ, Краснодар). Температуру плавления измеряли на приборе Stuart SMP3. Гетероциклы (III) [14], (IV) и (V) [12], (VIII) и (IX) [13] и (X) [11] были синтезированы по ранее разработанным методикам.

Синтез 5-метил-8-(2-гидроксиэтил)триазоло[5,1-*b*]пурина (XI). К раствору 2.18 г (0.01 моль) 5-метил-8-(2-ацетоксиэтил)триазоло[5,1-*b*]пурина в 40 мл MeOH добавляли 0.5 мл 60%-ной HClO₄, полученную смесь кипятили в течение 24 ч. Реакционную массу упаривали в вакууме при 35°C, остаток перекристаллизовывали из *изо*-бутанола.

Белый порошок. *R*_f (EtOAc) 0.4, Т. пл. 214–216°C. Выход 89%. Найдено, %: С 49.44; Н 4.50; N 38.80. Брутто-формула: C₉H₁₀N₆O. Вычислено, %: С 49.54; Н 4.62; N 38.51. Спектр ¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆), δ (м.д.): 2.84 (3H, с, CH₃), 3.87 (2H, т, J 4.0, OCH₂), 4.69 (2H, т, J 4.0, NCH₂), 8.40 (1H, с, C7H), 8.84 (1H, с, C2H). Спектр ¹³C-ЯМР (100 МГц, CDCl₃), δ (м.д.): 20.2 (CH₃), 49.0 (NCH₂), 59.8 (OCH₂), 127.5 (C5a), 134.3 (C8a), 142.6 (C7), 151.2 (C3a), 152.3 (C2), 159.4 (C5).

Фармакологические исследования полученных соединений. Антагонистическая активность соединений по отношению к аденозиновому рецептору A₁. Исследование антагонистической активности соединений (III–V), (VIII), (IX) и (XI) по отношению к A₁ AP проводили на изолированных предсердиях 20 белых мышей обоих полов возрастом 4 месяца (питомник “Рапполово”, Ленинградская область) на модели аденозинзависимого изменения хронотропного эффекта *in vitro* в модификации Бригадировой с соавт. [15] с использованием буферного раствора Кребса–Хенселейта (состав, mM): NaCl – 118.0; KCl – 4.7; KH₂PO₄ – 1.18; MgSO₄ – 1.2; CaCl₂ – 2.5; NaHCO₃ – 25.0; глюкоза – 5.55; pH 7.4) при постоянной оксигенации (95% O₂ – 5% CO₂) и термостатировании при 37°C. Исследуемые вещества в концентрации 10 мкМ вносили в ванночку с изолированными предсердиями, после чего добавляли аденозин (10 мкМ; Sigma-Aldrich, США). Активность соединений оценивали по степени подавления индуцированного аденозином снижения хронотропизма изолированных предсердий, работающих в собственном ритме (без стимуляции), в сравнении с контрольным эффектом аденозина (в Δ%). Сокращения предсердий регистрировали с использованием изометрического датчика TSD125C при изометрической нагрузке в 1 г в 4-канальной установке поддержания жизнедеятельности изолированных тканей DA100C (Biopac Systems, Inc., США) и программного обеспечения AcqKnowledge 4.0 (Biopac Systems, Inc., США). Количество сокращений изолированных предсердий измеряли за 30-секундный интервал с последующим расчетом частоты сердечных сокращений (ЧСС). В качестве препарата сравнения использовали неселективный антагонист аденозиновых рецепторов A_{1/2a} – кофеин (10 мкМ; Sigma-Aldrich, США).

Величину подавления хронотропизма предсердий (Δ%) рассчитывали по формуле:

$$\Delta\% = 100 - (\Delta\text{ЧСС}_{\text{контр}} / \Delta\text{ЧСС}_{\text{опыт}} \times 100),$$

где ΔЧСС_{контр} – разница между исходной ЧСС и ЧСС, рассчитанной после введения аденозина в контрольном измерении; ΔЧСС_{опыт} – разница между исходной ЧСС и ЧСС, рассчитанной после введения аденозина на фоне экспозиции исследуемых соединений в опытном измерении.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического критерия Краскела–Уоллиса с постестом Данна для множественных сравнений в программе GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, США).

Офтальмогипотензивные свойства соединений *in vitro*. Изучение влияния соединений на уровень ВГД проводили на 48 взрослых беспородных интактных крысах обоих полов возрастом 2 месяца (питомник “Рапполово”, Ленинградская об-

ласть) методом тонометрии с использованием прибора TonoVet (Финляндия) [16]. Исследования соединений производили по методике Marcus et al. [17]. Производные азолопиримидинов (III–V), (VIII), (IX) и (XI) закапывали в правый (тестовый) глаз лабораторного животного в концентрации 0.2% однократно в объеме 50 мкл, а в левый глаз — деионизированную воду в том же объеме. В качестве препаратов сравнения использовали 0.5%-ные глазные капли тимолол (Тимолол-СОЛОфарм; Гротекс, Россия) и 0.1%-ные глазные капли бримонидин (Сантисбрим; Сентисс Фарма Пвт. Лтд., Индия) с доказанным ВГД-снижающим действием, применяемые в клинической практике. Препараты сравнения также закапывали в правый (тестовый глаз) лабораторных животных в объеме 50 мкл, в левый глаз — деионизированную воду в том же количестве. Левый глаз, в свою очередь, служил для оценки возможного системного воздействия исследуемых соединений. Измерение ВГД проводили в пяти временных точках (0, 30, 60, 120, 180 мин), где 0 мин — исходное значение. Наличие ВГД-снижающей активности оценивали по максимальному уменьшению ВГД от исходных значений.

Цитотоксичность соединений. Оценку цитотоксичности наиболее активных соединений (VIII), (IX) и (XI) проводили с помощью МТТ-теста [18] в модификации на клетках линии HepG2 (гепатоцеллюлярной карциномы человека) (ATCC® HB-8065™). Культивирование клеток проводили в полной ростовой среде F-12 (Gibco, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 1% пенициллина-стрептомицина (Gibco, США), 1% незаменимых аминокислот (NEAA) (Sigma-Aldrich, США), 2 мМ пирувата натрия (Sigma-Aldrich, США) в CO₂-инкубаторе Galaxy 170R (New Brunswick, Германия) при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. Соединения и наиболее широко используемый цитостатик сравнения доксорубин (Sigma-Aldrich, США) исследовали в диапазоне концентраций от 0.1–1.0 мМ с инкубацией в течение 48 ч. Жизнеспособность клеток, коррелирующую со способностью митохондриальных дегидрогеназ превращать МТТ-реагент (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) в формазан, определяли по данным оптической плотности при 555 нм (референсная длина волны 650 нм) с использованием планшетного ридера CLARIOstar (BMG LABTECH, США). Обработку данных и расчет LC₅₀ (концентрация, подавляющая жизнедеятельность клеток на 50% относительно интактного контроля) проводили с помощью программного обеспечения MARS Data Analysis Software (BMG LABTECH, США) и GraphPad Prism v.7.0 (GraphPad Software, США).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, были синтезированы шесть соединений ряда азолоазинов. На модели аденозинзависимого изменения хронотропного эффекта *in vitro* с использованием изолированных предсердий белых мышей показано, что с точки зрения сродства к аденозиновому рецептору A₁ наиболее выгоден 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидиновый (III) и тетразоло[1,5-*a*]пиримидиновый (IV), (V) скаффолд, тогда как 1,3,4-тиадиазоло[3,2-*a*]пиримидины (VIII), (IX) и 1,2,4-триазоло[5,1-*b*]пурин (XI) не проявили статистически значимого ингибирующего эффекта в отношении этого рецептора. С другой стороны, полученные 6-нитроазоло[1,5-*a*]пиримидины уступали препарату сравнения кофеину в сродстве к аденозиновому рецептору A₁, что свидетельствует о необходимости дальнейшей структурной модификации для создания более мощных ингибиторов. Обратная закономерность наблюдалась при исследовании офтальмогипотензивных свойств полученных гетероциклов: азоло[1,5-*a*]пиримидины (III–V) не оказывали влияния на внутриглазное давление крыс, в то время как тиадиазоло[3,2-*a*]пиримидины (VIII), (IX) и триазоло[5,1-*b*]пурин (XI) продемонстрировали гипотензивное действие. При этом при использовании соединения-лидера, 5-метил-8-(гидроксиэтил)триазоло[5,1-*b*]пурина (XI), офтальмотонус снижался на 34% через 3 ч, нежелательный резорбтивный эффект не наблюдался. Кроме того, в МТТ-тесте на линии клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 было показано, что гетероциклы, оказывающие влияние на ВГД, демонстрируют на 1–2 порядка меньшую цитотоксичность, чем препарат сравнения доксорубин.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № 075-15-2020-777).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования на животных были выполнены в соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств (под ред. А.Н. Миронова), часть первая. М.: Гриф и К, 2012.; Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей CETS 123 (Страсбург, 1986); Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chou S.F., Luo L.J., Lai J.Y. // Sci Rep. 2017. V. 7. P. 42344.
<https://doi.org/10.1038/srep42344>
2. Нероев В.В., Киселева О.А., Бессмертный А.М. // Российский офтальмологический журнал. 2013. Т. 6. № 3. С. 4–7.
3. Национальное руководство по глаукоме: для практикующих врачей (3-е изд., испр. и доп.) / Под ред. Егорова Е.А., Астахова Ю.С., Еричева В.П. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2015. 456 с.
4. Rao P.V., Pattabiraman P.P., Kopczynski C. // Exp. Eye Res. 2017. V. 158. P. 23–32.
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.08.023>
5. Guglielmi P., Carradori S., Campestre C., Poce G. // Exp. Opin. Therap. Pat. 2019. V. 29. P. 769–780.
<https://doi.org/10.1080/13543776.2019.1653279>
6. Kvanta A., Seregard S., Sejersen S., Kull B., Fredholm B.B. // Exp. Eye Res. 1997. V. 165. P. 595–602.
<https://doi.org/10.1006/exer.1996.0352>
7. Li A., Leung C.T., Peterson-Yantorno K., Daniel Stamer W., Civan M.M. // Invest. Ophthalmol. Visual Sci. 2011. V. 52. P. 7996–8005.
<https://doi.org/10.1167/jovs.11-8170>
8. Avila M.Y., Stone R.A., Civan M.M. // Br. J. Pharmacol. 2001. V. 134. P. 241–245.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704267>
9. Agarwal R., Agarwal P. // Exp. Opin. Therap. Targ. 2014. V. 18. P. 527–539.
<https://doi.org/10.1517/14728222.2014.888416>
10. Savateev K.V., Ulomsky E.N., Butorin I.I., Charushin V.N., Rusinov V.L., Chupakhin O.N. // Russ. Chem. Rev. 2018. V. 87. P. 636–669.
<https://doi.org/10.1070/RCR4792>
11. Savateev K.V., Ulomsky E.N., Borisov S.S., Voinkov E.K., Fedotov V.V., Rusinov V.L. // Chem. Heterocycl. Comp. 2014. V. 50. P. 880–887.
<https://doi.org/10.1007/s10593-014-1542-z>
12. Savateev K.V., Fedotov V.V., Ulomskiy E.N., Rusinov V.L. // Chem. Heterocycl. Comp. 2018. V. 54. P. 197–204.
<https://doi.org/10.1007/s10593-018-2254-6>
13. Savateev K., Fedotov V., Butorin I., Eltsov O., Slepukhin P., Ulomsky E., Rusinov V., Litvinov R., Babkov D., Khokhlacheva E., Radaev P., Vassilie P., Spasov A. // Eur. J. Med. Chem. 2020. V. 185. P. 111808.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111808>
14. Spasov A.A., Babkov D.A., Sysoeva V.A., Litvinov R.A., Shamshina D.D., Ulomsky E.N., Savateev K.V., Fedotov V.V., Slepukhin P.A., Chupakhin O.N., Charushin V.N., Rusinov V.L. // Archiv der Pharmazie. 2017. V. 350. P. 1700226.
<https://doi.org/10.1002/ardp.201700226>
15. Бригадирова А.А., Агацарская Я.В., Салихов Д.А., Нагих А.С. // Вестник ВолгГМУ. 2019. Т. 70. С. 55–57.
[https://doi.org/10.19163/1994-9480-2019-2\(70\)-55-57](https://doi.org/10.19163/1994-9480-2019-2(70)-55-57)
16. Pease M.E., Hammond J.C., Quigley H.A. // J. Glaucoma. 2006. V. 15. P. 512–519.
<https://doi.org/10.1097/01.ijg.0000212276.57853.19>
17. Marcus A.J., Iezhitsa I., Agarwal R., Vassiliev P., Spasov A., Zhukovskaya O., Anisimova V., Mohd Ismail N. // Data Brief. 2018. V. 18. P. 523–554.
<https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.03.019>
18. Яковлев Д.С., Султанова К.Т., Золотова Е.А., Гасайниева А.Г., Спасов А.А. // Волгоград. науч.-мед. журн. 2020. № 1. С. 58–61.
<https://doi.org/10.24412/1995-7225-2020-1-58-61>

Nitroazolopyrimidines: Effects on A1 Adenosine Receptor and Intraocular Pressure on Rats

K. V. Savateev*, V. L. Rusinov*, S. K. Kotovskaya*, A. A. Spasov***, L. V. Naumenko**, A. S. Taran***, A. A. Brigadirova**, D. S. Yakovlev***, K. T. Sultanova***, and N. M. Shcherbakova**

*E-mail: i-krafttt@yandex.ru

*Ural Federal University named after the First President of Russia B.N. Eltsin, ul. Mira 19, Yekaterinburg, 620002 Russia

**Volograd State Medical University, pl. Pavshikh Bortsov 1, Volgograd, 400131 Russia

***Volograd Medical Research Center, pl. Pavshikh Bortsov 1, Volgograd, 400131 Russia

A few compounds of the 5(7)-alkylamino-6-nitroazolopyrimidine and 8-alkylazolo[5,1-*b*]purine series were selected based on the structural analysis of A₁ adenosine receptor inhibitors and role of this biological target in the modulation of intraocular pressure which is an important factor in the pathogenesis of glaucoma. In this paper we synthesized six compounds of the 5(7)-alkylamino-6-nitroazolopyrimidine and 8-alkylazolo[5,1-*b*]purine series. It has been shown that these heterocycles possess low affinity towards A₁ adenosine receptor in a model of adenosine-dependent changes in chronotropic effect *in vitro* on isolated atria of white mice. On the other hand, thiadiazolo[3,2-*a*]pyrimidines and triazolo[5,1-*b*]purine have shown hypotensive effect *in vivo* at rats: the leader compound (5-methyl-8-(hydroxyethyl)triazolo[5,1-*b*]purine) (0.2% solution) resulted in a 34% reduction in ophthalmotonus after 3 hours, while no undesirable resorptive effect was observed. In addition, heterocycles that affect IOP have been shown to exhibit 1–2 order less cytotoxicity than reference compound doxorubicin by MTT-test on the human HepG2 cell line.

Keywords: azolopyrimidines, azolopurines, adenosine receptors, adenosine, intraocular pressure, glaucoma



УДК 547.461.3:615.212

НОВЫЕ ГИБРИДНЫЕ МОЛЕКУЛЫ НА ОСНОВЕ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ НИКОТИНОНИТРИЛОВ: СИНТЕЗ, АНАЛЬГЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ *in vivo* В ТЕСТЕ УКСУСНОКИСЛЫХ КОРЧЕЙ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ¹

© 2022 г. Д. С. Кривоколыско*, В. В. Доценко**, ***, #, Е. Ю. Бибик*, А. А. Самокиш*, Ю. С. Венидиктова*, К. А. Фролов****, С. Г. Кривоколыско****, А. А. Панков****, Н. А. Аксенов***, И. В. Аксенова***

*Луганский государственный медицинский университет имени Святителя Луки, ЛНР, Украина, 91045 Луганск, кв. 50-летия Оборона Луганска, 1г

**Кубанский государственный университет, Россия, 350040 Краснодар, ул. Ставропольская, 149

***Северо-Кавказский федеральный университет, Россия, 355009 Ставрополь, ул. Пушкина, 1-А

****Луганский государственный университет им. Владимира Даля, ЛНР, Украина, 91034 Луганск, кв. Молодежный, 20-А/7

Поступила в редакцию 23.08.2021 г.

После доработки 22.09.2021 г.

Принята к публикации 26.09.2021 г.

Синтезированы новые гибридные молекулы, содержащие фурановый и 1,4-дигидроникотинонитрильный (либо 1,4,5,6-тетрагидроникотинонитрильный) фрагменты. Проведено исследование аналгетической активности *in vivo* на крысах в тесте уксуснокислых корчей. Выявлены соединения, активность которых превосходит таковую для референтного препарата (метамизол натрия). Для всех соединений проведен молекулярный докинг к циклооксигеназе-1 и циклооксигеназе-2, а также докинг с целью поиска наиболее вероятных протеиновых мишеней.

Ключевые слова: никотинонитрилы, 1,4-дигидропиридины, 1,4,5,6-тетрагидропиридины, аналгетики, молекулярный докинг

DOI: 10.31857/S0132342322030101

ВВЕДЕНИЕ

В современном мире особое внимание уделяется хроническому болевому синдрому, который часто возникает как следствие различных патологических процессов. Так, боль — неотъемлемый спутник более чем у 60% онкологических больных, особенно при наличии распространенного опухолевого процесса [1–3]. Среди существующих в настоящее время лекарственных средств нестероидного происхождения наиболее мощной противовоспалительной активностью обладают индометацин, кеторолак, ибупрофен и диклофенак [4–6]. Однако вызываемая ими гастропатия в ряде случаев ограничивает длительное применение этих препаратов (см., например, работу Vargassi et al. [7]). По этой причине на сегодняшний

день остро стоит вопрос разработки, исследования и введения в клиническую практику новых высокоэффективных, безопасных и доступных низкомолекулярных аналгетиков нового поколения [8–10]. Особый интерес с этой точки зрения представляют частично насыщенные производные никотинонитрила (3-цианопиридина) — синтетически доступные соединения, для которых недавно была выявлена высокая активность в отношении вирусов рода *Flavivirus* (вирус клещевого энцефалита, вирус Повассан [11]), выраженные противовоспалительные [12] и аналептические эффекты [13], адаптогенное [14] и аналгетическое действие [15]. Несмотря на достаточно хорошую изученность никотинонитрилов (обзорные работы [16–19]), частично гидрированные аналоги исследованы в недостаточной мере, особенно в плане их биологической активности.

В последние годы весьма популярное направление дизайна лекарственных средств — синтез так называемых гибридных, или мультимодальных, молекул [20–25]. Данная концепция основана на соединении в одной молекуле фрагментов с различным фармакотерапевтическим профилем, связанных непосредственно либо через гибкий спейсер. Следствием такой “конъюгации” может

¹ Дополнительные материалы для этой статьи доступны по doi 10.31857/S0132342322030101 для авторизованных пользователей.

Сокращения: НПВП — нестероидные противовоспалительные препараты; ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity) — фармакокинетические параметры: абсорбция, распределение, метаболизм, экскреция, токсичность; COX-1 — циклооксигеназа-1; COX-2 — циклооксигеназа-2.

Автор для связи: (эл. почта: victor_dotsenko@mail.ru).

быть усиление действия препарата за счет более эффективного связывания с протеиновой мишенью, возникновение новых видов активности, устранение побочных эффектов или снижение резистентности к препарату.

Цель настоящей работы — создание гибридных молекул, связывающих фармакофорные субъединицы — фрагменты частично гидрированного пиридинового цикла и 2-фурильный остаток, и изучение анальгетической активности полученных соединений *in vivo* в тесте уксуснокислых корчей. Частично насыщенные пиридиновые субъединицы относятся к группе привилегированных скаффолдов [26, 27]. Выбор фуранового фрагмента обусловлен биологической значимостью производных фурана [28–31] и препаративным удобством введения 2-фурильного заместителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Скрининг соединений. С использованием программных сервисов OSIRIS Property Explorer [32], SwissADME [33], admetSAR [34] и GUSAR [35] проведена оценка параметров ADMET (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity) и соответствия критериям биодоступности для базы соединений из 170 синтезированных нами ранее новых серосодержащих производных 1,4-ди- и 1,4,5,6-тетрагидропиридинов, содержа-

щих 2-фурильный заместитель в положении 4 пиридинового цикла. Оценивались следующие параметры: молекулярная масса соединения, липофильность как *cLogP* — логарифм коэффициента распределения между *n*-октанолом и водой $\log(c_{\text{octanol}}/c_{\text{water}})$, TPSA (топологическая полярная площадь поверхности), число акцепторов и доноров водородных связей, растворимость ($\log S$), ряд токсикологических характеристик (расчетный мутагенный потенциал по Эймсу, острая токсичность и др.), возможность гастроинтестинальной абсорбции и проникновения через гематоэнцефалический барьер, общая оценка фармакологического потенциала соединения (drug score) (см. дополнительные материалы, табл. S1 и S2). По результатам анализа из библиотеки были отобраны пять соединений (I–V) (схема 1), которые по большей части соответствуют критериям пероральной биодоступности, не обнаруживают прогнозируемого риска токсичных эффектов и имеют достаточно высокие предсказанные значения показателя фармакологического потенциала соединения (drug score). Расчетная оценка острой токсичности позволяет отнести соединения (I–V) к IV и V классам опасности согласно критериям OECD [36]. С помощью онлайн-сервиса Swiss Target Prediction [37, 38] также проведена предварительная оценка биомишеней.

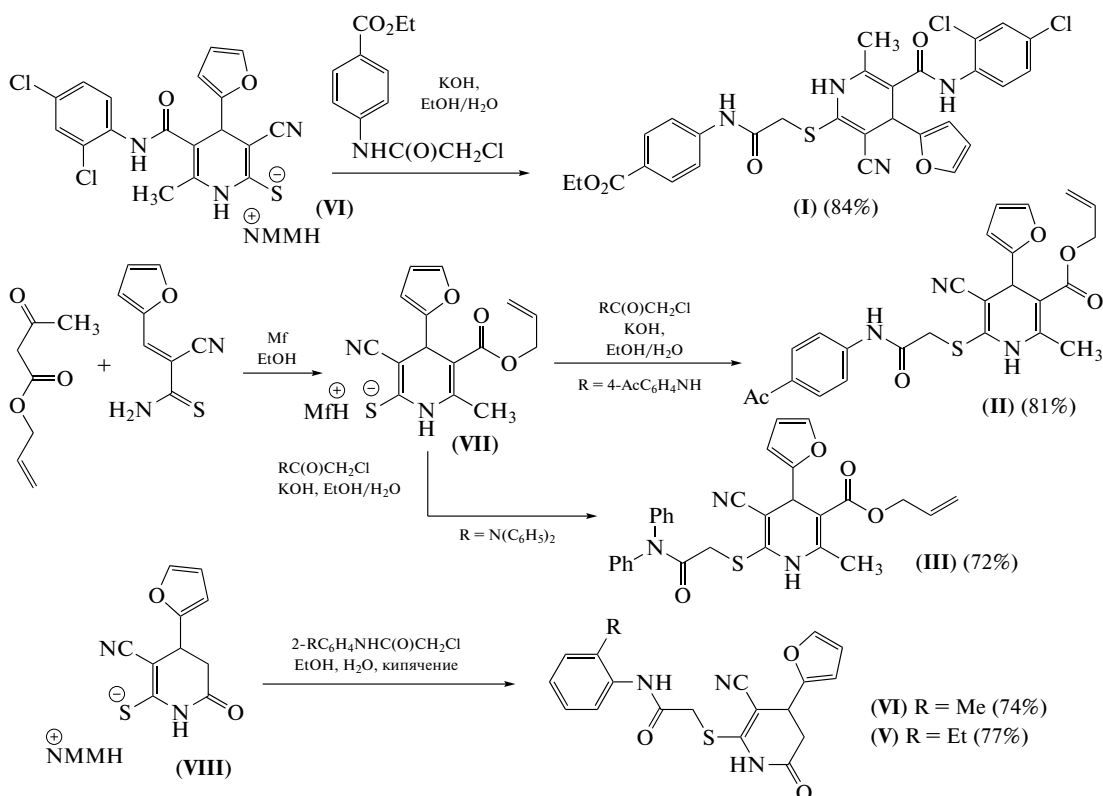


Схема 1. Синтез 4-(2-фурил)-1,4-дигидропиридин-3-карбонитрилов (I–III) и 4-(2-фурил)-1,4,5,6-тетрагидропиридин-3-карбонитрилов (IV) и (V). NMM — *N*-метилморфолин, Mf — морфолин.

Отобранные с помощью программ виртуального биоскрининга пять образцов серосодержащих ди- и тетрагидропиридинов наиболее перспективны с учетом предполагаемых биомишеней для фармакокоррекции болевого синдрома. Возможными мишенями для соединений (I–V), по предварительным оценкам, могут быть циклооксигеназы COX-1 и COX-2.

Синтез соединений (I–V). Исходный 6-метил-4-(2-фурил)-5-[(2,4-дихлорфенил)карбамоил]-3-циано-1,4-дигидропиридин-2-тиолат *N*-метилморфолина (VI), необходимый для получения соединения (I), был синтезирован по общей процедуре, описанной в работах [39–41] (схема 1). Соединение (I) синтезировано последующим *S*-алкилированием исходного тиолата (VI) *N*-хлорацетильным производным бензокаина в водно-спиртовой среде в присутствии 10%-ного раствора КОН. Необходимый для получения 1,4-дигидроникотинитрилов (II) и (III) 5-[(аллилокси)карбонил]-6-метил-4-(2-фурил)-3-циано-1,4-дигидропиридин-2-тиолат морфолина (VII) был получен по описанным в литературе процедурам [42, 43]. Серосодержащие дигидропиридины (II) и (III) были получены алкилированием тиолата (VII) соответствующими α -хлорацетамидами. При нагревании 1,4,5,6-тетрагидропиридин-2-тиолата (VIII) [44–46] в водном спирте с *орто*-*R*-замещенными хлорацетанилидами получали целевые соединения (IV) и (V) (схема 1).

Строение соединений (I–V) подтверждено данными ИК- и ЯМР-спектроскопии на ядрах ^1H и ^{13}C . Данные спектров приведены в дополнительных материалах.

Альгетическая активность соединений (I–V) *in vivo* в тесте уксуснокислых корчей. Определение альгетической активности соединений проводили на модели уксуснокислых корчей, основанной на сокращении абдоминальной мускулатуры вследствие раздражения серозной оболочки введенным внутрибрюшинно раствором уксусной

кислоты. Критерием альгетической активности в этом тесте считается достоверное уменьшение числа корчей в получавшей лекарственное средство группе животных относительно контрольной группы при условии отсутствия у соединения миорелаксанта действия [47, 48].

Опыты проводили на половозрелых крысах-самцах ($n = 70$) в осенне-зимний период согласно рекомендациям [49–51]. Крыс разделили на семь групп ($n = 10$): контрольную (с моделируемой перитонвисцеральной болью без фармакокоррекции), референтную (группа сравнения – аналгин) и пять опытных групп по количеству исследуемых соединений (I–V). Крысам референтной группы вводили аналгин (7 мг/кг), животным опытных групп – соединения (I–V) (внутрижелудочно, 5 мг/кг) за 1.5 ч до введения альгогена. Альгоген (уксусную кислоту) вводили внутрибрюшинно в объеме 1.0 мл 7%-ного раствора однократно [47–49], через 20 мин подсчитывали число уксуснокислых корчей за 15-минутный интервал.

Полученные экспериментальные данные, зафиксированные в процессе наблюдения за подопытными животными контрольной группы, в цифровом выражении по количеству уксуснокислых корчей приведены в табл. 1. Так, результаты анализа полученного массива данных показали, что спустя 20 мин после внутрибрюшинного введения 1 мл 7%-ной уксусной кислоты крысы начинали оттягивать задние конечности кзади, переднюю брюшную стенку они прижимали ко дну клетки. При этом все крысы этой группы испытывали жажду. На протяжении 15 мин наблюдения количество уксуснокислых корчей составило 23.0. Использование нестероидного противовоспалительного препарата (НПВП) метамизола натрия (анальгина) (референтная группа) за 1.5 ч до инъекции альгогена (раствора уксусной кислоты) способствовало уменьшению числа корчей на 8.7% (до 21.0).

Таблица 1. Дисперсионный анализ показателей альгетической активности соединений (I–V) *in vivo* на крысах в тесте уксуснокислых корчей

Группа животных	Доза, мг/кг	Среднее арифметическое, $\bar{a}$	Дисперсия, σ^2	Среднеквадратичное отклонение, σ	Коэффициент вариации, V
Контроль	—	23.0	2.22	1.49	6.48
Аналгин	7	21.0	1.78	1.33	6.35
(I)	5	18.8	0.84	0.91	4.89
(II)	5	14.9	0.99	0.99	6.70
(III)	5	17.6	1.15	1.07	6.11
(IV)	5	15.3	0.9	0.95	6.20
(V)	5	10.3	1.34	1.16	11.26

Примечание: животным контрольной группы вводили 1 мл 7%-ного раствора уксусной кислоты внутрибрюшинно.

Как видно из приведенных в табл. 1 данных, все исследуемые соединения (I–V), вводимые внутригастрально, способны уменьшать число укусно-кислых корчей у крыс опытных групп после внутрибрюшинной инъекции 1 мл 7%-ного раствора уксусной кислоты в большей степени, чем препарат сравнения. Так, у лабораторных животных, получавших соединение (I) за 90 мин до введения алгогена, установлено уменьшение укусно-кислых корчей в сравнении с контрольной группой крыс на 18.3%. В опытной группе животных, получавших с целью фармакокоррекции острого болевого синдрома 1,4-дигидропиридин (III), выявлено снижение укусно-кислых корчей на 23.5% в сравнении с крысами контрольной группы. Тетрагидропиридин (IV) еще более эффективен как анальгетик – в этой группе зарегистрировано снижение изучаемого количественного показателя на 33.5% в сравнении с крысами контрольной группы без фармакокоррекции (эффективнее анальгина на 27.1%).

Наиболее значимые результаты в эксперименте были зарегистрированы в опытных группах крыс, получавших 1,4-дигидроникотинитрил (II) и тетрагидроникотинитрил (V). Соединение (II), содержащее в своей структуре фрагмент *пара*-аминобензойной кислоты, способно на 35.2% уменьшать число укусно-кислых корчей при сопоставлении с показателями в контрольной группе. Сравнение с крысами референтной группы показало, что соединение (II) в 1.4 раза эффективнее анальгина устраняет острый болевой синдром. Введение соединения (V) привело к уменьшению числа укусно-кислых корчей на 55.2% по сравнению с контрольной группой. При этом его анальгетическая активность превышает таковую у анальгина в 2.04 раза.

Молекулярный докинг. Молекулярный докинг соединений (I–V) проводили с использованием веб-сервиса Webina 1.0.3 (<https://durrant-lab.pitt.edu/webina/>) – онлайн-приложения для запуска AutoDock Vina в браузере [52]. Кристаллографические модели целевых белков – циклооксигеназ COX-1 (PDB ID 1HT5) и COX-2 (PDB ID 1CX2) – были взяты из Protein Data Bank (www.rcsb.org) и подготовлены с использованием Autodock Tools (<https://autodock.scripps.edu/>). В качестве соединений сравнения использовали НПВП из группы неселективных ингибиторов COX-1 (ибупрофен, диклофенак, индометацин, кеторолак, аспирин), а также селективных ингибиторов COX-2 (мелоксикам, нимесулид, вальдекоксиб). 3D-структуры препаратов сравнения были взяты из базы Drugbank (<https://go.drugbank.com/>). В табл. 2 приведены значения рассчитанных скоринг-функций связывания соединений (I–V) и референтных препаратов с активными сайтами циклооксигеназ COX-1 и COX-2.

Исходя из результатов, приведенных в табл. 2, наибольшую аффинность к циклооксигеназам COX-1 и COX-2 проявляют соединения (I), (III) и (V). При этом все соединения (I–V) обнаруживают большее сродство к COX-1 и COX-2 в сравнении с НПВП из числа неселективных ингибиторов COX-1. Селективные ингибиторы COX-2 из числа референтных соединений (особенно мелоксикам) показывают большую аффинность к COX-2, нежели исследуемые соединения, тогда как для COX-1 результаты можно считать сопоставимыми.

С целью определения других возможных протеиновых мишеней для соединений (I–V) был проведен поиск с использованием нового протокола протеин-лигандного докинга GalaxySagittarius [53] на базе веб-сервера GalaxyWeb [54, 55]. 3D-структуры соединений были предварительно оптимизированы средствами молекулярной механики в силовом поле MM2 для выбора геометрии, соответствующей минимуму энергии. Молекулярный докинг с использованием протокола GalaxySagittarius проводили в режимах Binding compatability prediction и Re-ranking using docking. В табл. S3 (см. дополнительные материалы) представлены результаты докинга по каждому из соединений (I–V) для 20 комплексов “протеин–лиганд” с минимальным значением свободной энергии связывания ΔG_{bind} и наилучшей итоговой оценкой протеин-лигандного взаимодействия. Прогнозируемые протеиновые мишени указаны с помощью ID-идентификаторов в Protein Data

Таблица 2. Значения скоринг-функций для соединений (I–V) и препаратов сравнения

Соединение	Рассчитанное значение скоринг-функций, ккал/моль	
	COX-1 (PDB ID 1HT5)	COX-2 (PDB ID 1CX2)
(I)	–10.1	–7.3
(II)	–8.2	–6.6
(III)	–9.4	–7.0
(IV)	–8.9	–6.8
(V)	–9.0	–7.2
Анальгин	–7.7	–6.3
Ибупрофен	–6.4	–5.9
Диклофенак	–7.1	–6.1
Индометацин	–9.2	–7.4
Кеторолак	–7.2	–6.5
Аспирин	–5.7	–6.1
Мелоксикам	–9.6	–9.7
Нимесулид	–8.2	–9.0
Вальдекоксиб	–8.5	–8.5

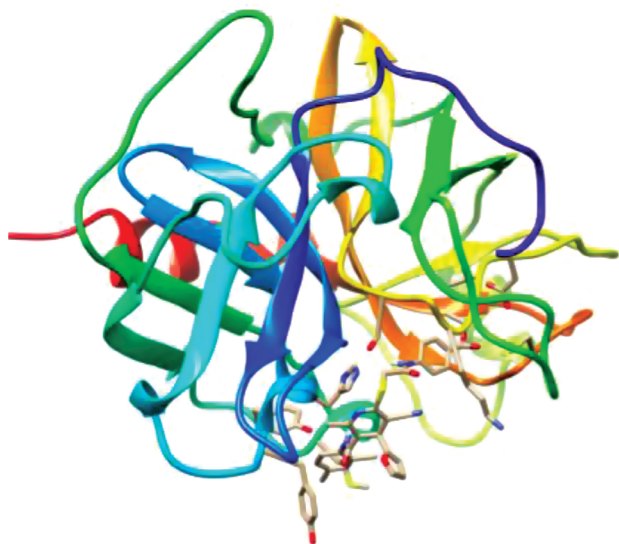


Рис. 1. Прогнозируемая структура протеин-лигандного комплекса дигидропиридина (I) и фактора свертывания крови XIa (PDB ID 4X6O).

Bank (PDB) и в базе данных UniProt. В целом можно отметить, что общие мишени для соединений (I–V) – фактор свертывания крови Ха (PDB ID 2P95), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR, PDB ID 3BEL), активируемый пероксисомными пролифераторами рецептор-гамма (hPPARgamma, PDB ID 2VV0), рецептор-1 свободных жирных кислот (GPR40, PDB ID 5TZR), X-рецептор печени (LXRβ, PDB ID 5JY3) и ряд других. Тетрагидропиридины (IV) и (V) – вероятные лиганды для протеинкиназы A (PDB ID

4UJA), первого бромодомена бромодомен-содержащего белка 4 (BRD4, PDB ID 5D3S), мутантной Bcr-Abl^{T315I} тирозинкиназы (PDB ID 4TWP), играющей ключевую роль в патогенезе хронического миелоидного лейкоза, а также для тирозин-протеинкиназы ITK (PDB ID 4PQN). Следует отметить более высокое сродство к протеиновым мишеням производных 1,4-дигидропиридина (I–III) в сравнении с 1,4,5,6-тетрагидропиридинами (IV) и (V). На рис. 1 и 2 представлены 3D-визуализации отдельных комплексов “лиганд–рецептор” для соединений (I) и (V).

В целом по результатам докинга соединения (I–V) представляют интерес для дальнейшего скрининга с целью поиска антитромботических, противоопухолевых агентов, средств для лечения аутоиммунных заболеваний.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование и общие условия идентификации соединений. Спектры ЯМР ¹H и ¹³C регистрировали на спектрометре 400/MR (Agilent, США; 400 и 100 МГц соответственно) в растворе ДМСО-*d*₆, в качестве стандарта использовали остаточные сигналы растворителя (δ 2.49, 39.50 м.д., ДМСО). ИК-спектры получали на спектрофотометре Vertex 70 (Bruker, Германия) с приставкой НПВО на кристалле алмаза, погрешность ± 4 см^{–1}. Элементный анализ проводили на приборе Elementar Vario Microcube (Elementar, Германия). Индивидуальность полученных образцов контролировали методом ТСХ на пластинах Сорбфил-А (ООО “Имид”, Краснодар, Россия), элюент – аце-

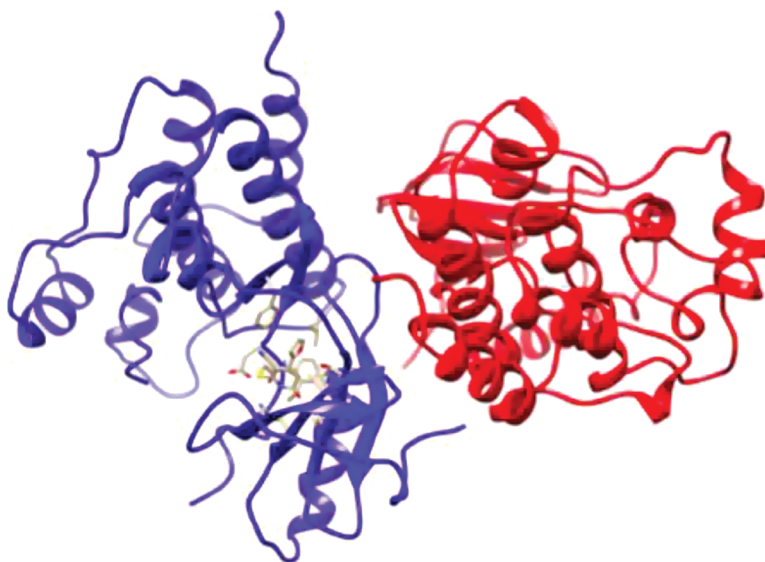


Рис. 2. Прогнозируемая структура протеин-лигандного комплекса тетрагидропиридина (V) и протоонкогенной серин-треониновой протеинкиназы B-raf (PDB ID 4MBJ).

тон—гексан, 1 : 1, проявитель — пары иода, УФ-детектор.

Этиловый эфир 4-(2-((6-метил-4-(2-фурил)-5-((2,4-дихлорфенил)карбамоил)-3-циано-1,4-дигидропиридин-2-ил)тио)ацетамидо)бензойной кислоты (I). 1,4-Дигидропиридин-2-тиолат *N*-метилморфолиния (VI) [41] (0.6 г, 1.18 ммоль) суспендировали в 5 мл EtOH, добавляли при перемешивании 0.65 мл (1.25 ммоль) 10%-ного водного КОН. Полученный раствор через бумажный фильтр прибавляли к теплomu (40–50°C) раствору этилового эфира 4-(2-хлорацетамидо)бензойной кислоты (0.29 г, 1.18 ммоль) в 3 мл EtOH. Смесь перемешивали и нагревали (40–50°C), в течение 5 мин образовывался осадок, который через 12 ч отфильтровывали, промывали водным EtOH и высушивали при 60°C. Белый порошок, выход 0.61 г (84%).

Аллиловые эфиры 6-[(2-(*R*-амино-2-оксоэтил)-тио]-2-метил-4-(2-фурил)-5-циано-1,4-дигидропиридин-3-карбоновой кислоты (II), (III). **Общая методика.** 1,4-Дигидропиридин-2-тиолат морфолиния (VII) [42, 43] (0.75 г, 1.93 ммоль) суспендировали в 8 мл EtOH, добавляли при перемешивании 1.0 мл (1.93 ммоль) 10%-ного водного КОН и перемешивали до растворения. Полученный раствор через бумажный фильтр медленно прибавляли к раствору соответствующего α -хлорацетамидо (1.95 ммоль) в EtOH (5–6 мл). Смесь перемешивали в течение 3 ч, осадок отфильтровывали, промывали водным EtOH и высушивали при 60°C.

Аллиловый эфир 6-[[2-(4-ацетилфенил)амино-2-оксоэтил]тио]-2-метил-4-(2-фурил)-5-циано-1,4-дигидропиридин-3-карбоновой кислоты (II). Белый порошок, выход 81%.

Аллиловый эфир 2-метил-6-[[2-(дифениламино)-2-оксоэтил]тио]-4-(2-фурил)-5-циано-1,4-дигидропиридин-3-карбоновой кислоты (III). Бежевый порошок, выход 72%.

2-[[6-Оксо-4-(2-фурил)-3-циано-1,4,5,6-тетрагидропиридин-2-ил]тио]-*N*-(2-*R*-фенил)ацетамиды (IV), (V). **Общая методика.** Тетрагидропиридин-2-тиолат *N*-метилморфолиния (VIII) [44–46] (0.5 г, 1.6 ммоль) растворяли при нагревании в 60%-ном EtOH (7 мл). Полученный раствор через бумажный фильтр добавляли к теплomu (40–50°C) раствору соответствующего *орто*-*R*-замещенного хлорацетанилида (1.6 ммоль) в EtOH (3–4 мл) при перемешивании. Выпавший осадок через 48 ч отфильтровывали, промывали 60%-ным EtOH и петролевым эфиром, высушивали при 60°C.

***N*-(2-Метилфенил)-2-[[6-оксо-4-(2-фурил)-3-циано-1,4,5,6-тетрагидропиридин-2-ил]тио]ацетамид (IV).** Бежевый порошок, выход 74%.

2-[[6-Оксо-4-(2-фурил)-3-циано-1,4,5,6-тетрагидропиридин-2-ил]тио]-*N*-(2-этилфенил)ацетамид (V). Бежевый порошок, выход 77%.

Данные спектров и элементного анализа соединений (I–V) приведены в дополнительных материалах.

Анальгетическое действие соединений (I–V) *in vivo* на крысах в тесте уксуснокислых корчей. Опыты проведены на белых беспородных крысах-самцах ($n = 70$) массой 220–250 г половозрелого возраста (6 месяцев) из вивария ГУ ЛНР “Луганский государственный медицинский университет имени Святителя Луки” в осенне-зимний период согласно рекомендациям [49–51]. Перед началом эксперимента проводили тщательный осмотр всех крыс, учитывали их вес, возраст, двигательную активность и состояние шерстяного покрова. Экспериментальные группы, состоящие из 10 крыс, формировали методом случайного отбора. Крысы были распределены на семь групп: контрольную (с моделируемой перитонвисцеральной болью без фармакокоррекции), референтную (группа сравнения — аналгин) и пять опытных групп по количеству исследуемых соединений (I–V). Альгоген (уксусную кислоту) вводили в объеме 1.0 мл 7%-ного раствора однократно, согласно классическим фармакологическим методикам [47–49]. В качестве препарата сравнения для референтной группы крыс использовали аналгин (метамизол натрия, ОАО “Фармстандарт”, Россия) в дозе 7 мг/кг. Соединения (I–V) вводили внутривентриально в дозе 5 мг/кг за 1.5 ч до введения используемого альгогена. Количественная экспериментальная характеристика в работе — число уксуснокислых корчей за 15-минутный интервал через 20 мин после введения альгогена (1.0 мл 7%-ного раствора уксусной кислоты внутривентриально).

Статистическую обработку полученных результатов проводили на основе рекомендаций [49–51] и по известным формулам и методам математической статистики, характеризующим количественную изменчивость. При обработке экспериментальных данных определяли следующие показатели: среднее арифметическое число чесательных движений $\bar{a}$, дисперсия значений σ^2 вокруг среднего арифметического, среднеквадратическое отклонение σ , коэффициент вариации V . Достоверность различий между референтной и опытными группами оценивали в сравнении с контрольной группой по *t*-тесту Стьюдента.

Молекулярный докинг. Молекулярный докинг к циклооксигеназам COX-1 и COX-2 выполняли с помощью сервиса Webina 1.0.3 (<https://durrant-lab.pitt.edu/webina/>), молекулярный докинг с целью поиска новых вероятных протеиновых мишеней — с использованием сервиса GalaxySagittarius [53] на базе веб-сервера GalaxyWeb [54, 55]. Молекулярную графику обрабатывали и визуализировали с использованием программного комплекса UCSF Chimera [56, 57].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В соответствии с критериями биодоступности и оценкой параметров ADMET из библиотеки 170 производных пиридина отобраны синтезированные нами в лаборатории “Химэкс” пять соединений — производные 4-(2-фурил)-1,4-дигидроникотинонитрила и 4-(2-фурил)-1,4,5,6-тетрагидроникотинонитрила. Исследовано *in vivo* анальгетическое действие указанных соединений в тесте уксуснокислых корчей на крысах. Все исследованные соединения проявили анальгетическую активность различных степеней выраженности, превышающую таковую у метамизола натрия. Анальгетическое действие тетрагидропиридина (V) более чем в 2 раза превышает таковое для препарата сравнения (анальгин). Проведен молекулярный докинг соединений по отношению к COX-1 и COX-2, а также докинг с целью поиска других вероятных мишеней. Результаты докинга показывают, что наибольшим сходством к активным центрам COX-1 и COX-2 обладают соединения (I), (III) и (V).

Новые соединения представляют интерес для дальнейших исследований в области поиска противовоспалительных средств и средств фармакотерапии болевого синдрома.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования проведены с использованием оборудования Научно-образовательного центра “Диагностика структуры и свойств наноматериалов” и оборудования Центра коллективного пользования “Эколого-аналитический центр” Кубанского государственного университета.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках научного проекта МФИ-20.1-26/20 (заявка № МФИ-20.1/45) и Министерства образования и науки Российской Федерации (тема 0795-2020-0031).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования проведены в соответствии с правилами качественной лабораторной практики при проведении доклинических исследований в России (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199н от 01.04.2016 г.), а также в соответствии с нормами и принципами Директивы Совета ЕС по вопросам защиты позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mitra R., Jones S. // *Am. J. Hospice Palliat. Med.* 2012. V. 29. P. 70–79.
<https://doi.org/10.1177/1049909111413256>
2. van den Beuken-van Everdingen M.H., de Graeff A., Jongen J.L., Dijkstra D., Mostovaya I., Vissers K.C., National Guideline Working Group “Diagnosis Treatment of Cancer Pain” // *Pain Practice.* 2017. V. 17. P. 409–419.
<https://doi.org/10.1111/papr.12459>
3. Magee D.J., Jhanji S., Poulogiannis G., Farquhar-Smith P., Brown M.R.D. // *Brit. J. Anaesth.* 2019. V. 123. P. e412–e423.
<https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.02.028>
4. Lucas S. // *Headache.* 2016. V. 56. P. 436–446.
<https://doi.org/10.1111/head.12769>
5. Wakai A., Lawrenson J.G., Lawrenson A.L., Wang Y., Brown M.D., Quirke M., Ghandour O., McCormick R., Walsh C.D., Amayem A., Lang E., Harrison N. // *Cochrane Database Syst. Rev.* 2017. CD009781.
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD009781.pub2>
6. Wiffen P.J., Xia J. // *Curr. Med. Res. Opin.* 2020. V. 36. P. 637–650.
<https://doi.org/10.1080/03007995.2020.1716703>
7. Varrassi G., Pergolizzi J.V., Dowling P., Paladini A. // *Adv. Therap.* 2020. V. 37. P. 61–82.
<https://doi.org/10.1007/s12325-019-01144-9>
8. Díaz-González F., Sánchez-Madrid F. // *Eur. J. Immunol.* 2015. V. 45. P. 679–686.
<https://doi.org/10.1002/eji.201445222>
9. Yousefifard M., Zali A., Zarghi A., Madani Neishaboori A., Hosseini M., Safari S. // *Int. J. Clin. Pract.* 2020. V. 74. P. e13557.
<https://doi.org/10.1111/ijcp.13557>
10. Machado G.C., Maher C.G., Ferreira P.H., Day R.O., Pinheiro M.B., Ferreira M.L. // *Ann. Rheumat. Diseases.* 2017. V. 76. P. 1269–1278.
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-210597>
11. Osolodkin D.I., Kozlovskaya L.I., Dueva E.V., Dotsenko V.V., Rogova Y.V., Frolov K.A., Krivokolysko S.G., Romanova E.G., Morozov A.S., Karganova G.G., Palyulin V.A., Pentkovskiy V.M., Zefirov N.S. // *ACS Med. Chem. Lett.* 2013. V. 4. P. 869–874.
<https://doi.org/10.1021/ml400226s>
12. Бибик Е.Ю., Ярошевская О.Г., Девдера А.В., Деменко А.В., Захаров В.В., Фролов К.А., Доценко В.В., Кривоколыско С.Г. // *Хим.-фарм. журн.* 2017. Т. 51. С. 16–19. [Bibik E.Yu., Yaroshevskaya O.G., Devdera A.V., Demenko A.V., Zakharov V.V., Frolov K.A., Dotsenko V.V., Krivokolysko S.G. // *Pharm. Chem. J.* 2017. V. 51. P. 648–651.]
<https://doi.org/10.1007/s11094-017-1669-1>
13. Bibik E.Yu., Saphonova A.A., Yeryomin A.V., Frolov K.A., Dotsenko V.V., Krivokolysko S.G. // *Res. Results Pharmacol.* 2017. V. 3. P. 20–25.
<https://doi.org/10.18413/2313-8971-2017-3-4-20-25>
14. Бибик Е.Ю., Некраса И.А., Деменко А.В., Фролов К.А., Доценко В.В., Кривоколыско С.Г. // *Бюлл. сиб. мед.* 2019. Т. 18. С. 21–28. [Bibik E.Yu., Nekrasa I.A., Demenko A.V., Frolov K.A., Dotsenko V.V., Krivokolysko S.G. // *Bull. Sib. Med.* 2019. V. 18. P. 21–28.]
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-3-21-28>

15. Bibik I.V., Bibik E.Yu., Dotsenko V.V., Frolov K.A., Krivokolysko S.G., Aksenov N.A., Aksenova I.V., Shcherbakov S.V., Ovcharov S.N. // *Russ. J. Gen. Chem.* 2021. V. 91. P. 154–166.
<https://doi.org/10.1134/S107036322102002X>
16. Litvinov V.P. // *Russ. Chem. Rev.* 2006. V. 75. P. 577–599.
<https://doi.org/10.1070/RC2006v075n07ABEH003619>
17. Salem M.A., Helel M.H., Gouda M.A., Ammar Y.A., El-Gaby M.S.A. // *Synth. Commun.* 2018. V. 48. P. 345–374.
<https://doi.org/10.1080/00397911.2017.1394468>
18. Gouda M.A., Hussein B.H., Helal M.H., Salem M.A. // *J. Heterocycl. Chem.* 2018. V. 55. P. 1524–1553.
<https://doi.org/10.1002/jhet.3188>
19. Gouda M.A., Attia E., Helal M.H., Salem M.A. // *J. Heterocycl. Chem.* 2018. V. 55. P. 2224–2250.
<https://doi.org/10.1002/jhet.3298>
20. Decker M. // *Mini Rev. Med. Chem.* 2007. V. 7. P. 221–229.
<https://doi.org/10.2174/138955707780059817>
21. Shaveta, Mishra S., Singh P. // *Eur. J. Med. Chem.* 2016. V. 124. P. 500–536.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.039>
22. Auti P.S., George G., Paul A.T. // *RSC Adv.* 2020. V. 10. P. 41353–41392.
<https://doi.org/10.1039/d0ra06642g>
23. Ivasiv V., Albertini C., Gonçalves A.E., Rossi M., Bolognesi M.L. // *Curr. Top. Med. Chem.* 2019. V. 19. P. 1694–1711.
<https://doi.org/10.2174/1568026619666190619115735>
24. Prasher P., Sharma M., Aljabali A.A.A., Gupta G., Negi P., Kapoor D.N., Singh I., Zacconi F.C., de Jesus Andreoli Pinto T., da Silva M.W., Bakshi H.A., Chellappan D.K., Tambuwala M.M., Dua K. // *Drug Dev. Res.* 2020. V. 81. P. 837–858.
<https://doi.org/10.1002/ddr.21704>
25. Panda P., Chakroborty S. // *ChemistrySelect.* 2020. V. 5. P. 10187–10199.
<https://doi.org/10.1002/slct.202002790>
26. Yet L. // *Privileged Structures in Drug Discovery: Medicinal Chemistry and Synthesis*, 1st ed. JohnWiley & Sons Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2018.
27. Welsch M.E., Snyder S.A., Stockwell B.R. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2010. V. 14. P. 347–361.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.02.018>
28. Lukevits É., Demicheva L. // *Chem. Heterocycl. Compd.* 1993. V. 29. P. 243–267.
<https://doi.org/10.1007/BF00531499>
29. Barros M.R., Menezes T.M., da Silva L.P., Pires D.S., Princival J.L., Seabra G., Neves J.L. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. V. 136. P. 1034–1041.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.120>
30. Chiurchiù E., Gabrielli S., Ballini R., Palmieri A. // *Molecules.* 2019. V. 24. P. 4575.
<https://doi.org/10.3390/molecules24244575>
31. Ali H., Jabeen A., Maharjan R., Nadeem-ul-Haque M., Aamra H., Nazir S., Khan S., Olleik H., Maresca M., Shaheen F. // *Biomolecules.* 2020. V. 10. P. 1684.
<https://doi.org/10.3390/biom10121684>
32. Sander T. // *OSIRIS Property Explorer*.
<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>
33. Daina A., Michielin O., Zoete V. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 42717.
<https://doi.org/10.1038/srep42717>
34. Cheng F., Li W., Zhou Y., Shen J., Wu Z., Liu G., Lee P.W., Tang Y. // *J. Chem. Inf. Model.* 2012. V. 52. P. 3099–3105.
<https://doi.org/10.1021/ci300367a>
35. Lagunin A., Zakharov A., Filimonov D., Poroikov V. // *Mol. Inform.* 2011. V. 30. P. 241–250.
<https://doi.org/10.1002/minf.201000151>
36. OECD Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 24 // *Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing*. Paris: OECD, 2001. [https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mo-no\(2001\)4&doclanguage=en](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mo-no(2001)4&doclanguage=en)
37. Daina A., Michielin O., Zoete V. // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. P. W357–W364.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz382>
38. Swiss Target Prediction. <http://www.swisstargetprediction.ch/>
39. Кривоколыско С.Г., Дяченко В.Д., Литвинов В.П. // *Журн. орг. химии.* 1997. Т. 33. С. 1088–1093. [Krivokolysko S.G., Dyachenko V.D., Litvinov V.P. // *Russ. J. Org. Chem.* 1997. V. 33. P. 1018–1023.]
40. Дяченко В.Д., Кривоколыско С.Г., Литвинов В.П. // *Журн. орг. химии.* 1998. Т. 34. С. 927. [Dyachenko V.D., Krivokolysko S.G., Litvinov V.P. // *Russ. J. Org. Chem.* 1998. V. 34. P. 876–881.]
41. Osolodkin D.I., Kozlovskaya L.I., Dueva E.V., Dotsenko V.V., Rogova Y.V., Frolov K.A., Krivokolysko S.G., Romanova E.G., Morozov A.S., Karganova G.G., Palyulin V.A., Pentkovski V.M., Zefirov N.S. // *ACS Med. Chem. Lett.* 2013. V. 4. P. 869–874.
<https://doi.org/10.1021/ml400226s>
42. Калашиник И.Н., Дяченко В.Д. // *Журн. общ. химии.* 2020. Т. 90. С. 371–381. [Kalashnik I.N., Dyachenko V.D. // *Russ. J. Gen. Chem.* 2020. V. 90. P. 357–366.]
<https://doi.org/10.1134/S10703632200030068>
43. Дяченко В.Д. // *Журн. орг. химии.* 2007. Т. 43. С. 278–282. [Dyachenko V.D. // *Russ. J. Org. Chem.* 2007. V. 43. P. 271–275.]
<https://doi.org/10.1134/S1070428007020194>
44. Dotsenko V.V., Frolov K.A., Pekhtereva T.M., Papaianina O.S., Suykov S.Y., Krivokolysko S.G. // *ACS Comb. Sci.* 2014. V. 16. P. 543–550.
<https://doi.org/10.1021/co5000807>
45. Dotsenko V.V., Lebedeva I.A., Krivokolysko S.G., Povstyanov M.V., Povstyanov V.M., Kostyrko E.O. // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2012. V. 48. P. 462–469.
<https://doi.org/10.1007/s10593-012-1016-0>
46. Dotsenko V.V., Bushmarinov I.S., Goloveshkin A.S., Chigorina E.A., Frolov K.A., Krivokolysko S.G. // *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* 2017. V. 192. P. 47–52.
<https://doi.org/10.1080/10426507.2016.1224877>
47. Koster R.M., Anderson M., De Beer E.J. // *Fedn. Proc.* 1959. V. 18. P. 412–417.
48. Collier H.O.J., Dinneen L.C., Johnson C.A., Schneider C. // *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 1968. V. 32. P. 295–310.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1968.tb00973.x>

49. Миронов А.Н. // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К., 2012. 941 с.
50. Наркевич А.Н., Виноградов К.А. // Соц. аспекты здоровья населения. 2019. Т. 65. № 6. С. 10.
51. Агаянц И.М. // Азы статистики в мире химии: обработка экспериментальных данных. Санкт-Петербург: НОТ, 2015. 618 с.
52. Kochnev Y., Hellemann E., Cassidy K.C., Durrant J.D. // *Bioinformatics*. 2020. V. 36. P. 4513–4515. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa579>
53. Yang J., Kwon S., Bae S.H., Park K.M., Yoon C., Lee J.H., Seok C. // *J. Chem. Inf. Model*. 2020. V. 60. P. 3246–3254. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c00104>
54. GalaxyWEB. A web server for protein structure prediction, refinement, and related methods. Galux Inc., Computational Biology Lab, Department of Chemistry, Seoul National University, S. Korea. <http://galaxy.seoklab.org/index.html>
55. Ko J., Park H., Heo L., Seok C. // *Nucleic Acids Res*. 2012. V. 40. P. W294–W297. <https://doi.org/10.1093/nar/gks493>
56. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. // *J. Comput. Chem*. 2004. V. 25. P. 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
57. UCSF Chimera – an Extensible Molecular Modeling System. <https://www.rbvi.ucsf.edu/chimera/>

New Hybrid Molecules Based on Sulfur-Containing Nicotinonitriles: Synthesis, Analgesic Activity in Acetic Acid Induced Writhing Test and Molecular Docking Studies

D. S. Krivokolysko*, V. V. Dotsenko, ***, #, E. Yu. Bibik*, A. A. Samokish*,
Y. S. Venidiktova*, K. A. Frolov****, S. G. Krivokolysko****, A. A. Pankov****,
N. A. Aksenov***, and I. V. Aksenova*****

#E-mail: victor_dotsenko_@mail.ru

*St. Luka Lugansk State Medical University, kv. 50-Letiya Oborony Luganska 1G, Lugansk People's Republic, 91045 Ukraine

**Kuban State University, ul. Stavropolskaya 149, Krasnodar, 350040 Russia

***North-Caucasus Federal University, ul. Pushkina 1A, Stavropol, 355009 Russia

****Vladimir Dahl Lugansk State University, kv. Molodezhny 20A/7, Lugansk People's Republic, 91034 Ukraine

New hybrid molecules bearing furyl and 1,4-dihydronicotinonitrile (or 1,4,5,6-tetrahydronicotinonitrile) fragments have been prepared. The analgesic activity was studied *in vivo* (rats) in acetic acid-induced writhing test. Some compounds showed activity exceeding that of the reference compound (metamizole). Molecular docking was performed with all the compounds against COX-1 and COX-2. Also, we performed the docking studies in order to find new possible protein targets.

Keywords: nicotinonitriles, 1,4-dihydropyridines, 1,4,5,6-tetrahydropyridines, analgesics, molecular docking



УДК 547.788

ЦИАНИНОВЫЕ КРАСИТЕЛИ В КАЧЕСТВЕ ФЛУОРОГЕНОВ ДЛЯ БЕЛКОВ FAST И nanoFAST¹

© 2022 г. А. А. Хрулев*, Н. С. Балеева*, **, П. Н. Камзеева*, М. С. Баранов*, **, А. В. Аралов*, #

*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 08.11.2021 г.

После доработки 11.11.2021 г.

Принята к публикации 13.11.2021 г.

Синтезировано семь новых цианиновых красителей. Данные соединения, вместе с одиннадцатью описанными производными этого же класса, опробованы в качестве флуорогенов для белков FAST и nanoFAST. Исследование увеличения интенсивности флуоресценции при взаимодействии с данными белками позволило выявить структурные элементы, пригодные в дизайне систем белкового мечения на основе пар цианиновый краситель—флуороген-активирующий белок.

Ключевые слова: цианиновые красители, флуороген-активирующие белки, флуоресценция

DOI: 10.31857/S013234232204011X

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время флуороген-активирующие белки, один из типов генетически кодируемых флуоресцентных меток, рассматриваются в качестве перспективных инструментов для изучения функционирования живых систем [1–3]. Подобные белки обладают способностью образовывать комплексы с низкомолекулярными флуорогенными соединениями (флуорогенами), имеющими слабовыраженную флуоресценцию в несвязанном состоянии в растворе, которая, однако, многократно увеличивается при взаимодействии с белком за счет фиксации молекулы красителя, ограничивающей безызлучательный сброс энергии после ее возбуждения [4]. В качестве подобных белков зарекомендовал себя белок FAST и недавно разработанный укороченный вариант nanoFAST, на данный момент представляющий собой самый короткий флуороген-активирующий белок [5, 6]. В качестве низкомолекулярного партнера подобных белков активно изучались производные хромофоров флуоресцентных белков [7], а также бензилиденные производные роданинов [8], и получено множество пар белок—флуороген, покрывающих практически весь диапазон видимого излучения [9–11]. Тем не менее среди недостатков подобных систем флуорес-

центного мечения можно упомянуть умеренную яркость, в основном за счет низкого коэффициента молярного поглощения флуорогенов, составляющего для большинства представителей 20000–40000 М⁻¹ см⁻¹. Таким образом, повышение яркости подобных флуоресцирующих комплексов, в том числе за счет увеличения коэффициента молярного поглощения красителей, представляется актуальной задачей.

Цель данного исследования заключалась в оценке потенциала нового класса красителей в качестве низкомолекулярных флуорогенов для систем флуоресцентного мечения на основе белков FAST и nanoFAST.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цианиновые красители обладают рядом полезных свойств, среди которых следует отметить большие коэффициенты молярного поглощения, узкие полосы поглощения/излучения, высокую биосовместимость и низкую токсичность для биологических образцов [12]. В случае высокого квантового выхода флуоресценции флуорогена в комплексе с белком подобные красители могут обеспечить разработку новых эффективных систем мечения с большей яркостью. В настоящей работе мы решили опробовать набор из 18 цианиновых производных в качестве флуорогенов для белков FAST и nanoFAST (схема 1). Производные (I–IX), (XIII) и (XIV) получены по литературным

¹ Дополнительные материалы для этой статьи доступны по doi 10.31857/S013234232204011X для авторизованных пользователей.

Автор для связи: (эл. почта: baruh238@mail.ru).

методикам [13–23], а новые производные (X–XII) и (XV–XVIII) синтезированы реакцией конденсации Кневенагеля кипячением карбанион-образу-

ющей и карбонил-содержащей электрофильной компонент в водном этаноле в присутствии каталитического количества пиперидина (схема 1) [24].

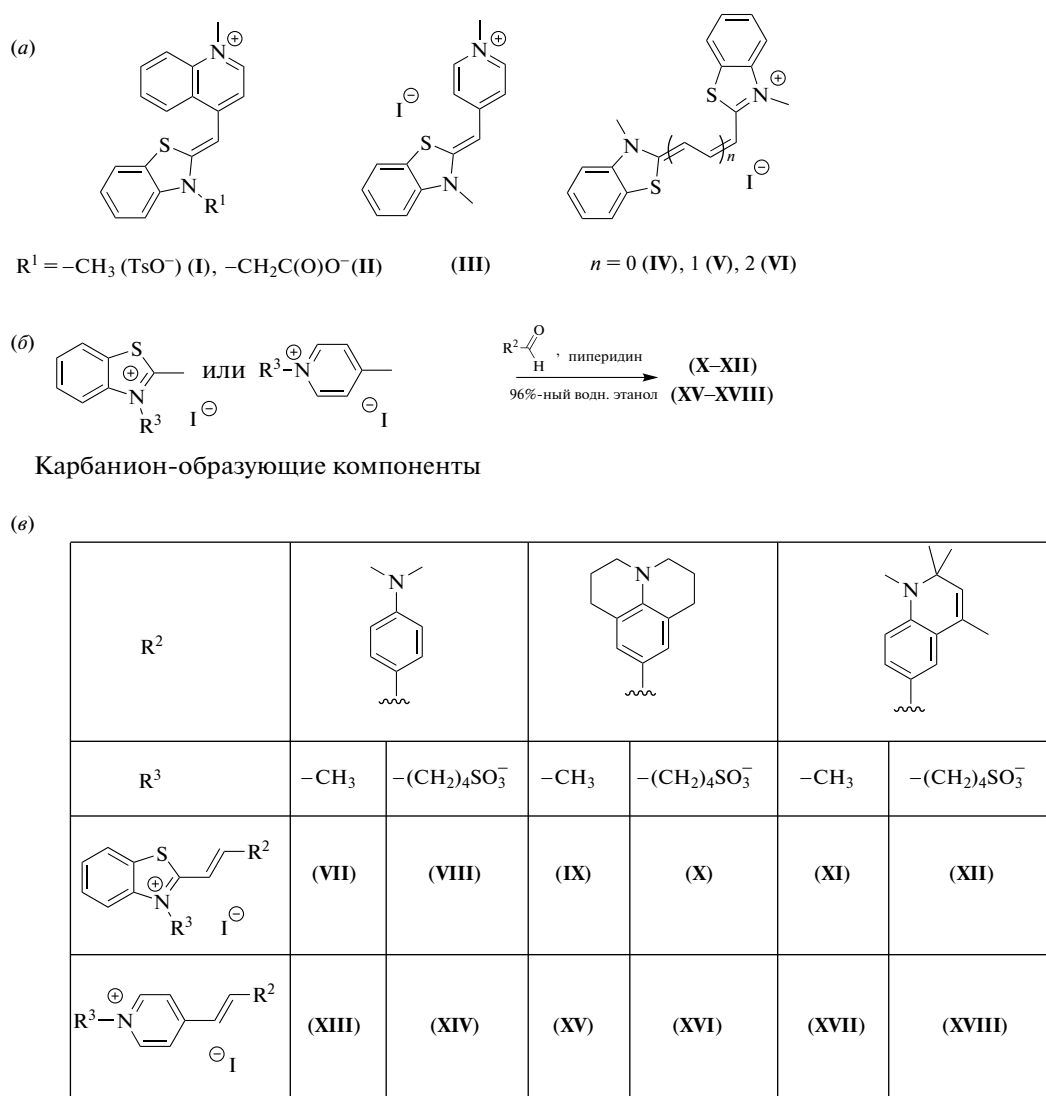


Схема 1. (a) – Структуры цианиновых красителей (I–VI); (б) – схема синтеза производных (X–XII) и (XV–XVIII); (в) – структуры цианиновых красителей (VII–XVIII).

Изучение изменения интенсивности флуоресценции при взаимодействии с белками FAST и nanoFAST позволило выявить фрагменты, пригодные для последующего дизайна пар цианиновых красителей с данными белками. Так, сравнение симметричных красителей (IV–VI) показало перспективность триметинового звена соединения (V) (11,3-кратное увеличение интенсивности флуоресценции, см. табл. 1) для последующего дизайна цианиновых красителей с гетероциклическими фрагментами, отличными от бензотиазольного. Из гетероциклических фрагментов цианинов можно выделить бензотиазольный и 1,2,3,5,6,7-гек-

сагидропиридо[3,2,1-ij]хинолиновый (джулолидиновый)/1,2,2,4,6-пентаметил-1,2-дигидрохинолиновый фрагменты, наличие которых обеспечило “разгорание” красителей в 5–7 раз (см. табл. 1 для соединений (IX–XII)).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Препараты белков FAST и nanoFAST получали согласно описанным ранее методикам [6, 8]. Увеличение интенсивности флуоресценции определяли как отношение интенсивности флуоресценции раствора хромофор + белок к интенсивности

Таблица 1. Увеличение интенсивности флуоресценции соединений (IV–VI) и (IX–XII) при взаимодействии с белками FAST и nanoFAST

Соединение	Увеличение интенсивности флуоресценции при заданной длине волны возбуждения при взаимодействии с белком FAST (nanoFAST)				
	380 нм	430 нм	480 нм	530 нм	580 нм
(IV)	1.54 (1.71)	2.10 (2.50)	1.03 (1.11)	1.08 (1.10)	1.19 (1.37)
(V)	1.07 (1.43)	1.07 (1.22)	1.43 (1.75)	2.31 (3.16)	7.40 (11.30)
(VI)	1.49 (1.39)	1.10 (1.21)	1.10 (1.19)	1.39 (1.66)	1.09 (1.58)
(IX)	1.08 (1.41)	1.12 (1.26)	1.99 (2.09)	5.08 (4.84)	6.27 (5.53)
(X)	1.32 (1.42)	1.11 (1.27)	1.47 (1.84)	3.23 (4.61)	4.99 (7.00)
(XI)	1.34 (1.68)	1.21 (1.32)	2.34 (2.24)	4.87 (4.36)	7.15 (6.24)
(XII)	1.26 (1.62)	1.13 (1.26)	1.75 (1.85)	3.30 (3.60)	5.54 (6.62)

флуоресценции раствора свободного хромофора, зарегистрированным на планшет-ридере Tecan Infinite 200 Pro M Nano (Tecan Trading AG, Швейцария), работающем в двух режимах (1 и 10 мкМ раствор хромофора и белка соответственно). Регистрацию интенсивности флуоресценции обоих растворов осуществляли при одинаковой длине волны, приведенной для каждого соединения (табл. 1). Из-за используемых концентраций могли возникнуть ненасыщенные условия. Корректировку интенсивности поглощения не проводили.

Общая методика получения производных (X–XII) и (XV–XVIII). К раствору соответствующих карбанион-образующей компоненты (1 ммоль) и карбонил-содержащей компоненты (1.5 ммоль) в 96%-ном водном этаноле (15 мл) добавляли каталитическое количество пиперидина (10 мкл), полученный раствор кипятили с обратным холодильником в течение 20 ч. Реакционную смесь упаривали на роторном испарителе. Остаток растирали с ацетоном (5 мл), выпавший осадок отфильтровывали и промывали ацетоном (3 × 5 мл). Очистку целевого соединения проводили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле в градиенте концентраций метанола в дихлорметане (10 → 30%, v/v), получая соответствующее целевое соединение.

4-(2-(2-(2,3,6,7-Тетрагидро-1*H*,5*H*-пиридо[3,2,1-*ij*]хинолин-9-ил)винил)бензо[*d*]тиазол-3-ий-3-ил)бутан-1-сульфонат (X). Темно-фиолетовый аморфный порошок (180 мг, 77%).

Иодид 3-метил-2-(2-(1,2,2,4-тетраметил-1,2-дигидрохинолин-6-ил)винил)бензо[*d*]тиазол-3-ия (XI). Темно-красный аморфный порошок (85 мг, 73%).

4-(2-[2-(1,2,2,4-Тетраметил-1,2-дигидрохинолин-6-ил)винил)бензо[*d*]тиазол-3-ий-3-ил)бутан-1-сульфонат (XII). Темно-фиолетовый аморфный порошок (160 мг, 86%).

Иодид 1-метил-4-[2-(2,3,6,7-тетрагидро-1*H*,5*H*-пиридо[3,2,1-*ij*]хинолин-9-ил)винил]пиридин-1-ия (XV). Фиолетовый аморфный порошок (45 мг, 45%).

4-(4-[2-(2,3,6,7-Тетрагидро-1*H*,5*H*-бензо[*ij*]хинолизидин-9-ил)винил]пиридин-1-ий-1-ил)бутан-1-сульфонат (XVI). Темно-красный аморфный порошок (21 мг, 33%).

Иодид 1-метил-4-[2-(1,2,2,4-тетраметил-1,2-дигидрохинолин-6-ил)винил]пиридин-1-ия (XVII). Темно-красный аморфный порошок (60 мг, 50%).

4-(4-[2-(1,2,2,4-Тетраметил-1,2-дигидрохинолин-6-ил)винил]пиридин-1-ий-1-ил)бутан-1-сульфонат (XVIII). Красный аморфный порошок (90 мг, 70%).

Данные спектров полученных соединений (X–XII) и (XV–XVIII) приведены в дополнительных материалах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе синтезировано семь новых цианиновых красителей. Данные соединения, вместе с одиннадцатью описанными ранее производными, были оценены в качестве флуорогенов для белков FAST и nanoFAST. Выявлены структурные элементы цианиновых красителей, перспективные для последующего дизайна новых белковых флуоресцентных меток на основе пар цианиновый флуороген—FAST/nanoFAST, а именно бензотиазольный и 1,2,3,5,6,7-гексагидропиридо[3,2,1-*ij*]хинолиновый (джулолидиновый)/1,2,4,6-пентаметил-1,2-дигидрохинолиновый фрагменты, наличие которых обеспечило при взаимодействии с белками FAST и nanoFAST “разгорание” красителей в 5–7 раз.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-34-70143.

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. Xu S., Hu H.Y. // *Acta Pharm. Sin.* B. 2018. V. 8. P. 339–348.
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.02.001>
2. Péresse T., Gautier A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 6142.
<https://doi.org/10.3390/ijms20246142>
3. Gallo E. // *Bioconj. Chem.* 2020. V. 31. P. 16–27.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00710>
4. Baldrige A., Feng S., Chang Y.T., Tolbert L.M. // *ACS Comb. Sci.* 2011. V. 13. P. 214–217.
<https://doi.org/10.1021/co200025e>
5. Plamont M.A., Billon-Denis R., Maurin S., Gauron C., Pimenta F.M., Specht C.G., Shi J., Quérard J., Pan B., Rossignol J., Moncoq K., Morellet N., Volovitch M., Lescop E., Chen Y., Triller A., Vríz S., Saux T., Jullien L., Gautier A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. P. 497–502.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1513094113>
6. Mineev K.S., Goncharuk S.A., Goncharuk M.V., Povarova N.V., Sokolov A.I., Baleeva N.S., Smirnov A.Y., Myasnyanko I.N., Ruchkin D.A., Bukhdruker S., Remeeva A., Mishin A., Borshchevskiy V., Gordeliy V., Arseniev A.S., Gorbachev D.A., Gavrikov A.S., Mishin A.S., Baranov M.S. // *Chem. Sci.* 2021. V. 12. P. 6719–6725.
<https://doi.org/10.1039/d1sc01454d>
7. Li C., Plamont M.A., Sladitschek H.L., Rodrigues V., Aujard I., Neveu P., Saux T., Jullien L., Gautier A. // *Chem. Sci.* 2017. V. 8. P. 5598–5605.
<https://doi.org/10.1039/C7SC01364G>
8. Povarova N.V., Zaitseva S.O., Baleeva N.S., Smirnov A.Y., Myasnyanko I.N., Zagudaylova M.B., Bozhanova N.G., Gorbachev D.A., Malyshevskaya K.K., Gavrikov A.S., Mishin A.S., Baranov M.S. // *Chem. Eur. J.* 2019. V. 25. P. 9592–9596.
<https://doi.org/10.1002/chem.201901151>
9. Myasnyanko I.N., Gavrikov A.S., Zaitseva S.O., Smirnov A.Y., Zaitseva E.R., Sokolov A.I., Malyshevskaya 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>
10. Li C., Tebo A.G., Thauvin M., Plamont M., Volovitch M., Morin X., Vríz S., Gautier A. // *Angew. Chemie.* 2020. V. 132. P. 18073–18079.
<https://doi.org/10.1002/ange.202006576>
11. Балеева Н.С., Смирнов А.Ю., Мяснянко И.Н., Гавриков А.С., Баранов М.С. // *Биоорг. химия.* 2021. Т. 47. С. 647–651. [Baleeva N.S., Smirnov A.Yu., Myasnyanko I.N., Gavrikov A.S., Baranov M.S. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2021. V. 47. P. 1118–1121.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162021050198>
12. Li Y., Zhou Y., Yue X., Dai Z. // *Adv. Healthc. Mater.* 2020. V. 9. P. 2001327.
<https://doi.org/10.1002/adhm.202001327>
13. Wang L., Lin W., Sun W., Yan M., Zhao J., Guan L., Deng W., Zhang Y. // *J. Org. Chem.* 2019. V. 84. P. 3960–3967.
<https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b03122>
14. Dolgosheina E.V., Jeng S.C., Panchapakesan S.S., Cojocar R., Chen P.S., Wilson P.D., Hawkins N., Wiggins P.A., Unrau P.J. // *ACS Chem. Biol.* 2014. V. 9. P. 2412–2420.
<https://doi.org/10.1021/cb500499x>
15. Turaev A.V., Tsvetkov V.B., Tankevich M.V., Smirnov I.P., Aralov A.V., Pozmogova G.E., Varizhuk A.M. // *Biochimie.* 2019. V. 162. P. 216–228.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.04.018>
16. Kurutos A., Nikodinovic-Runic J., Veselinovic A., Veselinovic J.B., Kamounah F.S., Illic-Tomic T. // *New J. Chem.* 2021. V. 45. P. 12818–12829.
<https://doi.org/10.1039/D1NJ01659H>
17. Quan-Quan S., Ru S., Jian-Feng G., Qing-Feng X., Na-Jun L., Jian-Mei L. // *Dyes Pigm.* 2012. V. 93. P. 1506–1511.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2011.11.001>
18. Rao T.V.S., Huff J.B., Bieniarz C. // *Tetrahedron.* 1998. V. 54. P. 10627–10634.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(98\)00597-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(98)00597-3)
19. Vasilev A., Deligeorgiev T., Gadjev N., Kaloyanova S., Vaquero J., Alvarez-Builla J., Baeza A. // *Dyes Pigm.* 2008. V. 77. P. 550–555.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2007.08.004>
20. Al-horaibi S.A., Alrabie A.A., Alghamdi M.T., Al-Ostoot F.H., Garoon E.M., Rajbhoj A.S. // *J. Mol. Struct.* 2021. V. 1224. P. 128836.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128836>
21. Coe B.J., Foxon S.P., Harper E.C., Harris J.A., Helliwell M., Raftery J., Asselberghs I., Clays K., Franz E., Brunschwig B.S., Fitch A.G. // *Dyes Pigm.* 2009. V. 82. P. 171–186.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2008.12.010>
22. Fang-Fang S., Ying-Ming Z., Xian-Yin D., Hao-Yang Z., Yu L. // *J. Org. Chem.* 2020. V. 85. P. 6131–6136.
<https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b03513>
23. Zhong-Sheng W., Fu-You L., Chun-Hui H., Lu W., Min W., Lin-Pei J., Nan-Qiang L. // *J. Phys. Chem. B.* 2000. V. 104. P. 9676–9682.
<https://doi.org/10.1021/jp001580p>
24. Shindy H.A. // *Dyes Pigm.* 2017. V. 145. P. 505–513.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.06.029>

Cyanine Dyes as Fluorogens for FAST and nanoFAST Proteins**A. A. Khrulev*, N. S. Baleeva*, **, P. N. Kamzееva*, M. S. Baranov*, **, and A. V. Aralov*, #**[#]*E-mail: baruh238@mail.ru*^{*}*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*

Seven new cyanine dyes were synthesized. These compounds, together with eleven described derivatives of the same class, have been probed as fluorogens for the FAST and nanoFAST proteins. The study of the increase in fluorescence intensity upon interaction with these proteins allowed to identify structural elements suitable for the design of protein labeling systems based on cyanine dye–fluorogen-activating protein pairs.

Keywords: cyanine dyes, fluorogen-activating proteins, fluorescence



УДК 577.29

ЦИРКУЛЯРНЫЕ ПЕРМУТАНТЫ БЕЛКА BrUSLEE КАК ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЕ ИНДИКАТОРЫ pH

© 2022 г. А. В. Мамонтова*, Т. Р. Симонян*, К. А. Лукьянов**, А. М. Богданов**, #

*Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий,
Россия, 121205 Москва, Большой бульвар, 30, стр. 1**ФГБУН "Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова" РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 08.11.2021 г.

После доработки 15.11.2021 г.

Принята к публикации 16.11.2021 г.

Получены два варианта циркулярных пермутантов BrUSLEE – зеленого флуоресцентного белка с коротким временем жизни флуоресценции. Охарактеризована зависимость кинетик затухания флуоресценции этих флуорофоров от pH. Показано, что оба пермутанта (срBrUS и срBrUS-145) демонстрируют трехкомпонентную кинетику затухания флуоресценции, причем время жизни одной из компонент изменяется в диапазоне ~3000–300 пс в ответ на сдвиг pH от 5.5 до 9.0, при этом исходный белок BrUSLEE не показывает существенного изменения кинетики затухания флуоресценции в области pH 6.0–8.5, интересной с физиологической точки зрения. Характер измеренной pH-зависимости позволяет рассматривать полученные пермутанты как индикаторы pH с детекцией сигнала во временном домене.

Ключевые слова: флуоресцентные белки, GFP, время жизни флуоресценции, флуоресцентные индикаторы

DOI: 10.31857/S0132342322040157

ВВЕДЕНИЕ

Один из факторов поддержания гомеостаза и контроля нормальных физиологических функций клеток – специфическая кислотность, характерная для разных субклеточных компартментов [1, 2]. Мониторинг изменений внутриклеточного pH *in situ* может предоставить ценную информацию о клеточном метаболизме и обеспечить более глубокое понимание физиологических и патологических процессов [3, 4]. Большинство традиционных флуоресцентных индикаторов, выступая мощным инструментом для биоимиджинга в реальном времени, способно лишь к относительной оценке изменения исследуемого параметра в клетке [5–7].

Цель настоящей работы – создание генетически кодируемых индикаторов для количественного измерения pH на основе флуоресцентного

белка BrUSLEE [8], который ранее продемонстрировал свой потенциал в качестве метки для FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy), обладающей коротким временем жизни флуоресценции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для повышения чувствительности хромофора флуоресцентного белка к химическому окружению мы провели циркулярную пермутацию BrUSLEE (рис. 1). Принцип метода пермутации состоит в перестановке элементов первичной структуры белка с общим сохранением его трехмерной укладки и перемещением концов в область хромофорного окружения. Точкой пермутации был выбран сайт, включающий 144–149 а.о. (по номенклатуре avGFP – *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein [9]), по аналогии с существующими пермутантами на основе GFP (Green Fluorescent Protein), хорошо зарекомендовавшими себя в составе флуоресцентных индикаторов (в частности, GCaMP6s [10]). При этом предложены два альтернативных варианта первичной структуры пермутантов: с удалением (срBrUS-145) и с сохранением (срBrUS) остатка в положении 145 (остаток

Сокращения: BrUSLEE – улучшенный яркий маркер со сверхкоротким временем жизни флуоресценции (Bright Ultimately Short Lifetime Enhanced Emitter); ср – циркулярно пермутированный (circularly permuted); avGFP – зеленый флуоресцентный белок из медузы *Aequorea victoria* (*Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein); GFP – зеленый флуоресцентный белок (Green Fluorescent Protein).

Автор для связи: (тел.: +7 (903) 746-08-49; эл. почта: noobissat@yandex.ru).

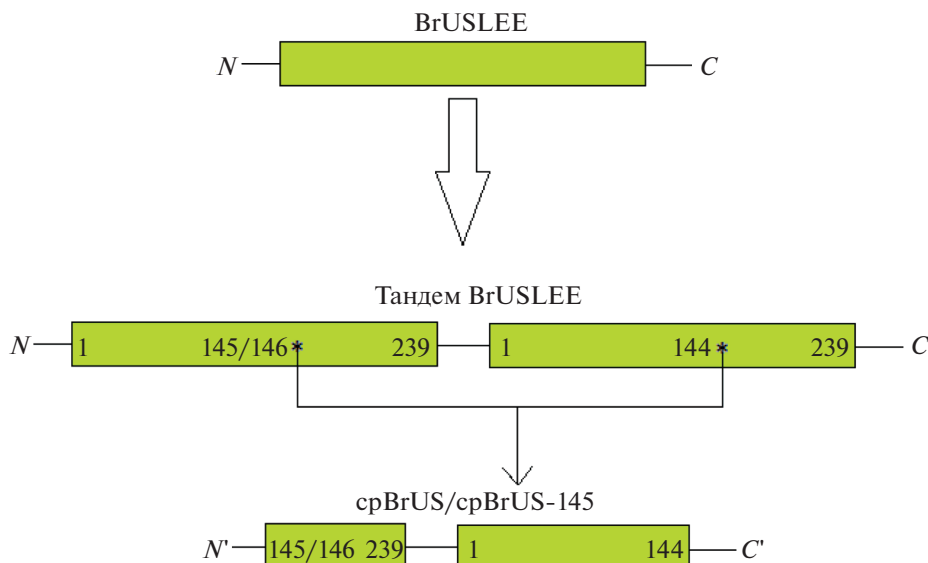


Рис. 1. Схема создания пермутированных вариантов флуоресцентного белка BrUSLEE. Области, кодирующие флуоресцентный белок, показаны зелеными прямоугольниками. Звездочками отмечены точки пермутации. Цифрами обозначены соответствующие аминокислотные остатки по номенклатуре avGFP [9].

Met145 — важная детерминанта флуоресцентных свойств BrUSLEE [11]).

Далее мы исследовали pH-зависимость времени жизни флуоресценции исходного белка BrUSLEE и полученных циркулярных пермута-

тов cpBrUS-145 и cpBrUS *in vitro* на очищенных препаратах выделенных белков с помощью времязазрешенной спектроскопии при однофотонном возбуждении пикосекундным лазером с центральной длиной волны испускания ~450 нм (табл. 1, рис. 2).

Таблица 1. Кинетические характеристики затухания флуоресценции белка BrUSLEE и пермутантов cpBrUS и cpBrUS-145 при возбуждении пикосекундным лазером 450 нм при различных значениях pH

cpBrUS/cpBrUS-145/BrUSLEE							
pH	τ_1 , пс	A1, %	τ_2 , пс	A2, %	τ_3 , пс	A3, %	χ^2
3.0	80/40/105	31/15/37	1860/1810/1802	27/25/24	6470/5010/6410	42/60/39	1.16/1.207/1.16
3.5	90/38/84	31/15/34	1970/1511/1653	29/20/26	6780/4969/6280	40/65/40	1.186/1.252/1.14
4.0	90/45/40	29/16/39	1890/1694/2077	29/24/27	6580/5515/6855	42/60/34	1.142/1.133/1.164
4.5	80/36/66	28/17/38	1790/1417/1614	29/20/24	6460/5345/6241	43/63/38	1.25/1.198/1.118
5.0	80/57/304	27/16/39	1740/1656/1194	30/24/38	6530/5538/5650	43/60/23	1.17/1.269/1.149
5.5	100/55/374	28/18/39	2030/1653/1367	32/25/38	6760/5697/5997	39/57/23	1.2/1.15/1.239
6.0	90/45/764	25/22/79	1880/1201/3090	33/17/16	6590/5092/6544	42/61/5	1.218/1.235/1.546
6.5	100/71/801	26/26/74	1710/1226/2899	31/20/21	6310/5107/7559	43/54/5	1.18/1.154/0.964
7.0	130/76/802	26/28/83	1730/749/2565	35/18/17	6350/4752/нет	39/54/нет	1.154/1.137/0.98
7.5	170/110/809	27/43/83	1590/817/2598	36/21/17	6130/4582/нет	37/36/нет	1.266/1.078/1.046
8.0	360/117/808	35/47/83	1840/725/2620	40/21/17	5950/4312/нет	25/32/нет	1.188/1.055/1.122
8.5	330/111/770	37/52/79	1770/602/2340	38/27/21	5360/3520/нет	25/21/нет	1.139/0.917/1.031
9.0	610/111/785	50/54/81	2590/474/2388	38/31/19	6960/2192/нет	12/15/нет	1.262/0.819/1.017
9.5	870/111/784	67/48/82	3280/516/2497	30/35/18	8380/2110/нет	3/17/нет	1.214/0.769/1.003
10.0	600/95/780	47/40/79	2270/474/2370	45/35/21	5170/1787/нет	8/25/нет	0.966/0.797/0.989
10.5	610/129/765	45/37/74	1990/586/2346	42/25/16	4430/1685/нет	13/38/нет	0.963/0.876/0.972
11.0	640/113/779	46/26/69	2020/590/2426	43/25/31	3990/1655/нет	11/49/нет	0.941/0.893/1.003

Примечание: τ — время жизни флуоресценции соответствующей экспоненциальной компоненты; A — вклад (амплитуда) экспоненциальной компоненты затухания; χ^2 — критерий Пирсона, характеризующий качество экспоненциальной аппроксимации.

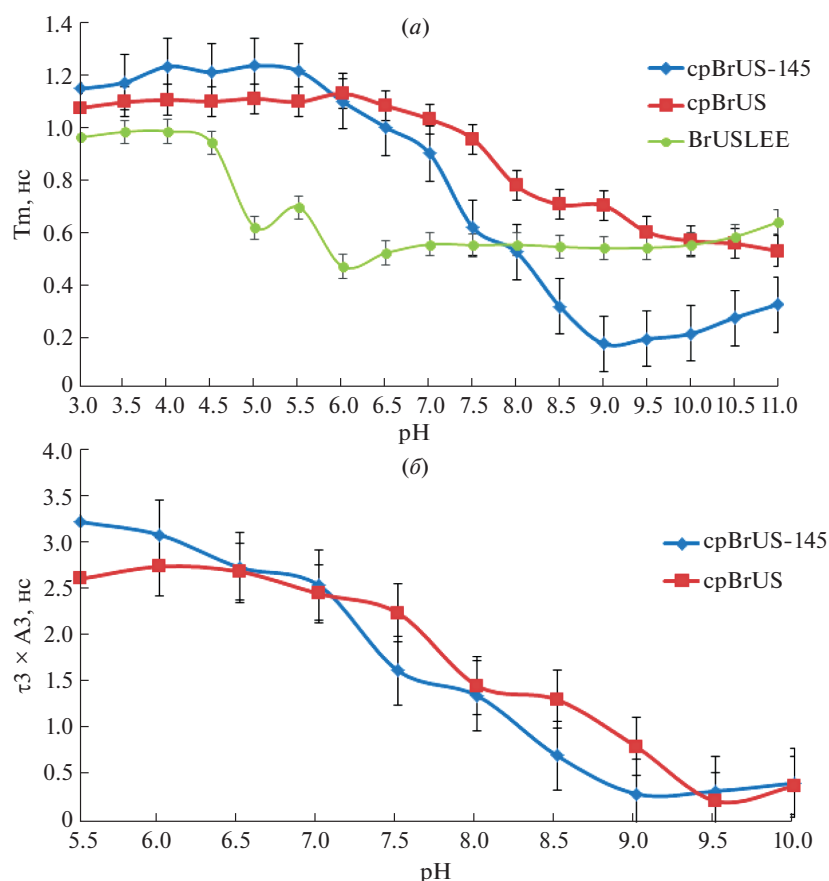


Рис. 2. (а) — Зависимость среднего времени жизни флуоресценции (T_m) от pH для белка BrUSLEE и пермутантов cpBrUS и cpBrUS-145 *in vitro*; (б) — калибровочная кривая, характеризующая зависимость нормированного на амплитуду времени жизни флуоресценции τ_3 пермутантов cpBrUS и cpBrUS-145 от pH *in vitro* ($n = 3$).

Кинетики затухания флуоресценции флуорофоров обоих пермутантов демонстрируют выраженную зависимость от pH раствора (рис. 2а); они адекватно аппроксимируются трехэкспоненциальной моделью, причем время жизни третьей компоненты с учетом амплитуды ($\tau_3 \times A_3$) показывает десятикратное изменение (~3000–300 пс) в диапазоне pH 5.5–9.0 (рис. 2б, табл. 1). Форма зависимости $\tau_3 \times A_3$ от pH близка к линейной, что потенциально облегчает калибровку флуоресцентного сигнала для экспериментального определения величины pH. Следует отметить, что пермутант cpBrUS-145 демонстрирует более значительный динамический диапазон ответа, чем cpBrUS (шестикратное изменение среднего времени жизни флуоресценции против двухкратного соответственно), что указывает на способность остатка Met145 ограничивать конформационную подвижность хромофора. При этом наблюдается незначительная чувствительность исходного белка BrUSLEE в узкой области значений pH 4.5–5.5 (рис. 2а), а при многокомпонентной экспоненциальной аппроксимации ни одна из компонент за-

тухания флуоресценции белка BrUSLEE не показывает существенного изменения в области 6.0–8.5, интересной с физиологической точки зрения (табл. 1).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение циркулярных пермутантов BrUSLEE. Мы сконструировали ДНК-векторы, несущие кодирующие последовательности cpBrUSLEE. Для этого методом ПЦР-амплификации получили тандемные повторы последовательностей генов *BrUSLEE* [8, 12], соединенные олигонуклеотидным линкером, кодирующим аминокислотную последовательность состава (Ser-Gly-Thr)₂; использовали следующие праймеры: 5'-ATGCG-GATCCATGGTGAGCAAGGGCGAG-3', 5'-ATGCG-GTCGACCTTGTACAGCTCGTCCATGC-3', 5'-ATGCGTCGACAGCGGGACTAGCGGGACTATGGT-GAGCAAGGGCGAG-3', 5'-ATGCAAGCTTTTAC-TTGTACAGCTCGTCCATGC-3'; программа ПЦР: 95°C – 5 мин, (95°C – 30 с, 58°C – 30 с, 72°C – 30 с) × 18, 72°C – 7 мин. Эта промежуточная кон-

струкция служила матрицей для ПЦР-амплификации последовательностей ДНК, кодирующих варианты *срBrUSLEE*, с использованием прямого (5'-концевого) праймера, соответствующего последовательности, кодирующей начало С-концевой части первой копии *срBrUSLEE* (начиная с 145 или 146 а.о.) (5'-ATGCGGATCCATGAACAGCCACAACGTC-3' или 5'-ATGCGGATCCAAACAGCCACAACGTCTAT-3'), и обратного (3'-концевого) праймера, комплементарного последовательности ДНК, кодирующей конец N-концевой части второй копии *срBrUSLEE* (1–144 а.о.) (5'-AAGCTTTTAATGCGTTGTACTCCAGCTTGTGCC-3'), при следующей программе ПЦР: 95°C – 5 мин, (95°C – 30 с, 55°C – 30 с, 72°C – 30 с) × 18, 72°C – 7 мин.

Экспрессия и очистка белка. Последовательности, кодирующие пермутанты *срBrUS* и *срBrUS-145*, были клонированы в вектор pQE30 (Qiagen, США) с меткой 6His на N-конце, экспрессированы в штамме *E. coli* XL1 Blue (Invitrogen, США) и очищены с использованием металл-аффинной смолы TALON (Clontech, США) [13].

Спектроскопия времени жизни флуоресценции очищенных белков. Измерения производили с помощью времяразрешенного флуоресцентного спектрометра miniTau (Edinburgh Instruments, Великобритания) в окне 50 нс, разделенном на 2048 временных каналов. Возбуждение флуоресценции производили пикосекундным лазером EPL-450 (Edinburgh Instruments) с центральной длиной волны излучения 445.6 нм, частотой повторений 20 МГц; счет фотонов проводили в спектральном диапазоне 475–525 нм. Обработку и визуализацию данных, определение χ^2 (критерий Пирсона) проводили в программе Fluoracle 2.5.1 (Edinburgh Instruments).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены два циркулярных пермутанта BrUSLEE с удалением (*срBrUS-145*) и с сохранением (*срBrUS*) аминокислотного остатка Met в положении 145. В отличие от исходного BrUSLEE, оба пермутанта продемонстрировали выраженную зависимость кинетики затухания флуоресценции от pH в физиологическом диапазоне 6.0–8.5. Таким образом, циркулярная пермутация существенно повышает чувствительность хромофора BrUSLEE к изменениям pH, и оба циркулярных пермутанта BrUSLEE можно рассматривать как перспективные зонды для количественных измерений pH.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-34-60019, руководитель — А.В. Мамонтова).

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. Casey J.R., Grinstein S., Orlowski J. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2010. V. 11. P. 50–61. <https://doi.org/10.1038/nrm2820>
2. Demaurex N. // Physiology. 2002. V. 17. P. 1–5. <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2002.17.1.1>
3. Boron W.F. // Adv. Physiol. Educ. 2004. V. 28. P. 160–179. <https://doi.org/10.1152/advan.00045.2004>
4. Lagadic-Gossmann D., Huc L., Lecureur V. // Cell Death Differ. 2004. V. 11. P. 953–961. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401466>
5. Zhu H., Fan J., Xu Q., Li H., Wang J., Gao P., Peng X. // Chem. Commun. 2012. V. 48. P. 11766. <https://doi.org/10.1039/c2cc36785h>
6. Ermakova Y.G., Pak V.V., Bogdanova Y.A., Kotlobay A.A., Yampolsky I.V., Shokhina A.G., Panova A.S., Marygin R.A., Staroverov D.B., Bilan D.S., Sies H., Belousov V.V. // Chem. Commun. 2018. V. 54. P. 2898–2901. <https://doi.org/10.1039/C7CC08740C>
7. Martynov V.I., Pakhomov A.A., Deyev I.E., Petrenko A.G. // Biochim. Biophys. Acta (BBA) — Gen. Subj. 2018. V. 1862. P. 2924–2939. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.09.013>
8. Mamontova A.V., Solovyev I.D., Savitsky A.P., Shakhov A.M., Lukyanov K.A., Bogdanov A.M. // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 13224. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31687-w>
9. FPbase: avGFP. <https://www.fpbases.org/protein/avgfp/>
10. Chen T.-W., Wardill T.J., Sun Y., Pulver S.R., Renninger S.L., Baohan A., Schreier E.R., Kerr R.A., Orger M.B., Jayaraman V., Looger L.L., Svoboda K., Kim D.S. // Nature. 2013. V. 499. P. 295–300. <https://doi.org/10.1038/nature12354>
11. Mamontova A.V., Shakhov A.M., Lukyanov K.A., Bogdanov A.M. // Biomolecules. 2020. V. 10. P. 1547. <https://doi.org/10.3390/biom10111547>
12. FPbase: BrUSLEE. <https://www.fpbases.org/protein/bruslee/>
13. TALON® Metal Affinity Resins User Manual. http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Tag_Protein_Purification/Ni-NTA/TALON_UserManual.pdf

Circular Permutants of BrUSLEE Protein as Fluorescent pH Indicators

A. V. Mamontova*, T. R. Simonyan*, K. A. Lukyanov**, and A. M. Bogdanov**, #

*Center of Life Sciences, Skolkovo Institute of Science and Technology, Bolshoy bulvar 30/1, Moscow, 121205 Russia

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

Two variants of circularly permuted BrUSLEE, a green fluorescent protein with a short fluorescence lifetime, have been engineered. We characterized the pH-dependence of fluorescence decay kinetics of these fluorophores. It was shown that both permutants (cpBrUS and cpBrUS-145) exhibit three-component fluorescence decay kinetics, with the lifetime of the one component varying within the ~ 3000 – 300 ps range upon pH shift from 5.5 to 9.0. At the same time, the original BrUSLEE does not show a significant change in the fluorescence decay kinetics within the physiologically relevant pH-range of 6.0–8.5. The described pH-dependence allows considering the BrUSLEE permutants as pH indicators with the fluorescence lifetime readout.

Keywords: fluorescent proteins, GFP, fluorescence lifetime, fluorescent indicators