СОДЕРЖАНИЕ

Том 48, номер 5, 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.

Академик РАН Иванов Вадим Тихонович (18.09.1937-08.04.2022)	507
Метаболизм гиалуроновой кислоты и прогрессия опухолей (обзорная статья)	
И. И. Хегай	508
Роль линкерных гистонов в канцерогенезе (обзорная статья)	
А. В. Любителев, М. П. Кирпичников, В. М. Студитский	520
Влияние структуры липидного фрагмента на встраивание и выход гликолипидов из клеток: изучение с помощью синтетических аналогов	
Е. В. Сливка, А. Б. Тузиков, С. В. Хайдуков, В. А. Комарова, С. Генри, Н. В. Бовин, Е. М. Рапопорт	531
Синтетические антимикробные пептиды. IV. Влияние катионных групп лизина, аргинина и гистидина на антимикробную активность пептидов с "круговым" типом амфипатичности	
Н. В. Амирханов, А. В. Бардашева, Н. В. Тикунова, Д. В. Пышный	537
Методика радиолигандного анализа для одновременного определения содержания β ₁ - и β ₂ -адренорецепторов в клетках крови человека	
А. Я. Шевелев, Н. М. Каширина, Л. Н. Липатова, Е. В. Янушевская, М. М. Пекло, И. Н. Рыбалкин, П. Н. Руткевич, О. К. Чусовитина, Н. А. Скоблова, Ю. С. Скоблов, Т. Н. Власик, К. А. Зыков	551
Синтез и оценка биологической активности антагониста рецептора галанина GalR2 при ишемии и реперфузии сердца крыс <i>in vivo</i>	
М. В. Сидорова, М. Е. Палькеева, Д. В. Авдеев, И. М. Студнева, Л. И. Серебрякова, О. М. Веселова, И. В. Доброхотов, А. С. Молокоедов, О. И. Писаренко	561
Синтез и исследование противовоспалительной активности новых производных пиримидина – ингибиторов изоформ циклооксигеназ	
Ю. З. Хазимуллина, А. Р. Гимадиева, В. Р. Хайруллина, Л. Ф. Зайнуллина, Ю. В. Вахитова, А. Г. Мустафин	569
Новый подход к синтезу фотоблокированных малых интерферирующих РНК для активируемой светом РНК-интерференции	
Е. А. Ахметова, Д. В. Ким, А. С. Доме, М. И. Мещанинова, Д. С. Новопашина	580
Детекция вируса блютанга с помощью микросфер, конъюгированных с моноклональными антителами к групп-специфичному белку (VP7), методом проточной вирометрии	
Н. В. Руденко, А. П. Каратовская, А. В. Замятина, А. С. Малоголовкин, В. А. Олейников, Ф. А. Бровко, А. Ю. Кольцов, О. Г. Лаптева, Л. В. Колбасов, А. О. Шепеляковская	589

ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

Биочип с агарозными микроячейками, содержащими термоотщепляемые праймеры	
А. М. Золотов, Р. А. Мифтахов, А. Ю. Иконникова, С. А. Лапа, В. Е. Кузнецова, В. А. Василисков, В. Е. Шершов, А. С. Заседателев, Т. В. Наседкина, А. В. Чудинов	599
Влияние ингибиторов миозина на экспрессию механозависимых генов в раннем развитии шпорцевой лягушки	
П. А. Филенко, А. А. Чеченина, А. Г. Зарайский, Ф. М. Ерошкин	606
Синтез и оптические свойства конформационно зафиксированного диарилметенового аналога хромофора белка GFP	
Н. С. Балеева, А. Ю. Смирнов, М. С. Баранов	611
Галогенсодержащие 4-гидроксибензилиден-роданины как флуорогены для белка FAST	
А. И. Соколов, Н. С. Балеева, М. С. Баранов	616
Правила для авторов журнала "Биоорганическая химия" 2022–2023	621



АКАДЕМИК РАН ИВАНОВ ВАДИМ ТИХОНОВИЧ (18.09.1937-08.04.2022)

DOI: 10.31857/S0132342322050268



Академик РАН **ИВАНОВ ВАДИМ ТИХОНОВИЧ** (18.09.1937–08.04.2022)

С прискорбием сообщаем, что ушел из жизни Иванов Вадим Тихонович – российский биохимик, академик РАН, главный редактор журнала "Биоорганическая химия" (Russian Journal of Bioorganic Chemistry), лауреат Ленинской и Государственной премии СССР, член экспертной комиссии РСОШ по биологии.

Более 30 лет Вадим Тихонович возглавлял журнал "Биоорганическая химия" (Russian Journal of Bioorganic Chemistry), сделав многое для достижения и поддержания высокого международного уровня журнала.

Международный редакционный совет, редакционная коллегия и редакция журнала "Биоорганическая химия" выражает соболезнования родным, близким и коллегам В.Т. Иванова.



УДК 57.016.4+616-006.6

МЕТАБОЛИЗМ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ И ПРОГРЕССИЯ ОПУХОЛЕЙ

© 2022 г. И.И. Хегай*, #

*Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 10 Поступила в редакцию 12.04.2021 г. После доработки 25.05.2021 г.

Принята к публикации 28.05.2021 г.

Наследственные и соматические мутации, инициирующие возникновение раковых клеток, - это ключевой, но не единственный фактор прогрессии опухолей. Для активации роста опухоли необходимо тесное взаимодействие с микроокружением. Межклеточное вещество функционирует одновременно как биомеханическая поддерживающая среда и как активное звено в сигнальной коммуникации клеток. Основной пластический компонент межклеточного вещества – гиалуроновая кислота (гиалуронан). Пролиферация и метастазирование опухолей сопровождаются предварительным накоплением гиалуроновой кислоты. Важный фактор малигнизации опухолей — соотношение активности гиалуронансинтаз и гиалуронидаз. Локализованные на клеточной мембране гиалуронансинтазы образуют высокомолекулярный сополимер D-глюкуроновой кислоты и D-N-ацетилглюкозамина. Мегаполимеры гиалуронана ингибируют пролиферацию и миграцию клеток. Под действием гиалуронидаз происходит фрагментирование гиалуронана. В опухолях наблюдается повышенный уровень экспрессии гиалуронидазы HYAL1, образующей низкомолекулярные олигомеры. В отличие от высокомолекулярных форм, низкомолекулярный гиалуронан активирует внутриклеточную трансдукцию пролиферативных сигналов. Регуляторные эффекты гиалуронана реализуются при взаимодействии со специфическими мембранными рецепторами. Рецептор CD44 участвует во всех метаболических и сигнальных реакциях гиалуронана. Действие рецепторных комплексов гиалуронан-СD44 зависит от линейных размеров полимерного лиганда. Связывание CD44 с низкомолекулярными олигомерами активирует в клетках протеинкиназу В и каскад митоген-активируемых протеинкиназ, инициируя локальный ангиогенез и рост опухоли. Мегаполимерные молекулы гиалуронана оказывают обратное ингибирующее воздействие на опухоли за счет высоковалентной кластеризации CD44 и конкуренции с низковалентными олигомерами гиалуроновой кислоты. Ангиогенный эффект наблюдается у фракций гиалуронана в диапазоне 4-20 кДа. Олигомеры гиалуроновой кислоты стимулируют пролиферацию, активируя взаимодействие CD44 с рецепторами эпидермального фактора роста (ErbB2) и киназой фокальной адгезии (FAK). Тканеспецифичные рецепторные белки гиалуронана выполняют более узкие функции. Рецепторы LYVE-1 и HARE участвуют в эндоцитозе гиалуронана и катаболизме в лимфатической системе, печени, почках, селезенке. RHAMM контролирует миграционные и адгезивные эффекты гиалуронана в опухолях. Toll-подобные рецепторы TLR4 стимулируют опухолевый ангиогенез, активируя в эндотелиальных клетках сигнальный путь NF-кВ.

Ключевые слова: гиалуроновая кислота, гиалуронансинтаза, гиалуронидаза HYAL1, рецептор CD44, LYVE-1, RHAMM, HARE, TLR4, NF- κB

DOI: 10.31857/S0132342322050116

СОДЕРЖАНИЕ	
ВВЕДЕНИЕ	508
БИОСИНТЕЗ И БИОДЕГРАДАЦИЯ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ	510
СИГНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕЦЕПТОРОВ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ	
КАНЦЕРОГЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО	
ГИАЛУРОНАНА	514
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	515

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ......516

введение

Гиалуроновая кислота — основной макромолекулярный компонент соединительной ткани. Впервые это вещество было выделено из стекловидного тела глаза (греч. *hyalos*), что в дальнейшем нашло отражение в его названии [1]. В водной среде гиалуроновая кислота находится в промежуточной полианионной форме, вследствие чего широко употребляется синоним гиалуронан

[#]Автор для связи: (эл. почта: khegay@bionet.nsc.ru).





Молекула воды

Рис. 1. Структура гиалуронана в водных растворах. Пунктиром показаны внутримолекулярные и межмолекулярные водородные связи. Рисунок адаптирован из статьи Fallacara et al. [3].

[2]. Химическая структура молекулы представляет собой сополимер из чередующихся остатков D-глюкуроновой кислоты и D-*N*-ацетилглюкозамина, соединенных поочередно β-1,4- и β-1,3гликозидными связями. β-Конформация моносахаридов способствует образованию энергетически выгодной конфигурации молекулы с оптимальным расположением функциональных групп. Гиалуроновая кислота – единственный несульфатированный линейный гликозаминогликан. В отличие от сульфатированных гликозаминогликанов, взаимодействующих преимущественно с белками с образованием ковалентно сшитых протеогликанов, гиалуроновая кислота связывается прежде всего с водой в межклеточном веществе. Карбоксильные, гидроксильные и ацетамидные группы анионного гетерополисахарида придают молекуле гидрофильные свойства. Фиксация воды происходит за счет образования межмолекулярных водородных связей с карбоксильной и ацетамидной группами, расположенными в соседних мономерных звеньях гиалуронана (рис. 1) [3]. Число сольватированных молекул зависит от длины полимера.

Гиалуроновая кислота выполняет функцию основного депо внеклеточной воды в межклеточном матриксе. Высокая гигроскопичность определяет такие уникальные физико-химические свойства гиалуронана, как упругость в составе гиалинового хряща, смачиваемость в синовиальной жидкости суставов и способность образовывать гели. Вязкость гелей зависит от размеров молекул гиалуроновой кислоты и массы гидратной оболочки [4]. Гели гиалуроновой кислоты нетоксичны и активно используются для синтеза трехмерных скаффолдов в клеточной и тканевой биоинженерии. Скаффолды на основе гиалуронана, модифицированного винильными группами, применяются в клеточной терапии ожогов кожи [5]. Действие молекулярных форм гиалуроновой кислоты распространяется на сигнальные механизмы, сопровождающие деление, миграцию и адгезию клеток. Регуляторные эффекты гиалуроновой кислоты реализуются при взаимодействии со специфическими рецепторами и оказывают влияние практически на все стадии морфогенеза нормальных и опухолевых тканей, участвуя в ак-

Сокращения: АКТ – протеинкиназа В (АКR thymoma oncogene); CD44 - кластер дифференцировки 44 (cluster of differentiation 44); ERK1/2 – киназа 1/2, регулируемая внеклеточными сигналами (extracellular signal-regulated kinase 1/2); ERM – эзрин, радиксин, моэзин (ezrin, radixin, moesin); EGFR – рецептор эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor); ErbB2 – рецептор В2 эпидермального фактора роста (erythroblastic leukemia oncogene homolog B2); FAK – киназа фокальной адгезии (focal adhesion kinase); HARE – рецептор эндоцитоза гиалуронана (hyaluronan receptor for endocytosis); HAS1, 2, 3 – гиалуронансинтазы 1, 2, 3 (hyaluronan synthases 1, 2, 3); HYAL1, 2 гиалуронидазы 1, 2 (hyaluronidases 1, 2); IGF1R- β – рецептор β инсулиноподобного фактора роста (insulin-like growth factor-1 receptor β); $I\kappa B$ – ингибитор транскрипционного фактора каппа В (inhibitor kappa B); IKK – киназа ингибитора транскрипционного фактора каппа В (ІкВ kinase); LYVE-1 – лимфатический эндотелиальный рецептор гиалуронана 1 (lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1); МАРК – каскад митоген-активируемых протеинкиназ (mitogen activated protein kinases); MD-2 – фактор 2 миелоидной дифференцировки (myeloid differentiation factor 2); МЕК1 - киназа 1 митоген-активируемой протеинкиназы (mitogen-activated protein kinase kinase); MyD88 – адаптерный белок, содержащий TIR-домен (myeloid differentiation primary response 88); NF- κ B – транскрипционный фактор каппа В (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells); PDGFR- β – рецептор бета тромбоцитарного фактора роста (platelet-derived growth factor receptor beta); PI3K- фосфоинозитид 3-киназа (phosphoinositide 3-kinase); PIP2 - фосфатидилинозитол 4,5-бифосфат (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate); RHAMM – рецептор опосредованной гиалуронаном подвижности (receptor for hyalmediated motility); TGFR uronan рецептор трансформирующего фактора роста (transforming growth factor receptor); TIR – домен гомологии Toll и интерлейкина-1 (Tollinterleukin-1 receptor); TIRAP - адаптерный белок, содержащий TIR-домен (Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein); TLR4 – Toll-подобный рецептор 4 (Tolllike receptor 4); VEGFR3 – рецептор 3 васкулоэндотелиального фактора роста (vascular endothelial growth factor receptor 3).

тивации либо в ингибировании клеточной пролиферации в зависимости от молекулярного веса лиганда [6, 7]. Различные типы молекул гиалуронана формируются в результате сбалансированного действия ферментов синтеза и гидролиза гиалуроновой кислоты. Гиалуроновая кислота характеризуется достаточно высокой скоростью метаболизма, в сутки обновляется примерно треть от ее содержания в организме [8].

БИОСИНТЕЗ И БИОДЕГРАДАЦИЯ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Ферментативный синтез гиалуроновой кислоты выполняют гомологичные гиалуронансинтазы HAS1, HAS2 и HAS3, интегрированные в плазматическую мембрану фибробластов, макрофагов, эндотелиоцитов соединительной ткани и эпидермальных кератиноцитов [9, 10]. В отличие от большинства гликозаминогликанов, формирующихся в аппарате Гольджи одновременно со структурными белками, гиалуроновая кислота собирается в полимерную цепь из моносахаридов непосредственно на поверхности клетки с внутренней стороны клеточной мембраны. Синтезированные молекулы проходят сквозь мембрану и выводятся во внеклеточное пространство через каналы, образованные гиалуронансинтазами. В качестве источника энергии в реакции полимеризации используется уридинтрифосфат (UTP). Моносахариды предварительно вступают в реакцию с UTP и после отшепления одной фосфатной группы образуют UDP-активированный субстрат. Присоединение моносахаридного звена к цепи и продвижение сквозь мембрану сопровождается отщеплением UDP [11]. Гены, кодирующие гиалуронансинтазы HAS, локализованы в разных хромосомах и характеризуются различным уровнем экспрессии в зависимости от типа клеток [12]. Изоферменты гиалуронансинтазы синтезируют продукты различной длины и обеспечивают широкую вариабельность физиологических эффектов гиалуронана в тканях. На культурах клеток показано, что фермент HAS1 синтезирует у млекопитающих полимер с молекулярной массой в диапазоне от 2×10^2 до 2×10^3 кДа. НАS2 продуцирует более крупные молекулы, превышающие 2 × $\times 10^3$ кДа, а для HAS3 характерны более короткие цепи ~1 × 10² кДа [13]. У человека и мыши HAS1 и HAS2 синтезируют длинные полимеры размером до 4×10^3 кДа, а HAS3 – относительно короткие, менее 3×10^2 кДа. Синтаза HAS3 обладает наиболее высокой ферментативной активностью [14]. В то же время эксперименты на мышах с нокаутом генов показали, что ключевое значение имеет гиалуронансинтаза HAS2 — отсутствие фермента вызывает преждевременную гибель на стадии эмбрионов [15]. Мыши с нокаутом генов HAS1 и

HAS3 не имели отклонений в развитии и давали фертильное потомство [16].

Уровень транскрипции гиалуронансинтаз регулируется ростовыми факторами и цитокинами. Экспрессия HAS1 и HAS2 в фибробластах дермы кожи активируется трансформирующим фактором роста TGF- β 1 и хемокином SDF-1 [17, 18]. Эпидермальный фактор роста EGF стимулирует экспрессию HAS2 и секрецию гиалуронана в эпидермальных кератиноцитах [19]. Во многих опухолевых тканях наблюдается сверхэкспрессия отдельных изоформ гиалуронансинтаз и предварительное накопление гиалуронана до начала структурной реорганизации и неоваскуляризации. Показано, что ингибирование активности синтаз HAS2 и HAS3 изменяет структуру перицеллюлярного матрикса и останавливает митотическую активность опухолевых клеток простаты [20]. Существуют регуляторные цепи с обратной связью между синтезом и деградацией гиалуроновой кислоты. Так, работа ферментов HAS1 и HAS2 приводит к увеличению концентрации гиалуронана с большим молекулярным весом, а высокомолекулярные фракции, в свою очередь, обладают свойством активировать гиалуронидазы – ферменты, катализирующие обратный гидролиз макромолекул [21].

Биодеградация гиалуроновой кислоты осушествляется за счет последовательного расщепления с участием нескольких ферментов в зависимости от исходных размеров полимерного субстрата. В геноме человека и мыши локализованы шесть гомологичных генов, кодирующих ферменты с гиалуронидазной активностью [22]. Основную функцию выполняют повсеместно экспрессирующиеся гиалуронидазы HYAL1 и HYAL2 [23]. На начальных стадиях гидролиза высокомолекулярного гиалуронана активен фермент HYAL2. На С-конце молекулы HYAL2 содержится гликолипид гликозилфосфатидилинозитол, фиксирующий фермент на клеточной мембране. HYAL2 разрезает внеклеточную гиалуроновую кислоту на фрагменты ~2 × 10 кДа. Далее молекулы гиалуронана вступают во взаимодействие с локализованными на мембране рецепторными белками, собираются в кластеры и упаковываются в липидные эндосомы [24]. Интернализация и эндоцитоз гликан-рецепторных комплексов – это клатринзависимые процессы [25]. Эндосомы втягиваются внутрь, теряют клатриновую оболочку и сливаются с лизосомами [26, 27]. В лизосомальных везикулах продолжается дальнейший гидролиз гиалуронана. Фермент гиалуронидаза HYAL1 расщепляет молекулы до уровня тетрамеров, а лизосомальные гидролазы β-глюкуронидаза и β-*N*-ацетилглюкозаминидаза превращают их в отдельные дисахариды и моносахариды [8, 21, 22]. В опухолях часто обнаруживается повышенный уровень экспрессии гиалуронидазы HYAL1. Данный фермент обладает максимальной активностью в условиях ацидозного закисления среды, характерного для опухолевых тканей [28, 29]. Показано, что экспрессия гена *HYAL1* в опухолях регулируется эпигенетическими факторами – метилированием либо деметилированием промоторной области [30]. В нормальном физиологическом состоянии наблюдается сбалансированная активность гиалуронидаз. Фермент HYAL2 образует фрагменты гиалуронана, способные вовлекаться в эндоцитозные кавеолы, а внутриклеточная гиалуронидаза HYAL1 редуцирует их до состояния субстрата, используемого для синтеза новой гиалуроновой кислоты [31].

В процессе биосинтеза и биодеградации гиалуронана в ферментативных реакциях участвует ряд вспомогательных белков. В данную группу входят белки, обладающие способностью образовывать ионные связи с гиалуронаном. Собранные по этому признаку белки образуют гетерогенное семейство гиладгеринов. Гиладгерины присутствуют в межклеточном матриксе, на клеточных мембранах и внутри клеток. Взаимодействие с гиалуронаном осуществляется по имеющимся в гиладгеринах специфическим связывающим доменам. Обычно в их состав входит пептидный фрагмент, состоящий из ~100 а.о., впервые выделенный из протеинов хряща и впоследствии идентифицированный как консенсусный связывающий модуль. Третичная структура связывающего модуля представляет собой глобулу из двух α-спиралей и двух антипараллельных В-складчатых трехцепочечных листов, стабилизированных двумя консервативными дисульфидными мостиками и способных самостоятельно с высокой аффинностью связываться с гиалуронаном [32]. Наиболее хорошо изучена структура связывающего домена в молекуле аггрекана-протеогликана, фиксирующего гиалуроновую кислоту вместе с водой в гиалиновом хряще. *N*-Концевой глобулярный субдомен G1 состоит из иммуноглобулинового модуля и тандема консенсусных связывающих модулей. Следующие за субдоменом G1 гомологичные субдомены G2 и G3 разделены гликозаминогликановой вставкой и участвуют в процессинге и секреции аггрекана. На С-конце расположен трансмембранный домен. Связывающие домены большинства гиалуронан-связывающих белков имеют структуру, гомологичную глобулярному субдомену G1 аггрекана в различной комбинации с иммуноглобулиновыми модулями и трансмембранными доменами. Специфичный для головного мозга гиладгерин BRAL1 представляет собой транкированный с С-конца связывающий домен аггрекана с сохранившимся на *N*-конце глобулярным субдоменом G1. Связывающий домен интегрального белка CD44 состоит из единичного консенсусного связывающего модуля, фланкированного трансмембранным доменом,

гликозаминогликановой вставкой и цитоплазматическим доменом [33]. Гиладгерины, локализованные на клеточных мембранах, выполняют функцию трансмембранных рецепторов, опосредующих сигнальные эффекты гиалуронана.

СИГНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕЦЕПТОРОВ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Наиболее важный мембранный рецептор гиалуронана - повсеместно экспрессирующийся интегральный гликопептид CD44, участвующий в связывании свободных молекул внеклеточной гиалуроновой кислоты для последующего включения в состав эндосом [34]. Помимо эндоцитоза рецепторы CD44 участвуют в сигнальной трансдукции пролиферативных эффектов гиалуронана. Сигнальная функция рецепторных комплексов CD44-гиалуронан проявляется в способности самостоятельно и в качестве корецепторов ростовых факторов регулировать клеточную пролиферацию, миграцию и адгезию. В нормальных тканях преимущественно экспрессируется стандартная изоформа CD44. В кератиноцитах, макрофагах и, наиболее часто, в опухолях выявляются альтернативно сплайсированные варианты CD44. Включение дополнительных экзонов происходит в участки транскрипта, кодирующие внеклеточный домен [35]. Для злокачественных опухолевых клеток характерны конститутивная экспрессия CD44 и альтернативный сплайсинг. Альтернативные изоформы CD44 повышают адгезию и выживаемость опухолевых клеток, ингибируя апоптоз [36]. В опухолях наблюдается повышенная концентрация гиалуроновой кислоты. Гиалуронан – основной лиганд для всех изоформ CD44. Взаимодействие CD44 с высокомолекулярным гиалуронаном способствует формированию гликокаликсной оболочки, защищающей от действия цитотоксических факторов, а рецепторные комплексы с низкомолекулярными фрагментами гиалуронана инициируют миграцию клеток и ангиогенез [37]. Механизм действия CD44 сопряжен с тирозинкиназными рецепторами и внутри клетки переключается на пролиферативные сигнальные каскады. Эктодомен CD44, посттрансляционно модифицированный хондроитинсульфатом, способен связываться с фактором роста фибробластов FGF, васкулоэндотелиальным фактором роста VEGF и фактором роста гепатоцитов HGF [38, 39]. Посттрансляционное фосфорилирование трансмембранного и цитоплазматического доменов CD44 увеличивает сродство эктодомена к рецепторам эпидермального фактора роста EGFR, инсулиноподобного фактора роста IGF1R- β , тромбоцитарного фактора роста PDGFR-β и трансформирующего фактора роста TGFR. Взаимодействие CD44 с ростовыми факторами и рецепторами ростовых факторов активирует сигнальные пути фосфоинозитид-3-киназа/АКТ и каскад митоген-активируемых протеинкиназ, обеспечивая повышенную выживаемость и рост опухолевых клеток [40].

Миграционные эффекты CD44 опосредуются через изменение свойств кортикального актинового цитоскелета. Цитоплазматический домен CD44 способен связываться с белками семейства ERM. Три близкородственных белка-паралога – эзрин, радиксин и моэзин – функционируют как кросс-линкеры, связывающие плазматическую мембрану с актиновым цитоскелетом [38]. В свободном состоянии белки ERM замкнуты в кольцо, внутри которого *N*-концевой домен сцеплен с собственным С-концом. Взаимодействие *N*-концевого домена с фосфолипидом PIP2 и фосфорилирование консервативного треонина в С-концевом домене размыкает кольцо и активирует на *N*-конце сайты связывания с мембраной, а на *C*-конце – связь с актиновыми филаментами [41, 42]. N-Концевой домен белков ERM прикрепляется к рецептору CD44 через сайт анкирина. Анкирины участвуют в присоединении кортикального актинового цитоскелета к трансмембранным белкам в эритроцитах и нервной ткани [43]. Центральная часть молекулы белков ERM представлена α-спиральным сегментом, связывающим регуляторные субъединицы протеинкиназы А, а С-концевой домен непосредственно фиксируется на β-актине [44]. Важная сигнальная функция белков ERM – активация протеинкиназы А и одновременно с этим пространственно-временная компартментализация сАМР-зависимых процессов внутри клетки [45].

Рецепторные комплексы CD44—гиалуронан обладают способностью взаимодействовать с фибриллярными белками соединительной ткани и матриксными металлопротеиназами, вовлекаемыми в пролиферативные процессы [40]. Мембранная матриксная металлопротеиназа МТ1-ММР отделяет цитоплазматический домен CD44, транслоцирующийся в ядро и активирующий транскрипцию генов *NOTCH1* и *MMP-9*. Белок NOTCH1 содержит множественные EGF-подобные повторы, распознаваемые рецепторами эпидермального фактора роста. Металлопротеиназа MMP-9 разрушает коллаген внеклеточного матрикса и участвует в прорастании метастазов и васкуляризации опухолей [35, 46].

Взаимодействие с разнообразными ростовыми факторами, рецепторами ростовых факторов, цитокинами и белками соединительной ткани позволяет рассматривать рецептор CD44 как первичный по значимости мультифункциональный регулятор с широким спектром действия при воспалительных и регенеративных процессах в нормальной ткани и прогрессирующей опухоли [24, 47, 48]. Существует ряд других мембранных рецепторов гиалуронана, принимающих участие в совместной с CD44 регуляции пролиферации. Это в первую очередь гликопротеины LYVE-1, RHAMM, HARE и Toll-подобный рецептор TLR4, выполняющие более специализированные функции [28]. На рис. 2 представлена схема сигнальных эффектов рецепторов, регулирующих пролиферацию клеток [49].

Гликопротеин LYVE-1 - гомолог CD44, экспрессирующийся преимущественно в сосудах и протоках лимфатической системы. Молекулы LYVE-1 работают как лиганд-специфические транспортеры гиалуронана с поверхности плазматической мембраны во внутриклеточные органеллы в лимфатических эндотелиальных клетках и вовлечены в катаболизм гиалуронана в лимфоузлах. LYVE-1 обладают более высоким сродством к гиалуронану, чем рецепторы CD44 [50]. Связывающий домен рецептора LYVE-1 устроен так же, как аналогичный домен рецептора CD44. При идентичной композиции функциональных субдоменов в молекуле LYVE-1 отсутствует только характерный для CD44 гликозаминогликановый субдомен [51]. Несмотря на максимальную схожесть, связывающий домен LYVE-1 имеет более компактную структуру и повышенную чувствительность к ионной силе раствора. влияющей на образование водородных связей. Если растворимые мономеры CD44 способны самостоятельно взаимодействовать с гиалуронаном, то рецепторам LYVE-1 для этого необходимо предварительно образовывать димеры. Предполагается, что в отличие от CD44, димеры рецепторов LYVE-1 связывают и транспортируют внутрь клетки преимущественно высокомолекулярный гиалуронан, инициируя внутриклеточный катаболизм. Показано, что в лимфатических сосудах наблюдается коэкспрессия LYVE-1 и рецептора васкулоэндотелиального фактора роста VEGFR3. Рецепторы VEGFR3 – маркеры лимфатического эндотелия, их совместная детекция с LYVE-1 может быть использована для диагностики опухолевого лимфоангиогенеза [52].

Миграционные и митогенные эффекты гиалуронана связаны с участием второго по значимости после CD44 рецептора RHAMM. В опытах на CD44-дефицитных мышах было установлено, что RHAMM активирует и поддерживает воспалительные процессы даже более эффективно, чем CD44 [53]. Прогрессия опухолей обычно сопровождается сверхэкспрессией RHAMM и альтернативным сплайсингом. Альтернативно сплайсированные варианты RHAMM имеют различную локализацию в пределах клетки. Белки RHAMM фиксируются как на внешней мембране, так и в цитоскелете и ядре. Действие молекул RHAMM направлено на стимуляцию двигательной активности клеток [54, 55]. Функцию связывающего домена RHAMM выполняет тандем уникальных



Рис. 2. Мембранные рецепторы гиалуронана, участвующие в прогрессии опухолей. НАRE – рецептор эндоцитоза гиалуронана; RHAMM – рецептор опосредованной гиалуронаном подвижности; CD44 – первичный рецептор гиалуронана; LYVE-1 – лимфатический эндотелиальный рецептор гиалуронана 1; TLR4 – Toll-подобный рецептор 4; IKK – киназа ингибитора транскрипционного фактора каппа В; IкB – ингибитор транскрипционного фактора каппа В; NF-кB – транскрипционный фактор каппа В; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа; FAK – киназа фокальной адгезии; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; Akt – протеинкиназа В; TIRAP – адаптерный белок, содержащий TIRдомен гомологии Toll-рецепторов и IL-1; MyD88 – адаптерный белок, содержащий TIR-домен. Рисунок адаптирован из статьи Alaniz et al. [49].

мотивов ВХ7В, представляющих собой последовательность из семи положительно заряженных аминокислот, фланкированных лизином или аргинином [56]. Белок RHAMM не содержит трансмембранного домена и обычно локализован внутри клетки. Выход на внешнюю мембрану происходит под действием цитокинов, в частности трансформирующего ростового фактора TGF-β. На поверхности клетки RHAMM способен образовывать рецепторные комплексы с CD44 и EGFR и инициировать прогрессию опухолей [57]. В цитоплазме молекулы RHAMM находятся в ассоциированном состоянии с тубулиновым цитоскелетом и взаимодействуют с белками восприимчивости к раку BRCA1, участвуя в совместной регуляции митоза. Внутри клетки комплекс гиалуронан-RHAMM активирует сигнальный каскад MEK1/ERK1/2 и транспорт митоген-активируемых киназ в ядро [58, 59].

Рецептор HARE экспрессируется в синусоидальных эндотелиальных клетках печени, селезенки и лимфоузлов, а также в эпителии хрусталика глаза, собирательных трубках почки и яйцевода [60]. Печень, почки и селезенка совместно с лимфоузлами образуют общую систему рециркуляции гиалуроновой кислоты в организме. Гиладгерин HARE функционирует как мембранный сорбент гиалуронана, очищающий кровь и лимфу от продуктов катаболизма. Действие рецепторов HARE основано на клатрин-опосредованном эн-

изма. Действие рецепторов уроновой кислоты разматрин-опосредованном эн- Рецепторы HARE акти

доцитозе гиалуроновой кислоты. Кластеры рецепторных комплексов гиалуронан-HARE arpeгируют адаптерные белки АР2, связанные с фосфоинозитидами плазматической мембраны и клатриновой оболочкой. В отличие от других рецепторов гиалуронана, рецепторы HARE преимущественно находятся в состоянии адгезии с белками клатриновых пузырьков и постоянно рециркулируют между вне- и внутриклеточными компартментами [61]. Связывающий модуль НАRE состоит из трансмембранного домена и четырех уникальных мотивов в цитоплазматическом отделе, непосредственно участвующих в связывании гиалуронана. Связывающие мотивы имеют следующие аминокислотные составы: M1 – YSYFR¹²⁴⁸⁵, M2 – FQHF²⁴⁹⁵, M3 – NPLY²⁵¹⁹и $M4 - DPF^{2534}$. Делеционным анализом установлено, что для эндоцитоза гиалуронана наиболее важное значение имеет мотив МЗ [62]. Сигнальная функция рецепторов HARE была продемонстрирована в экспериментах по лигандной специфичности рецепторных комплексов гиалуронан-HARE. Рецепторы HARE дозозависимо активировали митогенный каскад ERK1/2 и стимулировали экспрессию NF-кВ-индуцируемых генов. Стимулирующее действие рецепторов HARE реализуется исключительно при взаимодействии с промежуточными фракциями гиалуроновой кислоты размером 40-400 кДа [63, 64]. Рецепторы HARE активны только в составе димеров. Предполагается, что связывание мегамолекулярной гиалуроновой кислоты искажает и нарушает функционально активную конформацию димеров. В свою очередь, слишком короткие фрагменты неспособны к активации и стабилизации димеров вследствие недостаточных размеров. Обладая свойством сигнального рецептора, реагирующего на промежуточные продукты деградации гиалуронана, НАRE могут выполнять функцию детектора разрушения соединительной ткани при стрессовых состояниях и онкогенезе [65].

Антиген-презентирующие, эпителиальные и эндотелиальные клетки экспрессируют Toll-подобные рецепторы TLR4 [66, 67]. В последнее время появилась информация по экспрессии TLR4 в опухолях [68, 69]. Распад соединительной ткани при воспалительных процессах и канцерогенезе сопровождается накоплением низкомолекулярных фракций гиалуронана. Рецепторы TLR4 обладают свойством связывать низкомолекулярные фракции гиалуроновой кислоты. Функцию связывающего модуля выполняет эктодомен, состоящий из тандемных копий лейцинбогатых повторов (LRR) [70]. Взаимодействие TLR4 с гиалуронаном происходит при участии кофактора MD-2, а через TIR-домены сигнал распространяется внутрь клетки [71]. В конечном итоге активируется сигнальный путь транскрипционного фактора NF-кВ [72]. Гиалуронан в данном случае действует как олигосахаридный лиганд, стимулирующий врожденный клеточный иммунный ответ [73]. Рецепция олигосахаридов индуцирует образование димеров из неактивных мономеров рецепторного комплекса TLR4-MD-2. Спаривание молекулы TLR4 по всей длине способствует образованию и активации дуплекса гомологичных TIR-доменов в цитоплазматической части комплекса. Активированные рецепторы TLR4 вступают во взаимодействие с внутриклеточными адаптерными белками TIRAP и MyD88, содержащими в своем составе аналогичные TIRдомены. TIR-домены TLR4, TIRAP и MvD88 образуют межмолекулярные связи и переключают сигнал TLR4-рецепторов на киназный комплекс ІКК. Киназа ІКК фосфорилирует ингибиторы ІкВ транскрипционного фактора NF-кВ. Фосфорилирование ІкВ высвобождает и перемещает в ядро димеры NF-кВ для участия в регуляции транскрипции генов, ответственных за пролиферацию клеток и апоптоз [74]. Показано, что рецепция олигомерного гиалуронана оказывает антиапоптотический эффект и повышает выживаемость клеток [75]. У мутантных мышей с отсутствием рецепторов TLR4 наблюдается снижение базальной активности сигнального пути NF-кВ и повышение уровня клеточного апоптоза в легочном эпителии [76, 77].

КАНЦЕРОГЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ГИАЛУРОНАНА

Важная особенность взаимодействия гиалуроновой кислоты с гиладгеринами – способность макромолекулярного поливалентного лиганда связываться одновременно с десятками разных рецепторов и белков. При этом происходит интеграция внутриклеточных процессов и распространение сигналов на соседние клетки [28, 78]. Как субстрат и одновременно лиганд, молекула гиалуроновой кислоты физически связывает гиалуронансинтазу HAS2 и гиалуронидазу HYAL2 с рецептором CD44, локализованным на плазматической мембране клеток. Данный комплекс контролирует фрагментацию гиалуронана и функционирует как механизм аутокринной регуляции подвижности клеток, играющий важную роль на начальных стадиях метастазирования опухолей [79]. Другой не менее важный параметр для функционирования гиалуронан-рецепторных комплексов – зависимость от размеров лиганда [8]. В нормальных физиологических условиях гиалуронан представлен преимущественно мегаполимерами с молекулярным весом не менее 10³ кДа. Нативная гиалуроновая кислота обладает противовоспалительными и антиангиогенными свойствами вслелствие способности ингибировать межклеточные взаимодействия [80]. Показано, что невосприимчивость к раку у грызунов вида *Heterocephalus glaber* (голый землекоп) коррелирует с повышенным содержанием высокомолекулярного гиалуронана в тканях. В данном случае накопление вещества связано с особо стабильной структурой гиалуронансинтазы HAS2 одновременно с пониженной активностью гиалуронидаз [81]. Большинство эпителиальных и мезенхимальных клеток в той или иной мере обладают способностью синтезировать и секретировать высокомолекулярный гиалуронан [11, 82]. Гиалуронидаза HYAL2, действующая совместно с рецептором CD44, образупромежуточные фракции гиалуронана, ет разрезая нативную гиалуроновую кислоту на фрагменты ~10¹-10³ кДа [83]. Низкомолекулярный гиалуронан появляется в результате гидролитической активности HYAL1. Фермент, локализованный в лизосомах, участвует во внутриклеточном катаболизме гиалуронана. В сыворотке крови, синовиальной жидкости и моче присутствует свободная растворимая форма HYAL1 [84]. Олигомеры гиалуронана имеют жесткую прямолинейную структуру, в то время как мегаполимеры способны изгибаться и принимать спиралевидную форму [85]. С учетом различий в проявляемых свойствах гиалуронан принято подразделять на несколько категорий. Высокомолекулярный гиалуронан имеет вес 10³-10⁴ кДа и выше. Промежуточное состояние занимает диапазон 10²-10³ кДа, а более

2022

мелкие фракции относятся к низкомолекулярному гиалуронану и олигомерам [63].

Во многих опухолях наблюдается сверхэкспрессия гиалуронансинтаз и накопление высокомолекулярного гиалуронана на начальных стадиях опухолевого роста. Одна из характерных особенностей желудочно-кишечных карцином и аденокаршином — эктопическая продукция гиалуронана. Дальнейшее развитие патологических процессов сопровождается усилением активности гидролитических ферментов. Ацидозное закисление среды, характерное для прогрессирующей опухоли, стимулирует повышенную экспрессию гиалуронидазы HYAL1. Фермент HYAL1 при низких значениях рН формирует дополнительный пул короткоцепочечных олигомеров гиалуронана, запускающих механизм реорганизации внеклеточного матрикса [28]. Образование низкомолекулярных фрагментов гиалуронана в соединительной ткани тесно связано с малигнизацией опухоли [86]. Взаимодействие олигомеров гиалуронана с CD44 инициирует фосфорилирование и активацию тирозинкиназных рецепторов ростовых факторов и участвует в образовании сигнального комплекса фосфоинозитид-3-киназа (РІЗК)/протеинкиназа В (АКТ), ответственного за уход от апоптоза и пролиферацию опухолевых клеток [87]. Сигнальный механизм протеинкиназы В направлен на активацию клеточной миграции [88]. Одновременно рецепторный комплекс гиалуронан-CD44 активирует FAK (киназу фокальной адгезии), регулирующую структуру кортикального цитоскелета и полярность в мигрирующих клетках [89]. Действие низкомолекулярного гиалуронана через TLR4-рецепторы стимулирует сигнальный путь NF-кВ и секрецию металлопротеиназ, участвующих в реорганизации внеклеточного матрикса [90].

В настоящее время рассматривается несколько вариантов вовлечения гиалуроновой кислоты в прогрессию опухолей. Свежесинтезированная гиалуроновая кислота образует гликокаликсную оболочку, защищающую опухолевую клетку от механических повреждений и цитотоксических воздействий. Гиалуроновый гликокаликс принимает участие в коммуникации и адгезии метастазируюших клеток. Короткие фрагменты гиалуронана активируют пролиферацию и ангиогенез в опухолевой ткани. Митогенный и ангиогенный эффекты реализуются через рецепторы CD44, RHAMM и TLR4. Дендритные клетки, несущие TLR4-рецепторы, после распознавания низкомолекулярного гиалуронана активируются и переходят в зрелую форму, способную синтезировать и секретировать васкулоэндотелиальный фактор роста VEGF [91]. VEGF стимулирует опухолевый ангиогенез. Взаимодействие гиалуронана с рецепторами RHAMM, локализованными в эндотелиоцитах, усиливает рост и миграцию клеток, действуя

В опухолевых клетках, конститутивно экспрессирующих рецептор CD44, связывание низкомолекулярного гиалуронана индуцирует фосфатидилинозитол-3-киназный путь и многократно увеличивает продукцию металлопротеиназ 2 и 9. Металлопротеиназы разрушают компоненты внеклеточного матрикса и способствуют дальнейшему росту и прорастанию кровеносных сосудов в опухолевую ткань [93, 94]. Детальный анализ зависимости ангиогенеза от размеров лиганда на модельной системе кроветворения САМ (chicken chorio-allantoic membrane) показал, что наиболее выраженными ангиогенными свойствами обладает гиалуронан в диапазоне 4-20 кДа. Более мелкие фрагменты не оказывают эффекта. а более крупные молекулы ингибируют пролиферацию и миграцию эндотелиоцитов [95]. Взаимодействие низкомолекулярного гиалуронана с рецепторами CD44 и RHAMM инициирует миграцию клеток в кровеносные и лимфатические сосуды и образование вторичных метастазов [96]. Высокая концентрация метаболитов гиалуроновой кислоты в соединительной ткани – фактор, стимулирующий прогрессию опухолей.

через сигнальный каскад MEK1/ERK1/2 [58, 92].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гиалуроновая кислота (гиалуронан) – это основной макромолекулярный компонент, определяющий физико-химические свойства внеклеточного матрикса. Гиалуронан представляет собой линейный несульфатированный гликозаминогликан, обладающий высокой гигроскопичностью и полиаффинностью, участвует в миграции, адгезии и агрегации пролиферирующих клеток. Взаимодействие с мембранными рецепторами обусловливает сигнальные функции гиалуроновой кислоты. Секретированные молекулы гиалуронана связываются прежде всего со своим повсеместно экспрессирующимся первичным рецептором CD44. CD44-гиалуронан Рецепторные комплексы участвуют во внутриклеточной трансдукции пролиферативных сигналов цитокинов и ростовых факторов. Регуляторные эффекты рецепторных комплексов зависят от молекулярного веса гиалуронана. В опухолевых клетках наблюдается повышенный уровень активности гиалуронидазы HYAL1 и высокая концентрация низкомолекулярных (<100 кДа) фрагментов гиалуроновой кислоты. В отличие от высокомолекулярной гиалуроновой кислоты. низкомолекулярный гиалуронан стимулирует провоспалительные и ангиогенные процессы в опухолях. В реализации сигнальных эффектов участвуют тканеспецифичные мембранные рецепторы гиалуронана, не обладающие универсальными свойствами CD44 и выполняющие специализированные функции. Рецептор LYVE-1 экспрессируется в сосудах лимфатической системы и функционирует как лиганд-специфический транспортер гиалуронана с поверхности клеток в лизосомы. Димеры рецепторов LYVE-1 обладают более высоким сродством к гиалуронану, чем мономеры CD44, и взаимодействуют преимущественно с высокомолекулярным гиалуронаном. Рецепторы RHAMM локализуются как вне, так и внутри клеток, обеспечивая миграционные и алгезивные эффекты гиалуронана в опухолях. Эндотелиальные рецепторы HARE совместно с CD44 участвуют в клатрин-опосредованном эндоцитозе в печени, почках, селезенке. Рецепторы HARE сорбируют и очищают кровь и лимфу от промежуточных продуктов катаболизма гиалуронана, постоянно реширкулируя межлу внеклеточными и внутриклеточными компартментами. Toll-подобные рецепторы TLR4 связывают низкомолекулярный гиалуронан. Короткие олигомеры инициируют образование активных димеров TLR4, взаимодействие с цитоплазматическими адаптерными белками, активацию транскрипционного фактора NF-кВ и усиление транскрипции генов, ответственных за пролиферацию и антиапоптоз. Регуляция метаболизма гиалуроновой кислоты – существенный фактор прогрессии опухолей. Действие высокомолекулярного гиалуронана связано преимущественно с образованием зашитного адгезивного гликокаликса. Низкомолекулярный гиалуронан выполняет функцию лиганда рецепторов, активирующих пролиферативные, миграционные и антиапоптотические процессы в опухолевых клетках.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта Института цитологии и генетики СО РАН FWNR-2022-0021, номер госрегистрации 121031700157-8.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Meyer K., Palmer J.W. // J. Biol. Chem. 1934. V. 107. P. 629–634.
- Fraser J.R.E., Laurent T.C., Laurent U.B.G. // J. Intern. Med. 1997. V. 242. P. 27–33. https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x

- Fallacara A., Baldini E., Manfredini S., Vertuani S. // Polymers (Basel). 2018. V. 10. P. 701–737. https://doi.org/10.3390/polym10070701
- Day A.J., Sheehan J.K. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2001. V. 11. P. 617–622. https://doi.org/10.1016/s0959-440x(00)00256-6
- Сочилина А.В., Савельев А.Г., Акасов Р.А., Зубов В.П., Хайдуков Е.В., Генералова А.Н. // Биоорг. химия. 2021.
 Т. 47. С. 486–494. [Sochilina A.V., Savelyev A.G., Akasov R.A., Zubov V.P., Khaydukov E.V., Generalova A.N. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2021. V. 47. P. 828– 836.]

https://doi.org/10.1134/S1068162021040191

- 6. Litwiniuk M., Krejner A., Speyrer M.S., Gauto A.R., Grzela T. // Wounds. 2016. V. 28. P. 78–88.
- Turley E.A., Wood D.K., McCarthy J.B. // Cancer Res. 2016. V. 76. P. 2507–2512. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3114
- 8. *Stern R.* // Eur. J. Cell Biol. 2004. V. 83. P. 317–325. https://doi.org/10.1078/0171-9335–00392
- Tammi R.H., Passi A.G., Rilla K., Karousou E., Vigetti D., Makkonen K., Tammi M.I. // FEBS J. 2011. V. 278. P. 1419–1428. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08070.x
- Calve S., Isaac J., Gumucio J.P., Mendias C.L. // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2012. V. 303. P. C577–C588. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00057.2012
- 11. Weigel P.H. // Int. J. Cell Biol. 2015. V. 2015. P. 367579. https://doi.org/10.1155/2015/367579
- Stern R., Asari A.A., Sugahara K.N. // Eur. J. Cell Biol. 2006. V. 85. P. 699–715. https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2006.05.009
- Itano N., Kimata K. // IUBMB Life. 2002. V. 54. P. 195–199. https://doi.org/10.1080/15216540214929
- 14. Girish K.S., Kemparaju K. // Life Sci. 2007. V. 80. P. 1921–1943. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.02.037
- Camenisch T.D., Spicer A.P., Brehm-Gibson T., Biesterfeldt J., Augustine M.L., Calabro A., Kubalak S., Klewer S.E., McDonald J.A. // J. Clin. Invest. 2000. V. 106. P. 349–360. https://doi.org/10.1172/JCI10272
- 16. Bai K.J., Spicer A.P., Mascarenhas M.M., Yu L., Ochoa C.D., Garg H.G., Quinn D.A. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2005. V. 172. P. 92–98. https://doi.org/10.1164/rccm.200405-652OC
- Meran S., Thomas D., Stephens P., Martin J., Bowen T., Phillips A., Steadman R. // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 25687–25697. https://doi.org/10.1074/jbc.M700773200
- Kojima Y., Acar A., Eaton E.N., Mellody K.T., Scheel C., Ben-Porath I., Onder T.T., Wang Z.C., Richardson A.L., Weinberg R.A., Orimo A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 20009–20014. https://doi.org/10.1073/pnas.1013805107
- Pienimaki J.P., Rilla K., Fulop C., Sironen R.K., Karvinen S., Pasonen S., Lammi M.J., Tammi R., Hascall V.C., Tammi M.I. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 20428– 20435. https://doi.org/10.1074/jbc.M007601200

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 48 № 5 2022

- Simpson M.A., Wilson C.M., McCarthy J.B. // Am. J. Pathol. 2002. V. 161. P. 849–857. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64245-9
- Heldin P., Lin C.Y., Kolliopoulos K., Chen Y.H., Skandalis S.S. // Matrix Biol. 2019. V. 78–79. P. 100–117. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.017
- 22. Csoka A.B., Frost G.I., Stern R. // Matrix Biol. 2001.
 V. 20. P. 499–508. https://doi.org/10.1016/s0945-053x(01)00172-x
- Krupkova O., Greutert H., Boos N., Lemcke J., Liebscher T., Wuertz-Kozak K. // Eur. Spine J. 2020. V. 29. P. 605– 615. https://doi.org/10.1007/s00586-019-06227-3
- Teder P., Vandivier R.W., Jiang D., Liang J., Cohn L., Pure E., Henson P.M., Noble P.W. // Science. 2002. V. 296. P. 155–158. https://doi.org/10.1126/science.1069659
- Torreno-Pina J.A., Castro B.M., Manzo C., Buschow S.I., Cambi A., Garcia-Parajo M.F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. P. 11037–11042. https://doi.org/10.1073/pnas.1402041111
- *Qhattal H.S.S., Liu X.* // Mol. Pharmaceutics. 2011.
 V. 8. P. 1233–1246. https://doi.org/10.1021/mp2000428b
- Kaksonen M., Roux A. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2018.
 V. 19. P. 313–326. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.132
- Toole B.P. // Nat. Rev. Cancer. 2004. V. 4. P. 528–539. https://doi.org/10.1038/nrc1391
- Tan J.-X., Wang X.-Y., Su X.-L., Li H.-Y., Shi Y., Wang L., Ren G.-S. // PLoS One. 2011. V. 6. P. e22836. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022836
- Lokeshwar V.B., Gomez P., Kramer M., Knapp J., McCornack M.A., Lopez L.E., Fregien N., Dhir N., Scherer S., Klumpp D.J., Manoharan M., Soloway M.S., Lokeshwar B.L. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 29215–29227. https://doi.org/10.1074/jbc.M801101200
- Bourguignon V., Flamion B. // FASEB J. 2016. V. 30. P. 2108–2114. https://doi.org/10.1096/fj.201500178R
- Banerji S., Hide B.R.S., John R., James J.R., Noble M.E.M., Jackson D.G. // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. P. 10724–10735. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.047647
- Day A.J., Prestwich G.D. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 4585–4588. https://doi.org/10.1074/jbc.R100036200
- Liu Y., Zhou C., Wang W., Yang J., Wang H., Hong W., Huang Y. // Mol. Pharm. 2016. V. 13. P. 4209–4221. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00870
- Senbanjo L.T., Chellaiah M.A. // Front. Cell Dev. Biol. 2017. V. 5. P. 18. https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00018
- Chen C., Zhao S., Karnad A., Freeman J.W. // J. Hematol. Oncol. 2018. V. 11. P. 64. https://doi.org/10.1186/s13045-018-0605-5
- Louderbough J.M., Schroeder J.A. // Mol. Cancer Res. 2011. V. 9. P. 1573–1586. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0156
 - БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 48 № 5 2022

- Ponta H., Sherman L., Herrlich P.A. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2003. V. 4. P. 33–45. https://doi.org/10.1038/nrm1004
- 39. Ghatak S., Hascall V.C., Markwald R.R., Misra S. // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. P. 19821–19832. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.104273
- 40. Misra S., Heldin P., Hascall V.C., Karamanos N.K., Skandalis S.S., Markwald R.R., Ghatak S. // FEBS J. 2011. V. 278. P. 1429–1443. 6 https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08071.x
- Fievet B.T., Gautreau A., Roy C., Del Maestro L., Mangeat P., Louvard D., Arpin M. // J. Cell Biol. 2004.
 V. 164. P. 653–659. https://doi.org/10.1083/jcb.200307032
- 42. Arpin M., Chirivino D., Naba A., Zwaenepoel I. // Cell Adh. Migr. 2011. V. 5. P. 199–206. https://doi.org/10.4161/cam.5.2.15081
- 43. Bennett V., Baines A.J. // Physiol. Rev. 2001. V. 81. P. 1353–1392. https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1353
- 44. Fehon R.G., McClatchey A.I., Bretscher A. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2010. V. 11. P. 276–287. https://doi.org/10.1038/nrm2866
- 45. Neisch A.L., Fehon R.G. // Curr. Opin. Cell Biol. 2011. V. 23. P. 377–382. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.04.011
- 46. Gupta A., Zhou C.Q., Chellaiah M.A. // Cancers. 2013. V. 5. P. 617–638. https://doi.org/10.3390/cancers5020617
- 47. Orian-Rousseau V., Sleeman J. // Adv. Cancer Res. 2014. V. 123. P. 231–254. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800092-2.00009-5
- 48. *Murai T.* // Front. Immunol. 2015. V. 6. P. 420. https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00420
- 49. Alaniz L., Garcia M., Rizzo M., Piccioni F, Mazzolini G. // Mini-Rev. Med. Chem. 2009. V. 9. P. 1538–1546. https://doi.org/10.2174/138955709790361485
- Kitadai Y., Kodama M., Cho S., Kuroda T., Ochiumi T., Kimura S., Tanaka S., Matsumura S., Yasui W., Chayama K. // Int. J. Cancer. 2005. V. 115. P. 388–392. https://doi.org/10.1002/ijc.20859
- Banerji S., Hide B.R., James J.R., Noble M.E.M., Jackson D.G. // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. P. 10724–10735. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.047647
- Jackson D.G., Prevo R., Clasper S., Banerji S. // Trends Immunol. 2001. V. 22. P. 317–321. https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)01936-6
- Nedvetzki S., Gonen E., Assayag N., Reich R., Williams R.O., Thurmond R.L., Huang J.-F., Neudecker B.A., Wang F.-S., Turley E.A., Naor D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 18081–18086. https://doi.org/10.1073/pnas.0407378102
- 54. Turley E.A., Naor D. // Front Biosci. (Landmark Ed). 2012. V. 17. P. 1775–1794. https://doi.org/10.2741/4018
- 55. *Misra S., Hascall V.C., Markwald R.R., Ghatak S. //* Front. Immunol. 2015. V. 6. P. 201. https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00201

- 56. Torabi F., Bogle O.A., Estanyol J.M., Oliva R., Miller D. // Mol. Hum. Reprod. 2017. V. 23. P. 803–816. https://doi.org/10.1093/molehr/gax053
- Du Y.C., Chou C.K., Klimstra D.S., Varmus H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. P. 16753–16758. https://doi.org/10.1073/pnas.1114022108
- Tolg C., Hamilton S.R., Morningstar L., Zhang J., Zhang S., Esguerra K.V., Telmer P.G., Luyt L.G., Harrison R., McCarthy J.B., Turley E.A. // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. P. 26461–26474. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.121491
- 59. Telmer P.G., Tolg C., McCarthy J.B., Turley E.A. // Commun. Integr. Biol. 2011. V. 4. P. 182–185. https://doi.org/10.4161/cib.4.2.14270
- Harris E.N., Weigel J.A., Weigel P.H. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 17341–17350. https://doi.org/10.1074/jbc.M710360200
- Bonifacino J.S., Traub L.M. // Annu. Rev. Biochem. 2003. V. 72. P. 395–447. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161800
- $\frac{1}{2} = \frac{1}{2} \frac{$
- Pandey M.S., Harris E.N., Weigel P.H. // Int. J. Cell Biol. 2015. V. 2015. P. 524707. https://doi.org/10.1155/2015/524707
- Pandey M.S., Baggenstoss B.A., Washburn J., Harris E.N., Weigel P.H. // J. Biol. Chem. 2013. V. 28. P. 14068– 14079. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.442889
- 64. Pandey M.S., Weigel P.H. // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. P. 1756–1767. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.510339
- 65. *Harris E.N., Baker E.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 3504. https://doi.org/10.3390/ijms21103504
- 66. *Vaure C., Liu Y.* // Front. Immunol. 2014. V. 5. P. 316. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00316
- Beckman J.D., Abdullah F., Chen C., Kirchner R., Rivera-Rodriguez D., Kiser Z.M., Nguyen A., Zhang P., Nguyen J., Hebbel R.P., John D. Belcher J.D., Vercellotti G.M. // Front. Immunol. 2021. V. 11. P. 613278. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.613278
- Coussens L.M., Werb Z. // Nature. 2002. V. 420. P. 860–867. https://doi.org/10.1038/nature01322
- Ahmed A., Redmond H.P., Wang J.H. // Oncoimmunology. 2013. V. 2. P. e22945. https://doi.org/10.4161/onci.22945
- 70. Kawasaki T., Kawai T. // Front. Immunol. 2014. V. 5. P. 461. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461
- Botos I., Segal D.M., Daviesa D.R. // Structure. 2011. V. 19. P. 447–459. https://doi.org/10.1016/j.str.2011.02.004
- Menghini R., Campia U., Tesauro M., Marino A., Rovella V., Rodia G., Schinzari F., Tolusso B., di Daniele N., Federici M., Zoli A., Ferraccioli G., Cardillo C. // PLoS One. 2014. V. 9. P. e99053. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099053
- 73. Scheibner K.A., Lutz M.A., Boodoo S., Fenton M.J., Powell J.D., Horton M.R. // J. Immunol. 2006. V. 177. P. 1272–1281. https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.2.1272

- 74. *Sun S.C.* // Immunol. Rev. 2012. V. 246. P. 125–140. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01088.x
- Jiang D., Liang J., Fan J., Yu S., Chen S., Luo Y., Prestwich G.D., Mascarenhas M.M., Garg H.G., Quinn D.A., Homer R.J., Goldstein D.R., Bucala R., Lee P.J., Medzhitov R., Noble P.W. // Nat. Med. 2005. V. 11. P. 1173–1179. https://doi.org/10.1038/nm1315
- 76. Jiang D., Liang J., Li Y., Noble P.W. // Cell Res. 2006. V. 16. P. 693–701. https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310085
- 77. Too L.K., Yau B., Baxter A.G., McGregor I.S., Hunt N.H. // Sci. Rep. 2019. V. 9. P. 16189. https://doi.org/10.1038/s41598-019-52212-7
- Williams K., Motiani K., Giridhar P.V., Kasper S. // Exp. Biol. Med. 2013. V. 238. P. 324–338. https://doi.org/10.1177/1535370213480714
- 79. Saito T., Kawana H., Azuma K., Toyoda A., Fujita H., Kitagawa M., Harigaya K. // Int. J. Oncol. 2011. V. 39. P. 1311–1320. https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1114
- Muto J., Yamasaki K., Taylor K.R., Gallo R.L. // Mol. Immunol. 2009. V. 47. P. 449–456. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.08.026
- Tian X., Azpurua J., Hine C., Vaidya A., Myakishev-Rempel M., Ablaeva J., Mao Z., Nevo E., Gorbunova V., Seluanov A. // Nature. 2013. V. 499. P. 346–349. https://doi.org/10.1038/nature12234
- Siiskonen H., Oikari S., Pasonen-Seppänen S., Rilla K. // Front. Immunol. 2015. V. 6. P. 43. https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00043
- Chanmee T., Ontong P., Itano N. // Cancer Lett. 2016. V. 375. P. 20–30. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.02.031
- Heldin P., Basu K., Olofsson B., Porsch H., Kozlova I., Kahata K. // J. Biochem. 2013. V. 154. P. 395–408. https://doi.org/10.1093/jb/mvt085
- Weigel P.H., Baggenstoss B.A. // Glycobiology. 2017. V. 27. P. 868–877. https://doi.org/10.1093/glycob/cwx039
- Schmaus A., Klusmeier S., Rothley M., Dimmler A., Sipos B., Faller G., Thiele W., Allgayer H., Hohenberger P., Post S., Sleeman J.P. // Br. J. Cancer. 2014. V. 111. P. 559–567. https://doi.org/10.1038/bjc.2014.332
- Misra S., Toole B.P., Ghatak S. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. P. 34936–34941. https://doi.org/10.1074/jbc.C600138200
- Park J.B., Kwak H.J., Lee S.H. // Cell Adh. Migr. 2008. V. 2. P. 202–207. https://doi.org/10.4161/cam.2.3.6320
- Fujita Y., Kitagawa M., Nakamura S., Azuma K., Ishii G., Higashi M., Kishi H., Hiwasa T., Koda K., Nakajima N., Harigaya K. // FEBS Lett. 2002. V. 528. P. 101–108. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03262-3
- 90. Voelcker V., Gebhardt M., Averbeck A., Saalbach V., Wolf F., Weih F., Sleeman J., Anderegg U., Jan Simon J. // Exp. Dermatol. 2008. V. 17. P. 100–107. https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2007.00638.x

518

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 48 № 5 2022

- Spinelli F.M., Vitale D.L., Demarchi G., Cristina C., Alaniz L. // Clin. Transl. Immunol. 2015. V. 4. P. e52. https://doi.org/10.1038/cti.2015.35
- 92. Gao F., Yang C.X., Mo W., Liu Y.W., He Y.Q. // Clin. Invest. Med. 2008. V. 31. P. E106–E116. https://doi.org/10.25011/cim.v31i3.3467
- Zhang Y., Thant A.A., Machida K., Ichigotani Y., Naito Y., Hiraiwa Y., Senga T., Sohara Y., Matsuda S., Hamaguchi M. // Cancer Res. 2002. V. 62. P. 3962– 3965.
- 94. Misra S., Heldin P., Hascall V.C., Karamanos N.K., Skandalis S.S., Markwald R.R., Ghatak S. // FEBS J. 2011. V. 278. P. 1429–1443. https://doi.org//10.1111/j.1742-4658.2011.08071.x
- 95. Cui X., Xu H., Zhou S., Zhao T., Liu A., Guo X., Tang W., Wang F. // ELife Sci. 2009. V. 85. P. 573–577. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.08.010
- 96. Bharadwaj A.G., Kovar J.L., Loughman E., Elowsky C., Oakley G.G., Simpson M.A. // Am. J. Pathol. 2009. V. 174. P. 1027–1036. https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080501

Hyaluronan Metabolism and Tumor Progression

I. I. Khegay*, #

[#]*Phone:* +7(383) 363-49-63; e-mail: khegay@bionet.nsc.ru

*Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, prosp. Akad. Lavrentieva 10, Novosibirsk, 630090 Russia

Hereditary and somatic mutations initiating cancer cells origin are the key, but not a single factor of tumor progression. Activation of tumor growth needs tight interaction with micro environment. Intercellular matrix functionates simultaneously as biomechanical supporting medium and active link in signal communication of cells. Hvaluronan is the basic plastic component of interstitial tussie. Proliferation and metastasis of tumors are accompanied by preliminary accumulation of hyaluronic acid. The ratio between hyaluronan synthase and hyaluronidase activities is important factor of tumor malignization. Hyaluronan synthases localized on plasmatic membrane form high-molecular sopolimer of D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine. Megapolymers of hyaluronan inhibit proliferation and migration of cells. Fragmentation of hyaluronan is done by hyaluronidase action. The increased level of expression of hyaluronidase HYAL1 forming low-molecular hyaluronan is observed in tumors. In opposite to high-molecular forms, low-molecular hyaluronan activates intracellular transduction of proliferative signals. The hyaluronan regulatory effects are realized by interaction with specific membrane receptors. Receptor CD44 takes part in all metabolic and signal reactions of hyaluronan. The action of hyaluronan-CD44 receptor complexes depends on lineary sizes of polymeric ligand. Binding of CD44 to low-molecular hyaluronan activates protein kinase B and cascade of mitogen-activated protein kinases, and iniciates local angiogenesis and tumor growth. Hyaluronan megapolymer molecules have an inverse inhibitory effect on tumors due to high-valent CD44 clustering and competition with low-valent hyaluronic acid oligomers. Angiogenic effect is observed on hyaluronan fractions from 4 to 30 kDa. Olygomers of hyaluronic acid stimulate proliferation by activation of CD44 interaction with receptors of epidermal growth factor ErbB2 and focal adhesion kinase FAK. Tissue-specific receptor proteins execute more narrow functions. Receptors LYVE-1 and HARE take part in hyaluronan endocytosis and catabolism in lymphatic system, liver, kidney, spleen. RHAMM controls migration and adhesive effects of hyaluronan in tumors. Toll-like TLR4 receptors stimulate tumor angiogenesis by activating the NF-kB signaling pathway in endothelial cells.

Keywords: hyaluronic acid, hyaluronan synthase, hyaluronidase HYAL1, receptor CD44, LYVE-1, RHAMM, HARE, TLR4, NF- κB



— ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ —

УДК 577.21

РОЛЬ ЛИНКЕРНЫХ ГИСТОНОВ В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

© 2022 г. А. В. Любителев*, #, М. П. Кирпичников*, **, В. М. Студитский*, ***, #

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, кафедра биоинженерии биологического факультета, Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

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

*** Fox Chase Cancer Center, Cottman avenue 333, Philadelphia, Pennsylvania, 19111 USA

Поступила в редакцию 27.08.2020 г. После доработки 05.09.2020 г. Принята к публикации 10.09.2020 г.

Линкерные гистоны представляют собой ДНК-связывающие архитектурные белки хроматина, участвующие в формировании наднуклеосомных уровней упаковки хроматина. У млекопитающих известно 11 вариантов этих белков, однако функциональное значение такого разнообразия на настоящий момент до конца не определено. Помимо основной структурной функции линкерные гистоны участвуют в регуляторных взаимодействиях, таких как глобальное нарушение регуляции генов в процессе канцерогенеза. В свою очередь, эти изменения при канцерогенезе могут воздействовать как на линкерные гистоны через мутации кодирующих их генов или изменения в экспрессии этих генов, так и на регуляторные системы клетки, вызывающие перераспределение вариантов линкерных гистонов в интерфазном хроматине, нарушающие их посттрансляционные модификации или формирующие с ними функционально активные комплексы. В некоторых случаях изменения в метаболизме линкерных гистонов могут являться возможной причиной злокачественной трансформации, а также выступать в роли возможных прогностических маркеров. Обсуждаются возможные механизмы таких изменений в канцерогенезе, позволяющие также лучше понять функции вариантов линкерных гистонов и доменов этих белков в нормальных клетках.

Ключевые слова: гистон H1, хроматин, канцерогенез, нуклеосома, эпигенетика **DOI:** 10.31857/S0132342321010140

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	.520
СТРОЕНИЕ И ВАРИАНТЫ	
ЛИНКЕРНЫХ ГИСТОНОВ	.521
ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ЛИНКЕРНЫХ	
ГИСТОНОВ В РАКОВЫХ КЛЕТКАХ	.522
МУТАЦИИ ЛИНКЕРНЫХ ГИСТОНОВ	
В РАКОВЫХ КЛЕТКАХ	.523
ВАРИАНТЫ ЛИНКЕРНЫХ ГИСТОНОВ	
КАК ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ	.526
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	.527
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	.527

ВВЕДЕНИЕ

Генетический аппарат клетки имеет тонко регулируемую иерархическую организацию, основной структурной единицей которой является нуклеосома. Нуклеосома представляет собой октамер гистонов (H2A/H2B/H3/H4), [1], вокруг которого обернута ДНК длиной приблизительно 147 п.н. [2], формирующих нуклеосомное ядро. Гистоны нуклеосомного ядра являются важнейшими компонентами систем эпигенетической регуляции транскрипционной и репликационной активности, их посттрансляционные модификации отмечают домены активного и неактивного хроматина. Нарушения эпигенетической регуляции отмечены многими авторами в качестве одного из важнейших механизмов канцерогенеза [3, 4]. Еще один, линкерный, гистон Н1 связывается в области входа ДНК в нуклеосомную частицу. Функции гистона Н1, или линкерного гистона, по ряду причин гораздо менее изучены, чем функции гистонов нуклеосомного ядра, что существенно ограничивает понимание эпигенетической регуляции и механизмов канцерогенеза, в которых этот белок может принимать участие. Вместе с тем установлено, что в клетках по меньшей мере некоторых раковых опухолей экспрессия и распределение в интерфазном хроматине различных вариантов лин-

Сокращения: spFRET – ферстеровский резонансный перенос энергии внутри одной частицы.

[#] Автор для связи: (эл. почта: varanus-salvator@yandex.ru; vasily.studitsky@fccc.edu).



Рис. 1. Схема строения молекулы гистона H1: 1 – *N*-концевой хвост, 2 – глобулярный домен, 3 – *C*-концевой хвост. Указаны приблизительные положения сайтов посттрансляционных модификаций различных вариантов линкерных гистонов.

керных гистонов подвергается значительным изменениям [5, 6]. В свете сведений о том, что варианты линкерного гистона могут принимать участие в регуляции плюрипотентности клеточных линий и раннего эмбрионального развития [7, 8], изучение роли линкерного гистона в канцерогенезе может расширить наше понимание как механизмов злокачественной трансформации, так и биологических функций различных вариантов гистона H1.

СТРОЕНИЕ И ВАРИАНТЫ ЛИНКЕРНЫХ ГИСТОНОВ

По своей структуре гистон Н1 существенно отличается от гистонов нуклеосомного ядра. Линкерные гистоны не демонстрируют характерной для H2A, H2B, H3 и H4 гистоновой укладки (α-спираль, ограниченная двумя более короткими α-спиралями по краям); вместо этого их глобулярная часть свернута в мотив "спираль с крылом", представляющий собой укладку типа "спираль-поворот-спираль" с небольшой В-шпилькой ближе к С-концу и характерной для разнообразных ДНК-связывающих белков (рис. 1). Важно отметить, что поверхность глобулярного домена заряжена практически целиком положительно [9], в то время как в составе других белков этот мотив обычно несет ярко выраженный дипольный момент [10]. Протяженный С-концевой фрагмент линкерных гистонов насчитывает около 100 а.о. и несет сильный суммарный положительный заряд за счет остатков лизина, аланина и пролина [11] (рис. 1). В водном растворе этот фрагмент не формирует вторичной структуры, однако в присутствии нейтральных детергентов [12] и при связывании с **ЛНК** [12–14] способен формировать вторичную структуру. Данные экспериментов по регистрации spFRET от комплексов гистона H1 с ДНК и нуклеосомами свидетельствуют о том, что в составе таких комплексов С-концевой фрагмент способен формировать компактную глобулоподобную структуру [15, 16]. За счет высокого суммарного положительного заряда именно этот участок мо-

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 48 № 5 2022

лекул линкерных гистонов, как полагают, отвечает за компактизацию ДНК. *N*-концевой фрагмент линкерных гистонов значительно короче, чем *C*концевой (рис. 1), и вносит значительно меньший вклад в связывание H1 с нуклеосомой [17].

У человека, как и у других млекопитающих, насчитывается 11 различных вариантов линкерного гистона [18], семь из которых экспрессируется в соматических клетках (Н1.1-Н1.5, Н1.0 и H1.x), тогда как остальные четыре – в половых клетках и их предшественниках (H1t, H1T2, HILS1 и Н1оо) [19]. Те из линкерных гистонов, что характерны для соматических клеток, делятся на два вида: экспрессирующиеся в течение S-периода (Н1.1–Н1.5) и экспрессирующиеся конститутивно (H1.0 и H1.x); последние называют также замещающими вариантами линкерных гистонов, поскольку в хроматине терминально дифференцированных клеток остальные варианты Н1 заменяются именно на них [18, 19]. В последние годы получены сведения о том, что глобулярные домены определенных вариантов линкерных гистонов способны формировать с нуклеосомой два различающихся по своей геометрии вида комплексов, один из которых характеризуется размещением глобулы линкерного гистона на оси симметрии частицы, а другой – несколько в стороне от нее [20, 21]. Молекулярно-динамические расчеты, вместе с тем, показывают, что в том или ином хроматиновом контексте один и тот же вариант гистона Н1 может формировать оба типа комплексов [22]. Варианты линкерных гистонов различаются по сродству к хроматину [23, 24] и способности его конденсировать [23, 25], а также по скорости обмена после связывания с ним [26, 27]. Несмотря на существующие между этими вариантами различия в аминокислотной последовательности, соотнести их с конкретными особенностями функций каждого из них оказалось затруднительно, поскольку эти варианты, судя по всему, по меньшей мере частично взаимозаменяемы [28]. Так, было установлено, что эмбрионы мышей,



Рис. 2. Возможные механизмы канцерогенеза с участием линкерных гистонов. (a) – Декомпактизация хроматина в результате падения экспрессии линкерных гистонов; (δ) – перераспределение вариантов линкерных гистонов внутри хроматина под воздействием повреждений регуляторных систем клетки. (b) – нарушение связывания линкерных гистонов с хроматином в результате мутации; (c) – нарушение взаимодействия регуляторных белков с линкерными гистонових по механизму приобретения или утраты функции.

нокаутных по генам H1.0 [29], H1t [30] или H1.1 [31], без отклонений развивались у животных, не отличающихся от мышей дикого типа. Никаких существенных отклонений не было обнаружено и при двойном нокауте по гену Н1.0 и гену одного из трех вариантов H1, экспрессирующихся в S-периоде: H1.2, H1.3 или H1.4 [28]. Только тройной нокдаун по Н1.2, Н1.3 и Н1.4 привел к гибели эмбрионов мышей в процессе развития [32]. В то же время имеются указания на специфические функции различных соматических вариантов H1 в клетке, поскольку селективное ингибирование их экспрессии в клетках рака молочной железы приводило к различным последствиям для клеточного метаболизма [33]. Такое противоречие может быть обусловлено тем, что компенсаторные механизмы, обеспечивающие выживание мышей, нокаутных по нескольким вариантам линкерных гистонов, могут не работать в клетках, подвергшихся злокачественной трансформации, либо должны быть запушены на ранних стадиях эмбриогенеза.

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ЛИНКЕРНЫХ ГИСТОНОВ В РАКОВЫХ КЛЕТКАХ

Известно, что в ряде случаев дерегуляция экспрессии генома клетки, ведущая к злокачественной трансформации, сопровождается общей декомпактизацией клеточного хроматина.

На основании данных высокочувствительного секвенирования мРНК линкерных гистонов из Атласа раковых геномов (The Cancer Genome Atlas) было установлено, что транскрипция H1 часто демонстрирует отличия от нормы, с преобладанием вариантов, экспрессирующихся во время клеточного цикла. Вместе с тем выявляются и специфические изменения в транскрипции этих генов, характерные только для опухолей определенных типов [6].

Анализ транскриптом клеток аденом и аденокарцином яичников при помощи количественной ПЦР позволил выявить ряд различий между профилями экспрессии различных вариантов линкерных гистонов в клетках злокачественных и доброкачественных опухолей [34]. Так, в клетках аденокарцином было выявлено заметное снижение содержания мРНК гистонов Н1.0, Н1.1, Н1.4 и Н1.х, тогда как содержание мРНК Н1.3 было существенно повышено. Выявлено было также общее снижение количества мРНК всех вариантов линкерных гистонов в злокачественных клетках примерно на 40%, произошедшее в основном за счет снижения количества мРНК гистона Н1.0, наиболее характерного для высокодифференцированных клеток. Такие изменения могут быть причиной глобальной декомпактизации хроматина клеток злокачественных опухолей (рис. 2а). Применение выявленных различий в качестве критерия злокачественности позволило верно определить тип опухолевых клеток для 32 из 33 проанализированных образцов. Вместе с тем прямо связать изменения в содержании мРНК с изменениями на уровне белков в случае линкерных гистонов затруднительно, поскольку регуляция их содержания в клетке осуществляется также на уровне процессинга мРНК [35] и скорости деградации белка [36, 37]. Примечательно, что более поздняя работа выявила значительное снижение пролиферационной активности культуры клеток рака яичника OVCAR-3 при повышении экспрессии гистона H1.3 [38]. Было установлено, что H1.3 является селективным ингибитором экспрессии небелкового канцерогена — PHK H19. Эти данные указывают на то, что одни и те же изменения в экспрессии генов линкерных гистонов могут приводить в разных типах раковых клеток к различным эффектам.

Различия в экспрессии генов Н1 возможны. судя по всему, не только между раковыми клетками и клетками, не претерпевшими злокачественной трансформации, но и между различными клетками гетерогенных раковых опухолей. Так, для клеток культуры генно-инженерных фибробластов с канцерогенными свойствами [39] было продемонстрировано существенное снижение содержания Н1.0 в клетках со стволовыми свойствами по сравнению с дифференцированными клетками [5]. Похожая ситуация была выявлена и в культурах клеток глиобластомы и рака груди, где высокодифференцированные опухоли демонстрировали более высокое содержание гистона Н1.0, чем низкодифференцированные. Выявлены были также различия в метилировании CpG-островков ДНК гена Н1.0: клетки, проявлявшие свойства стволовых, демонстрировали существенно повышенный vровень метилирования области вокруг промотора гена Н1.0. Образцы опухолевых клеток естественного происхождения также демонстрируют обратную зависимость между уровнем метилирования ДНК области промотора гена Н1.0 и содержанием кодируемого этим геном белка. При этом повышение уровня экспрессии Н1.0 генно-инженерными методами в клетках со стволовыми свойствами существенно снижало их пролиферативный и опухолеформирующий потенциал, тогда как снижение экспрессии Н1.0 имело обратный эффект. Снижение экспрессии гена Н1.0 приводило к воспроизводимым, хотя чаще всего и незначительным, изменениям экспрессии более 800 генов, располагающихся преимущественно в АТ-богатых участках хромосом. При этом в клетках с низким содержанием Н1.0, предпочтительно связывающегося с GC-богатыми областями ДНК [40], наблюдалось снижение количества связанного Н1.0 именно в АТ-богатых областях, характерных для сайтов старта транскрипции генов, отвечающих за стволовые свойства, и обладающих высокой механической жесткостью, снижающей стабильность формирующихся на таких участках нуклеосом [41].

Функциональная гетерогенность раковых опухолей приобретает все большее клиническое значение [42], в силу чего данные о роли различных вариантов H1, и особенно H1.0 как маркера высокодифференцированных клеток, в формировании этой гетерогенности также могут быть важны для формирования стратегий терапии злокачественных образований.

МУТАЦИИ ЛИНКЕРНЫХ ГИСТОНОВ В РАКОВЫХ КЛЕТКАХ

Было установлено, что мутации гистонов нуклеосомного ядра являются одним из важнейших механизмов злокачественной трансформации клеток [43]. Наилучшим образом изучена роль мутации Н3К37М, препятствующей работе эпигенетических регуляторных механизмов клетки [44]. Систематические мутации гистона Н1 поддаются изучению значительно хуже, поскольку функции различных его вариантов и роль посттрансляционных модификаций таких вариантов в эпигенетической регуляции гораздо менее изучены. Тем не менее повторяющиеся мутации генов линкерных гистонов были обнаружены в образцах клеток фолликулярной лимфомы [45, 46], хронической лимфоцитарной лейкемии [47]. диффузной крупноклеточной В-лимфомы [48] и раковых опухолей толстой кишки [49].

В клетках фолликулярной лимфомы мутации в генах Н1 были выявлены для 27% образцов, в шести из которых были обнаружены множественные мутации; большую их часть составляли соматические миссенс-мутации [45]. Высокая частота мутаций генов Н1 в клетках фолликулярной лимфомы была подтверждена независимым исследованием [46]. Вместе с тем установить точные механизмы участия обнаруженных мутаций в канцерогенезе на настоящий момент затруднительно. В пользу участия этих мутаций в злокачественной трансформации говорит, в частности, тот факт, что они были предпочтительно локализованы в участках генов, кодирующих глобулярный и С-концевой домены гистонов Н1 [45], которые отвечают за связывание с ДНК. Высокое отношение несинонимичных замен и инсерций/делеций к синонимичным (5.1:1), как и тот факт, что мутации генов Н1 и других генов с достоверной ролью в канцерогенезе являются взаимоисключающими [45], также говорит в пользу физиологической значимости обнаруженных изменений.

Участие Н1 в большом количестве внутриклеточных процессов позволяет рассматривать в качестве потенциальных механизмов действия подобных мутаций как потерю функций, так и приобретение. Наиболее очевидным возможным объяснением могла бы быть декомпактизация ДНК вследствие снижения прочности связывания с ней мутантного H1 (рис. 2δ). В то же время, поскольку обнаруженные мутации редко затрагивали больше одного гена в диплоидном хромосомном наборе, а даже полная делеция одного или нескольких вариантов Н1 не вызывала заметных физиологических изменений [28, 32], такое объяснение нельзя считать в полной мере удовлетворительным. В правильности такого объяснения заставляет усомниться и то, что значительная часть обнаруженных мутаций была локализована в участках, кодирующих *С*-концевые фрагменты молекул линкерных гистонов, для связывания которых с ДНК важна в первую очередь не конкретная аминокислотная последовательность, а скорее характер боковых цепей составляющих их аминокислот [50, 51].

Гораздо более вероятной является гипотеза о нарушениях в результате мутаций взаимодействия Н1 с регуляторными белками или системами эпигенетической регуляции, которые могут происходить как по механизму утраты, так и по механизму приобретения функции (рис. 2г). Так, было установлено, что часть обнаруженных мутаций в областях генов, кодирующих С-концевые фрагменты H1, приводила к ослаблению или полному исчезновению взаимодействия линкерного гистона с метилтрансферазой DNMT3B [45], что может нарушать осуществляемые этой метилтрансферазой эпигенетические регуляторные функции [52]. Тем не менее имеющихся на сегодня данных недостаточно для того, чтобы установить, в какой именно мере обнаруженные мутации являются причиной злокачественного перерождения, а частота самих этих мутаций зачастую крайне невелика [47, 49], поэтому вывод об этом следует делать только на основании результатов функциональных исследований.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛИНКЕРНЫХ ГИСТОНОВ С РЕГУЛЯТОРНЫМИ БЕЛКАМИ

На сегодняшний день достоверно известно, что варианты гистона Н1 взаимодействуют по меньшей мере с несколькими важными белками, регулирующими активность хроматина, среди которых – регуляторы транскрипции, системы посттрансляционной модификации и архитектурные белки. В то же время результаты связывания белков тотального клеточного экстракта с иммобилизованным Н1.0 указывают на то, что список этих белков намного шире и включает в себя также белки, участвующие в сплайсинге мРНК, синтезе рРНК и регуляции трансляции [53]. Необходимо отметить, что даже такая высокоспецифичная методика поиска возможных лигандов, как связывание с иммобилизованным белком, в случае с Н1 может оказаться неспособной выявить все взаимодействующие белки в силу того, что необходимые для взаимодействия эпитопы могут быть свернуты должным образом только у Н1, связавшегося с ДНК.

Следует также рассматривать возможность того, что как глобальные, так и локальные изменения количества связанного с хроматином H1 возможны не только в результате изменений его экспрессии, но и в результате активности регуляторных белков. Так, было установлено, что при нокауте гена опухолевого репрессора PTEN, участвующего в регуляции активности протеинкиназы B [54], но имеющего также и ряд функций, не связанных с фосфатазной активностью [55], происходит диссоциация Н1 и декомпактизация хроматина клетки [56]. Диссоциацию Н1 можно вызвать также обработкой оплодотворенных яйцеклеток X. laevis PHD-доменом белка SSRP1, входящего в регуляторный комплекс FACT1 [7], что вызывает глобальное усиление интенсивности транскрипции хроматина и ускоряет прохождение клеточного цикла. Интересно, что похожий механизм действия был обнаружен для аналогичного линкерным гистонам белка D. melanogaster dBigH1, нокаут которого нарушал эмбриональное развитие за счет преждевременной дерепрессии транскрипции хроматина клеток эмбриона [8]. Снижение количества Н1, и особенно его варианта Н1.0, характерного как для высокодифференцированных клеток, так и для регенерирующих тканей [57]. Предпочтительное снижение содержания Н1.0 в клетках регенерирующих тканей вызвано, судя по всему, в первую очередь существованием обратной зависимости между интенсивностью транскрипции гена Н1.0 и скоростью прохождения клеточного цикла [58].

Важно отметить, что при общем повышении содержания Н1.0 в клетке в результате повышенной экспрессии увеличение количества связанного Н1.0 происходит в разных участках хроматина неравномерно. предпочтительно в области повторяющихся последовательностей [59], что, судя по всему, соответствует его локализации и в клетках дикого типа [60]. Дифференциальная локализация в хроматине была обнаружена также для гистона Н1.2, содержание которого в клетках рака молочной железы T47D значительно снижено вблизи точек начала транскрипции неактивных генов, но существенно повышено в их промоторных областях [61]. Эти данные позволяют предполагать, что одним из важных последствий злокачественной трансформации является не только общая декомпактизация хроматина, но и перераспределение вариантов линкерных гистонов (рис. 2в).

Выше уже было упомянуто, что в культуре клеток рака яичника OVCAR-3 гистон H1.3 является селективным ингибитором онкогенной нкРНК Н19 [38]. В последнее время выявлено еще несколько механизмов регуляции активности генов, взаимодействующих с линкерными гистонами. Так, было показано, что регуляторный белок PARP-1 конкурирует с гистоном H1 на ароматазном промоторе в клетках рака молочной железы 3T3-L1; гистон H1 в результате такого взаимодействия оказывается поли-АДФ-рибозилирован [62]. Примечательно, что к усилению экспрессии с ароматазного промотора приводила не только повышенная экспрессия PARP-1, но и ингибирование его активности РЈ34. Эффект от такой обработки терялся в присутствии ингибиторов гистондеацетилаз класса I/IIa, специфичных к гистону H1. Таким образом, обнаруженное регуляторное действие PARP-1 на ароматазный промотор в клетках 3T3-L1

обладает, судя по всему, сложным механизмом действия, зависящим от дозы компонентов и контекста хроматина.

Недавно было установлено, что активация сигнальных путей, регулируемых протоонкогеном Ras, приводит к подавлению фосфорилирования гистонов Н1.4 и Н1.5 и ускоряет рост и миграцию клеток глиомы и мелкоклеточного рака легких [63, 64]. Подавление фосфорилирования разных вариантов линкерного гистона происходило в результате работы разных внутриклеточных сигнальных путей протеинкиназы В в случае Н1.5 и МАР-киназ в случае Н1.4. Было продемонстрировано, что усиление фосфорилирования этих линкерных гистонов приводит к подавлению пролиферации раковых клеток и снижению экспрессии генов, активируемых при усилении активности Ras, что свидетельствует в пользу того, что именно посттрансляционная модификация Н1.4 и Н1.5 является одной из мишеней соответствующих регуляторных путей. Важно отметить, что в обоих случаях фосфорилируемые аминокислоты находились в *N*-концевых участках линкерных гистонов – Thr10 в случае H1.5 и Ser36 в случае H1.4, что открывает новые подходы к установлению функций этого фрагмента, о регуляторном значении которого в настоящий момент известно немного (рис. 1).

Протоонкоген МТА1, связанный с развитием метастаз, ингибирует фосфорилирование С-концевого фрагмента другого варианта линкерного гистона, H1.2 [65], а также вызывает перераспределение H1 в хроматине клеток гепатоцитарной аденокарциномы [66]. Было установлено, что H1 предпочтительно связывается с областями хроматина с пониженным содержанием МТА1, а повышенная экспрессия последнего приводит к диссоциации Н1 и деконденсации хроматина [66]. Помимо диссоциации Н1, повышенная экспрессия МТА1 вызывала также снижение содержания H1.2T146ph (рис. 1) путем ускорения протеосомной деградации ДНК-протеинкиназы (DNA-PK), приводя к усилению пролиферационной активности клеток гепатоклеточной карциномы [65]. При помощи иммунопреципитации хроматина было продемонстрировано, что фосфорилированный Н1.2 связывается с промоторными областями мишеней МТА1, среди которых – металлопротеазы внеклеточного матрикса ММР-7 и ММР-9 и циклин D1.

Еще одна посттрансляционая модификация линкерного гистона, вовлеченная в канцерогенез, — метилирование H1.4 в клетках чешуйчатоклеточной карциномы головы и шеи [67]. Было продемонстрировано, что метилтрансфераза WH-SC1 в культуре таких клеток монометилирует гистон H1.4 по 85-му остатку лизина, расположенному в его глобулярном домене (рис. 1). Такое метилирование ускоряло пролиферацию и повышало содержание H1.4 в области гена белка ОСТ4, усиливая его экспрессию; этот белок является важным звеном канцерогенеза для многих типов раковых опухолей, а также важнейшим маркером стволовых свойств клеток [68].

Была выявлена связь между гистоном H1 и цитохромом p53, который является противоопухолевым супрессором. ДНК-хеликаза CHD8 формирует с p53 и гистоном H1 трехкомпонентный комплекс, привлекая последний к регуляторным элементам, чувствительным к p53, и препятствуя таким образом активируемому p53 апоптозу [69]. Примечательно, что CHD8 способна привлекать H1 еще и для подавления активности генов, регулируемых β-катенином, что препятствует развитию злокачественных опухолей [70].

Злокачественная трансформация связана не только с дерегуляцией экспрессии генов и пролиферации клеток, но и с изменениями механических свойств клеток - клетки злокачественных опухолей менее жесткие, чем клетки других типов [71], что может способствовать их миграции через внеклеточный матрикс, усиливая их метастатическую активность. Среди компонентов клетки наибольшим препятствием для такого перемещения является ядро, от структуры хроматина в котором зависит эффективность миграции клеток [72]. Было продемонстрировано, что ингибирование экспрессии архитектурного белка хроматина HMGA1, конкурирующего с линкерными гистонами за сайты связывания [73], приводило к изменению фенотипа клеток культуры высокоинвазивного рака молочной железы MDA-MB-231, для которых характерна высокая интенсивность экспрессии гена HMGA1, с мезенхимного на эпителиальный и увеличивало их жесткость [74]. Повышенная экспрессия HMGA в клетках культуры низкоинвазивной опухоли MCF7, в норме HMGA1 почти не содержащих, приводила к обратному эффекту. Ингибирование экспрессии HMGA1 в клетках культуры MDA-MB-231 сопровождалось перераспределением Н1 внутри клеточного ядра: кластеры Н1 становились крупнее, их общее количество и плотность падали. Было также показано, что содержание в клетке HMGA1 регулирует степень фосфорилирования линкерных гистонов: для культур с изначально высоким содержанием HMGA1, экспрессирующих только H1.2 и Н1.4, было показано общее снижение количества фосфорилированных линкерных гистонов и исчезновение трифосфорилированных форм с сушественным сокрашением количества моно- и дифосфорилированных; для культуры клеток с изначально низким содержанием HMGA1 его сверхэкспрессия давала обратный эффект. Примечательно, что эта культура экспрессировала еще два варианта Н1: Н1.3 и Н1.5, для которых был выявлен тот же эффект. Помимо изменений в фосфорилировании линкерных гистонов, со-



Рис. 3. Внутриклеточные регуляторные системы, воздействующие на линкерные гистоны при канцерогенезе.

держание HMGA1 влияет также на общую интенсивность экспрессии генов всех гистонов клетки, включая линкерные [75].

С развитием методик изучения белок-белковых взаимодействий появляется все больше свидетельств в пользу того, что линкерные гистоны обладают, помимо основной архитектурной, еще и целым набором регуляторных функций, осуществляемых при участии других белков [76]. Их изучение позволит расширить понимание функциональных особенностей вариантов H1 и механизмов канцерогенеза (рис. 3).

ВАРИАНТЫ ЛИНКЕРНЫХ ГИСТОНОВ КАК ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ

Поскольку гистон Н1 является одним из наиболее распространенных архитектурных белков хроматина, за исключением гистонов нуклеосомного ядра, а в различных культурах раковых клеток были обнаружены разнообразные мутации и нарушения экспрессии этих белков, целесообразно рассмотреть линкерные гистоны в качестве прогностических маркеров для развития опухолей. Самым очевидным кандидатом на роль такого маркера выглядит гистон Н1.0, высокое содержание которого характерно для высокодиффференцированных клеток. Так, на основании анализа наборов данных от пациентов с мультиформной глиобластомой, раком груди, меланомой, раком печени, почек и глиомы низкой степени было установлено, что низкое содержание Н1.0 коррелировало с негативным прогнозом течения заболевания [5]. Примечательно, что негативный прогноз на основании стратификации по содержанию Н1.0 никак не коррелировал с негативными прогнозами на основании других факторов, что свидетельствует в пользу самостоятельной значимости содержания Н1.0 как прогностического критерия. Тем не менее более позднее подобное исследование на более широком наборе данных не выявило явной зависимости между содержанием Н1.0 и типом клеток [77] - содержание Н1.0 в ряде раковых клеток оказалось выше, чем в контрольных клетках нормальных тканей. Такая ситуация может быть следствием того, что некоторые регуляторные элементы промотора гена Н1.0 являются общими с регуляторными элементами гена гистона Н4 и активируются при прохождении клеточного цикла [78], а также того, что экспрессия H1.0 в S-периоде при переводе клеток в культуру несколько повышается [79]. Необходимо учитывать также внутриопухолевую гетерогенность по степени экспрессии H1.0 – в результате глобального нарушения регуляции экспрессии генов дифференцированные опухолевые клетки могут накапливать больше Н1.0, чем необходимо.

Несмотря на то, что другие варианты линкерных гистонов менее очевидны в качестве прогностических маркеров, была предпринята попытка оценки корреляции между их содержанием и выживаемостью пациентов с раком груди [74]. Было установлено, что негативный прогноз по развитию характерен для опухолей с высоким содержанием гистонов H1.2 и H1.4. Высокоинвазивные клетки рака груди экспрессировали только эти варианты линкерных гистонов. Примечательно, что высокое содержание H1.0 оказалось характерно для пациентов с положительным прогнозом.

Таким образом, несмотря на привлекательность H1 в качестве прогностического маркера, полученных на настоящий момент сведений недостаточно для точного установления значимости изменения содержания конкретных вариантов линкерных гистонов для развития рака.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на значительное количество исследований участия Н1 в эпигенетической регуляции канцерогенеза, понимание соответствующих механизмов все еще ограничено. Во многом это обусловлено трудностью изучения конкретного физиологического значения того или иного варианта H1, поскольку их функции по меньшей мере частично перекрываются. Тем не менее наблюдаемые глобальные изменения в экспрессии Н1 в раковых клеток, так же как и повторяющиеся мутации в соответствующих генах, свидетельствуют о важной роли этого белка при развитии по меньшей мере некоторых типов раковых опухолей. На фоне недостатка информации относительно функций Н1 ключевым вопросом относительно его участия в канцерогенезе является вопрос о том, выступают ли наблюдаемые в опухолях изменения, связанные с Н1, причиной злокачественной трансформации или же ее следствием. Поскольку функции Н1 многочисленны, ответ в каждом конкретном случае может быть разным. Так, глобальные изменения в экспрессии и распределении H1, скорее всего, являются следствием канцерогенеза, поскольку изменения содержания Н1 в клетке могут оказывать на разные противоопухолевые механизмы различное воздействие. Изменения посттрансляционных модификаций линкерных гистонов и их взаимодействий с регуляторными белками также, видимо, являются следствием канцерогенеза, т.к. в большинстве случаев гистон Н1 был мишенью онкогенных белков. Изучение влияния посттрансляционных модификаций линкерных гистонов на метаболизм раковых клеток поможет выявить физиологические функции отдельных его вариантов и фрагментов его структуры.

Мутации H1 больше подходят на роль причин злокачественного перерождения, поскольку могут как препятствовать посттрансляционной модификации, так и нарушать взаимодействие с регуляторными белками, как по механизму утраты функции, так и по механизму приобретения. Изучение таких мутаций — еще один важный потенциальный источник знаний о функциях вариантов линкерных гистонов в организме. Расшире-

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 48 № 5 2022

ние понимания роли H1 в различных клеточных процессах позволит гораздо точнее интерпретировать значимость тех или иных изменений в содержании линкерного гистона в опухолевых клетках и точнее прогнозировать развитие опухолей на основании использования H1 в сочетании с другими прогностическими маркерами.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 19-74-30003).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Kornberg R.D.* // Science. 1974. V. 184. P. 868–871. https://doi.org/10.1126/science.184.4139.868
- Davey C.A., Sargent D.F., Luger K., Maeder A.W., Richmond T.J. // J. Mol. Biol. 2002. V. 319. P. 1097–1113. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00386-8
- Botrugno O.A., Santoro F, Minucci S. // Cancer Lett. 2009. V. 280. P. 134–144. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.02.027
- Fraga M.F., Ballestar E., Villar-Garea A., Boix-Chornet M., Espada J., Schotta G., Bonaldi T., Haydon C., Ropero S., Petrie K., Iyer N.G., Perez-Rosado A., Calvo E., Lopez J.A., Cano A., Calasanz M.J., Colomer D., Piris M.A., Ahn N., Imhof A., Caldas C., Jenuwein T., Esteller M. // Nat. Genet. 2005. V. 37. P. 391–400. https://doi.org/10.1038/ng1531
- Torres C.M., Biran A., Burney M.J., Patel H., Henser-Brownhill T., Cohen A.S., Li Y., Ben-Hamo R., Nye E., Spencer-Dene B., Chakravarty P., Efroni S., Matthews N., Misteli T., Meshorer E., Scaffidi P. // Science. 2016. V. 353. P. aaf1644. https://doi.org/10.1126/science.aaf1644
- Scaffidi P. // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1859. P. 533–539.
- https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2015.09.008
- Falbo L., Raspelli E., Romeo F., Fiorani S., Pezzimenti F., Casagrande F., Costa I., Parazzoli D., Costanzo V. // Nat. Commun. 2020. V. 11. P. 1345. https://doi.org/10.1038/s41467-020-15180-5
- Perez-Montero S., Carbonell A., Moran T., Vaquero A., Azorin F. // Dev. Cell. 2013. V. 26. P. 578–590. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.08.011
- Fan L., Roberts V.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 8384–8389. https://doi.org/10.1073/pnas.0508951103

- Gajiwala K.S., Burley S.K. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2000. V. 10. P. 110–116. https://doi.org/10.1016/s0959-440x(99)00057-3
- 11. Subirana J.A. // Biopolymers. 1990. V. 29. P. 1351–1357. https://doi.org/10.1002/bip.360291003
- Roque A., Teruel N., Lopez R., Ponte I., Suau P. // J. Struct. Biol. 2012. V. 180. P. 101–109. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2012.07.004
- Roque A., Iloro I., Ponte I., Arrondo J.L., Suau P. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 32141–32147. https://doi.org/10.1074/jbc.M505636200
- 14. Roque A., Ponte I., Suau P. // J. Phys. Chem. B. 2009. V. 113. P. 12061–12066. https://doi.org/10.1021/jp9022579
- Fang H., Clark D.J., Hayes J.J. // Nucleic. Acids. Res. 2012. V. 40. P. 1475–1484. https://doi.org/10.1093/nar/gkr866
- Fang H., Wei S., Lee T.H., Hayes J.J. // Nucleic. Acids. Res. 2016. V. 44. P. 9131–9141. https://doi.org/10.1093/nar/gkw586
- Vyas P., Brown D.T. // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. P. 11778–11787.
- https://doi.org/10.1074/jbc.M111.312819
- Happel N., Doenecke D. // Gene. 2009. V. 431. P. 1–12. https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.11.003
- Pan C., Fan Y. // Biochim. Biophys. Acta. 2016.
 V. 1859. P. 496–509. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2015.12.002
- 20. Zhou B.R., Jiang J., Feng H., Ghirlando R., Xiao T.S.,
- *Bai Y.* // Mol. Cell. 2015. V. 59. P. 628–638. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.025
- Bednar J., Garcia-Saez I., Boopathi R., Cutter A.R., Papai G., Reymer A., Syed S.H., Lone I.N., Tonchev O., Crucifix C., Menoni H., Papin C., Skoufias D.A., Kurumizaka H., Lavery R., Hamiche A., Hayes J.J., Schultz P., Angelov D., Petosa C., Dimitrov S. // Mol. Cell. 2017. V. 66. P. 384–397. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.04.012
- Ozturk M.A., Pachov G.V., Wade R.C., Cojocaru V. // Nucleic. Acids. Res. 2016. V. 44. P. 6599–6613. https://doi.org/10.1093/nar/gkw514
- Orrego M., Ponte I., Roque A., Buschati N., Mora X., Suau P. // BMC Biol. 2007. V. 5. P. 22. https://doi.org/10.1186/1741-7007-5-22
- Talasz H., Sapojnikova N., Helliger W., Lindner H., Puschendorf B. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 32236– 32243.
 https://doi.org/10.1074/ibc.272.48.22226
 - https://doi.org/10.1074/jbc.273.48.32236
- Clausell J., Happel N., Hale T.K., Doenecke D., Beato M. // PLoS One. 2009. V. 4. P. e0007243. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007243
- Th'ng J.P., Sung R., Ye M., Hendzel M.J. // J. Biol. Chem. 2005 V. 280. P. 27809–27814. https://doi.org/10.1074/jbc.M501627200
- Conn K.L., Hendzel M.J., Schang L.M. // J. Virol. 2008. V. 82. P. 8629–8646. https://doi.org/10.1128/JVI.00616-08
- Fan Y., Sirotkin A., Russell R.G., Ayala J., Skoultchi A.I. // Mol. Cell Biol. 2001. V. 21. P. 7933–7943. https://doi.org/10.1128/MCB.21.23.7933-7943.2001

- Sirotkin A.M., Edelmann W., Cheng G., Klein-Szanto A., Kucherlapati R., Skoultchi A.I. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 6434–6438. https://doi.org/10.1073/pnas.92.14.6434
- Lin Q., Sirotkin A., Skoultchi A.I. // Mol. Cell Biol. 2000. V. 20. P. 2122–2128. https://doi.org/10.1128/mcb.20.6.2122-2128.2000
- Rabini S., Franke K., Saftig P., Bode C., Doenecke D., Drabent B. // Exp. Cell Res. 2000. V. 255. P. 114–124. https://doi.org/10.1006/excr.1999.4767
- Fan Y., Nikitina T., Morin-Kensicki E.M., Zhao J., Magnuson T.R., Woodcock C.L., Skoultchi A.I. // Mol. Cell Biol. 2003. V. 23. P. 4559–4572. https://doi.org/10.1128/mcb.23.13.4559-4572.2003
- Sancho M., Diani E., Beato M., Jordan A. // PLoS Genet. 2008. V. 4. P. e1000227. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000227
- Medrzycki M., Zhang Y., McDonald J.F., Fan Y. // Front. Biosci. (Landmark Ed). 2012. V. 17. P. 396–406. https://doi.org/10.2741/3934
- Bond U.M., Yario T.A., Steitz J.A. // Genes Dev. 1991.
 V. 5. P. 1709–1722. https://doi.org/10.1101/gad.5.9.1709
- Wang Z.F., Sirotkin A.M., Buchold G.M., Skoultchi A.I., Marzluff W.F. // J. Mol. Biol. 1997. V. 271. P. 124–138. https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1166
- Pehrson J.R., Cole R.D. // Biochemistry. 1982. V. 21. P. 456–460. https://doi.org/10.1021/bi00532a006
- Medrzycki M., Zhang Y., Zhang W., Cao K., Pan C., Lailler N., McDonald J.F., Bouhassira E.E., Fan Y. // Cancer Res. 2014. V. 74. P. 6463–6473. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2922
- 39. Scaffidi P., Misteli T. // Nat. Cell Biol. 2011. V. 13. P. 1051–1061. https://doi.org/10.1038/ncb2308
- 40. *Tillo D., Hughes T.R.* // BMC Bioinformatics. 2009.
 V. 10. P. 442. https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-442
- 41. Anderson J.D., Widom J. // Mol. Cell Biol. 2001. V. 21. P. 3830–3839. https://doi.org/10.1128/MCB.21.11.3830-3839.2001
- Gambara G., Gaebler M., Keilholz U., Regenbrecht C.R.A., Silvestri A. // Front. Pharmacol. 2018. V. 9. P. 77. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00077
- 43. Qiu L., Hu X., Jing Q., Zeng X., Chan K.M., Han J. // J. Genet. Genomics. 2018. V. 45. P. 227–236. https://doi.org/10.1016/j.jgg.2018.04.004
- 44. Justin N., Zhang Y., Tarricone C., Martin S.R., Chen S., Underwood E., De Marco V., Haire L.F., Walker P.A., Reinberg D., Wilson J.R., Gamblin S.J. // Nat. Commun. 2016. V. 7. P. 11316. https://doi.org/10.1038/ncomms11316
- 45. Li H., Kaminski M.S., Li Y., Yildiz M., Ouillette P., Jones S., Fox H., Jacobi K., Saiya-Cork K., Bixby D., Lebovic D., Roulston D., Shedden K., Sabel M., Marentette L., Cimmino V., Chang A.E., Malek S.N. // Blood. 2014. V. 123. P. 1487–1498. https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-500264
- 46. Okosun J., Bodor C., Wang J., Araf S., Yang C.Y., Pan C., Boller S., Cittaro D., Bozek M., Iqbal S., Matthews J.,

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 48 № 5 2022

Wrench D., Marzec J., Tawana K., Popov N., O'Riain C., O'Shea D., Carlotti E., Davies A., Lawrie C.H., Matolcsy A., Calaminici M., Norton A., Byers R.J., Mein C., Stupka E., Lister T.A., Lenz G., Montoto S., Gribben J.G., Fan Y., Grosschedl R., Chelala C., Fitzgibbon J. // Nat. Genet. 2014. V. 46. P. 176-181. https://doi.org/10.1038/ng.2856

- 47. Landau D.A., Wu C.J. // Genome Med. 2013. V. 5. P. 47. https://doi.org/10.1186/gm451
- 48. Lohr J.G., Stojanov P., Lawrence M.S., Auclair D., Chapuy B., Sougnez C., Cruz-Gordillo P., Knoechel B., Asmann Y.W., Slager S.L., Novak A.J., Dogan A., Ansell S.M., Link B.K., Zou L., Gould J., Saksena G., Stransky N., Rangel-Escareno C., Fernandez-Lopez J.C., Hidalgo-Miranda A., Melendez-Zajgla J., Hernandez-Lemus E., Schwarz-Cruz y Celis A., Imaz-Rosshandler I., Ojesina A.I., Jung J., Pedamallu C.S., Lander E.S., Habermann T.M., Cerhan J.R., Shipp M.A., Getz G., Golub T.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 3879–3884. https://doi.org/10.1073/pnas.1121343109
- 49. Sjoblom T., Jones S., Wood L.D., Parsons D.W., Lin J., Barber T.D., Mandelker D., Leary R.J., Ptak J., Silliman N., Szabo S., Buckhaults P., Farrell C., Meeh P., Markowitz S.D., Willis J., Dawson D., Willson J.K., Gazdar A.F., Hartigan J., Wu L., Liu C., Parmigiani G., Park B.H., Bachman K.E., Papadopoulos N., Vogelstein B., Kinzler K.W., Velculescu V.E. // Science. 2006. V. 314. P. 268-274. https://doi.org/10.1126/science.1133427
- 50. Hansen J.C., Lu X., Ross E.D., Woody R.W. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. P. 1853-1856. https://doi.org/10.1074/jbc.R500022200
- 51. Lu X., Hamkalo B., Parseghian M.H., Hansen J.C. // Biochemistry. 2009. V. 48. P. 164-172. https://doi.org/10.1021/bi801636v
- 52. Yang S.M., Kim B.J., Norwood Toro L., Skoultchi A.I. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. P. 1708-1713. https://doi.org/10.1073/pnas.1213266110
- 53. Kalashnikova A.A., Winkler D.D., McBryant S.J., Henderson R.K., Herman J.A., DeLuca J.G., Luger K., Prenni J.E., Hansen J.C. // Nucleic. Acids. Res. 2013. V. 41. P. 4026-4035. https://doi.org/10.1093/nar/gkt104
- 54. Lee Y.R., Chen M., Pandolfi P.P. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2018. V. 19. P. 547-562. https://doi.org/10.1038/s41580-018-0015-0
- 55. Shen W.H., Balajee A.S., Wang J., Wu H., Eng C., Pan-dolfi P.P., Yin Y. // Cell. 2007. V. 128. P. 157–170. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.042
- 56. Chen Z.H., Zhu M., Yang J., Liang H., He J., He S., Wang P., Kang X., McNutt M.A., Yin Y., Shen W.H. // Cell Rep. 2014. V. 8. P. 2003-2014. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.008
- 57. Gjerset R., Gorka C., Hasthorpe S., Lawrence J.J., Eisen H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. P. 2333-2337. https://doi.org/10.1073/pnas.79.7.2333
- 58. Happel N., Warneboldt J., Hanecke K., Haller F., Doenecke D. // Cell Cycle. 2009. V. 8. P. 2226-2232. https://doi.org/10.4161/cc.8.14.8982
- 59. Cao K., Lailler N., Zhang Y., Kumar A., Uppal K., Liu Z., Lee E.K., Wu H., Medrzycki M., Pan C., Ho P.Y., Coo-

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ Nº 5 2022 том 48

per G.P., Jr., Dong X., Bock C., Bouhassira E.E., Fan Y. // PLoS Genet. 2013. V. 9. P. e1003417. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003417

- 60. Millan-Arino L., Izquierdo-Bouldstridge A., Jordan A. // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1859. P. 510-519. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2015.10.013
- 61. Millan-Arino L., Islam A.B., Izquierdo-Bouldstridge A., Mayor R., Terme J.M., Luque N., Sancho M., Lopez-Bigas N., Jordan A. // Nucleic. Acids. Res. 2014. V. 42. P. 4474–4493. https://doi.org/10.1093/nar/gku079
- 62. Kaiser A., Kruger T., Eiselt G., Bechler J., Kniemeyer O., Huber O., Schmidt M. // Cells. 2020. V. 9. P. 427. https://doi.org/10.3390/cells9020427
- 63. Shi S., Zhang J., Liu M., Dong H., Li N. // Artif. Cells Nanomed. Biotechnol. 2019. V. 47. P. 2343-2351. https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1624558
- 64. Sang B., Sun J., Yang D., Xu Z., Wei Y. // Artif. Cells. Nanomed. Biotechnol. 2019. V. 47. P. 2882-2890. https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1638795
- 65. Li Y.H., Zhong M., Zang H.L., Tian X.F. // Front. Oncol. 2020. V. 10. P. 567. https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00567
- 66. Liu J., Wang H., Ma F., Xu D., Chang Y., Zhang J., Wang J., Zhao M., Lin C., Huang C., Qian H., Zhan Q. // Mol. Oncol. 2015. V. 9. P. 218-235. https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.08.007
- 67. Saloura V., Vougiouklakis T., Bao R., Kim S., Baek S., Zewde M., Bernard B., Burkitt K., Nigam N., Izumchenko E., Dohmae N., Hamamoto R., Nakamura Y. // Neoplasia. 2020. V. 22. P. 283-293. https://doi.org/10.1016/j.neo.2020.05.002
- 68. Zeineddine D., Hammoud A.A., Mortada M., Boeuf H. // Am. J. Stem. Cells. 2014. V. 3. P. 74-82.
- 69. Nishiyama M., Oshikawa K., Tsukada Y., Nakagawa T., Iemura S., Natsume T., Fan Y., Kikuchi A., Skoultchi A.I., Nakayama K.I. // Nat. Cell Biol. 2009. V. 11. P. 172-182. https://doi.org/10.1038/ncb1831
- 70. Nishiyama M., Skoultchi A.I., Nakayama K.I. // Mol. Cell Biol. 2012. V. 32. P. 501-512. https://doi.org/10.1128/MCB.06409-11
- Luo Q., Kuang D., Zhang B., Song G. // Biochim. Bio-phys. Acta. 2016. V. 1860. P. 1953–1960. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.06.010
- 72. Gerlitz, G., Bustin M. // Trends. Cell Biol. 2011. V. 21. P. 6–11. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.09.002

- 73. Catez F., Yang H., Tracey K.J., Reeves R., Misteli T., Bustin M. // Mol. Cell Biol. 2004. V. 24. P. 4321-4328.
- 74. Senigagliesi B., Penzo C., Severino L.U., Maraspini R., Petrosino S., Morales-Navarrete H., Pobega E., Ambrosetti E., Parisse P., Pegoraro S., Manfioletti G., Casalis L., Sgarra R. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 2733. https://doi.org/10.3390/ijms20112733
- 75. Celona B., Weiner A., Di Felice F., Mancuso F.M., Cesarini E., Rossi R.L., Gregory L., Baban D., Rossetti G., Grianti P., Pagani M., Bonaldi T., Ragoussis J., Fried-man N., Camilloni G., Bianchi M.E., Agresti A. // PLoS Biol. 2011. V. 9. P. e1001086. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001086

- Kalashnikova A.A., Rogge R.A., Hansen J.C. // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1859. P. 455–461. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2015.10.004
- Wang T., Chuffart F., Bourova-Flin E., Wang J., Mi J., Rousseaux S., Khochbin S. // Front. Med. 2019. V. 13. P. 289–297. https://doi.org/10.1007/s11684-018-0667-3
- 78. *Khochbin S., Wolffe A.P.* // Eur. J. Biochem. 1994.
 V. 225. P. 501–510. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00501.x
- 79. Grunwald D., Khochbin S., Lawrence J.J. // Exp. Cell Res. 1991. V. 194. P. 174–179. https://doi.org/10.1016/0014-4827(91)90350-4

Role of Linker Histones in Carcinogenesis

A. V. Lyubitelev^{*, #}, M. P. Kirpichnikov^{*, **}, and V. M. Studitsky^{*, ***, #}

 [#]E-mail: varanus-salvator@yandex.ru; vasily.studitsky@fccc.edu
 *Bioengineering Department, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1-12, Moscow, 119234 Russia
 **Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997 Russia
 ***Fox Chase Cancer Center, Cottman avenue 333, Philadelphia, Pennsylvania, 19111 USA

Linker histones are DNA-binding architectural chromatin proteins involved in the formation of supranucleosomal levels of chromatin packaging. In mammals, 11 variants of these proteins are known, but the functional significance of this diversity is currently not fully defined. In addition to the main structural function, linker histones are involved in regulatory interactions, such as global gene deregulation during carcinogenesis. In turn, these changes in carcinogenesis can affect both linker histones through mutations of their encoding genes or changes in the expression of these genes, and the regulatory systems of the cell, causing a redistribution of linker histone variants in interphase chromatin, disrupting their posttranslational modifications or forming functionally active complexes with them. In some cases, changes in the metabolism of linker histones could be a possible cause of malignant transformation, as well as act as possible prognostic markers. Possible mechanisms of such changes in carcinogenesis are discussed, which also allow us to better understand the functions of linker histone variants and domains of these proteins in normal cells.

Keywords: histone H1, chromatin, carcinogenesis, nucleosome, epigenetics



УДК 577.115

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ ЛИПИДНОГО ФРАГМЕНТА НА ВСТРАИВАНИЕ И ВЫХОД ГЛИКОЛИПИДОВ ИЗ КЛЕТОК: ИЗУЧЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ

© 2022 г. Е. В. Сливка*, А. Б. Тузиков*, С. В. Хайдуков*, В. А. Комарова*, С. Генри**, Н. В. Бовин*, Е. М. Рапопорт^{*, #}

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

**Centre for Kode Technology Innovation, School of Engineering, Auckland University of Technology,

Private Bag 92006, Auckland, 1142 New Zealand

Поступила в редакцию 15.02.2022 г. После доработки 28.03.2022 г. Принята к публикации 30.03.2022 г.

Многие важные аспекты межклеточного транспорта гликосфинголипидов (ГСЛ) остаются неизвестными, в частности, как ГСЛ преодолевают гликокаликс клетки-донора и клетки-акцептора. Изучение этого процесса значительно облегчается, если использовать не природные ГСЛ, а их синтетические аналоги. Однако для получения адекватных результатов мы должны знать, как упрощения структуры молекулы-пробы влияют на принципиально важные ее свойства, в частности, как замена церамидного остатка в ГСЛ на синтетический аналог влияет на кинетику выхода и встраивания. Целью данного исследования было сравнение свойств синтетических аналогов ГСЛ, в составе одного из которых находится природный церамид, а других – более удобные с точки зрения синтеза липидные остатки. Для этого использовали конструкты FSL (Function-Spacer-Lipid), содержащие липидный остаток в трех вариантах: DOPE (1,2-О-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин), холестерин (Chol) и C18-церамид (Cer). Во всех трех молекулах липидный остаток связан с биотином посредством гидрофилизирующего спейсера СМG2. С помощью конфокальной микроскопии показано сходство паттернов локализации этих трех липидов между собой и с изученными ранее (где в качестве F были гликаны разного размера), FSL обнаруживались в виде ограниченных зон (патчей) среднего размера 0.3 мкм и не выявлялись в клеточных рафтах. В то же время наблюдались следующие различия в свойствах трех FSL: 1) процесс встраивания церамидного конструкта выходит на плато в течение 3 ч. в то время как двух других – в течение 1 ч: 2) количество встроенного церамидного конструкта меньше, чем двух других; 3) выход холестеринового конструкта из клеток, куда он предварительно встроен, происходит медленнее, чем двух других. Таким образом, несмотря на некоторые количественные различия, качественно все три конструкта ведут себя похожим образом, что делает их привлекательными при изучении встраивания и выхода ГСЛ из клетки.

Ключевые слова: гликаны, гликосфинголипиды, клетка, плазматическая мембрана, молекулярные пробы **DOI:** 10.31857/S0132342322050232

введение

Гликосфинголипиды (ГСЛ) входят в состав плазматической мембраны всех эукариотических клеток. Они вовлечены в межклеточную адгезию, регулируют пролиферацию и апоптоз клеток, участвуют в передаче клеточных сигналов [1–3]. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что ГСЛ способны не только связываться с сигнальными белками и рецепторами на поверхности клетки, но и переходить с клетки на клетку, в результате оказываясь там, где отсутствует машинерия для их синтеза. Например, на эритроцитах выявляются Le^a- и Le^b-содержащие ГСЛ (определяющие антигенность системы групп крови Льюиса), которые сами эти клетки не синтезируют [4]; эти ГСЛ переносятся из плазмы крови, куда они, в свою очередь, попадают из эндотелия [4– 6]. До сих пор нет объяснений, по какому меха-

Сокращения: ГСЛ – гликосфинголипиды; biot – биотин; Cer – C18-церамид; Chol – холестерин; CMG2 – спейсер, содержащий повторяющиеся карбоксиметилглицильные блоки; СТВ– холеротоксин В (cholera toxin B); DOPE – 1,2-О-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин; FCS – фетальная сыворотка теленка; FSL – функциональный липид со спейсерной группой (Function-Spacer-Lipid), где "F" – это гликан, пептид, биотин или другая функциональная группа, "L" – гидрофобный остаток, с помощью которого конструкт заякоривается в мембрану; Str – стрептавидин.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (916) 518-15-71; эл. почта: eugenia rapoport@mail.ru).



Рис. 1. Структура конструктов, использованных в данной работе. Обозначения: biot – биотин; CMG2 – спейсер, содержащий повторяющиеся карбоксиметилглицильные блоки; DOPE – 1,2-*O*-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин; Chol – *O*-замещенный холестерин; Cer – C18-церамид. Гидрофобный остаток в составе конструктов выделен рамкой.

низму ГСЛ захватываются клетками из крови. Чтобы встроиться в плазматическую мембрану, ГСЛ должен дважды преодолеть гликокаликс – клетки-донора и клетки-акцептора; данных о том, как это происходит, практически нет. Отсутствие данных связано с общими проблемами исследования ГСЛ: как коммерческие реагенты они малодоступны, выделение затруднено вследствие их низкого содержания и гетерогенности по углеводному и липидному фрагментам [7].

Удобный подход в решении сформулированной выше и других задач исследования трафика ГСЛ – применение их синтетических аналогов [8], которые получили название FSL (Function-Spacer-Lipid) [9–11]. Эти конструкты доступны в достаточных для исследования количествах [11], легко встраиваются в мембрану живой клетки, что не влияет на жизнеспособность [12] и выполнение клеткой основных ее функций.

Цель данной работы — изучить, каким образом замена церамидного остатка на синтетический аналог — DOPE или остаток холестерина — повлияет на встраивание в клеточную мембрану и выход встроенного конструкта FSL из клетки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе использовали FSL, в которых гидрофобные остатки представлены тремя вариантами: C18-церамидом (Cer), 1,2-*O*-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламином (DOPE) и холестерином (Chol). Для удобства детекции в качестве функционального остатка F все три конструкта содержали биотин, присоединенный к гидрофобному остатку с помощью гидрофилизирующего карбоксиметилглицильного спейсера CMG2. Структуры FSL приведены на рис. 1.

Встраивание FSL в клетки. Конструкт (рис. 1) встраивали в монослой клеток EA.hy 926 в среде, содержащей фетальную сыворотку теленка (FCS), которую использовали в пониженной концентрации (0.3%), чтобы избежать предполагаемого влияния сывороточного альбумина на трафик липидов [13]. Встраивание FSL подтверждали и визуализировали с помощью флуоресцентно-меченого стрептавидина (Str-FITC), измеряя среднегеометрическое значение флуоресценции.

DOPE- и Chol-конструкты выявлялись в клетках уже через 20 мин, а на плато (если быть точным, то на участок медленного роста) процесс встраивания выходил к первому часу инкубации (рис. 2). Накапливание церамидного конструкта было в разы медленнее, особенно в начальный период, выходя на плато к третьему часу. На промежутке 3–24 ч степень встраивания менялась незначительно (рис. 2); морфологических изменений клеток не наблюдалось.

Сравнивая интенсивность флуоресценции клеток и калибровочных частиц, содержащих известное количество флуоресцеина, и зная, что одна молекула стрептавидина в среднем связывается с шестью молекулами FITC, а Str-FITC, в свою очередь, связывается с одной или двумя молекулами биотина, мы рассчитали, что количество конструкта, встроившегося за 40 мин, составляет $0.6-1.1 \times 10^5$ молекул на клетку церамидного производного, $0.9-1.9 \times 10^5$ DOPE и $1.1-2.2 \times 10^5$ холестеринового производных, что составляет $\sim 0.01\%$ от количества липидов плазматической мембраны клетки [14].

Расположение FSL в клетке. Локализация FSL была исследована с помощью конфокальной микроскопии. На всех полученных изображениях наблюдалось неравномерное окрашивание, т.е. FSL выявлялись в виде патчей (рис. 3). Анализ распределения флуоресценции в выделенных областях дает размер патчей в интервале 0.2–2.0 мкм, преимущественно 0.3 мкм.



Рис. 2. Кинетика встраивания FSL в клетки EA.hy 926. Клетки инкубировали с конструктами при 37°C. Результаты цитофлуориметрического анализа представлены как среднее двух независимых экспериментов.

Время, ч



Рис. 3. Расположение FSL-конструктов по отношению к рафтам клеток EA.hy 926, данные конфокальной микроскопии. Клетки инкубировали с FSL в течение 2 ч при 37°С. Окрашивание рафтов (зеленый цвет) проводили с помощью конъюгата CTB-Alexa Fluor 488, биотин в составе FSL выявляли с помощью конъюгата Str-Alexa Fluor 594 (красный цвет). На гистограммах (нижняя панель) приведено распределение флуоресценции FSL в областях, выделенных белыми прямоугольниками (верхняя панель). По оси абсцисс – координата соответствующей точки на горизонтальной стороне белого прямоугольника; масштабный отрезок 5 мкм.

Клеточные рафты выявляли с помощью холеротоксина В (СТВ), про который известно, что он связывается с ганглиозидом GM1 – обязательным компонентом рафтовых доменов [15]. FSL локализовались преимущественно за пределами рафтов. Незначительная солокализация с GM1 наблюдалась только в случае церамидного конструкта (рис. 3). По-видимому, отсутствие конструкта в рафтах связано с высокой структурной организацией рафтов, из-за чего встраивание в них дополнительного липидного производного (путем "разбавления" липидов рафта или их замещения) невыгодно. Отметим, что внутри клетки конструкты также не выявлялись, т.е. в выбранных условиях не наблюдалось эндоцитоза FSL.

Выход FSL из клеток. Далее мы исследовали, как долго остаются конструкты, нагруженные на клетку, как это описано выше. Для этого после



Рис. 4. Выход FSL из клеток EA.hy 926, данные цитофлуориметрии. Значение "0" соответствует флуоресценции после встраивания FSL и немедленной отмывки. По оси ординат приведена убыль флуоресценции, которую рассчитывали по формуле: $[(F_i/F_0) \times 100] - 100$, где F_i и F_0 – значения интенсивности флуоресценции клеток в заданное время и при 0 мин соответственно.

встраивания FSL клетки помещали при 37° С в буферный раствор на сутки в CO₂-инкубаторе без перемешивания. В течение первых шести часов наблюдалось значительное снижение интенсивности флуоресценции по сравнению с исходным значением для DOPE- и Cer-конструктов (рис. 4), через 6 ч их оставалось ~50 и 40% соответственно. За это же время выход холестеринового конструкта составил не более 15%, а через 24 ч его терялось всего лишь ~20%. Полученные результаты показали, что большая часть Cer- и DOPE-конструктов выходит из клетки в течение первых суток, тогда как Chol-конструкт удерживается в мембране.

При коммуникации клетки обмениваются белками, нуклеиновыми кислотами и липидами, в том числе гликосфинголипидами. В силу гетерогенности по церамидному остатку и многообразия по гликановому, их перенос изучать затруднительно, и поэтому доступная информация о транспорте ГСЛ крайне ограничена; в то же время применение синтетических конструктов привлекательно, т.к. позволяет синтезировать конструкты с разнообразными гликанами и варьировать липидный остаток L в FSL. В предшествующем исследовании [8] мы показали, что размер гликана не оказывает принципиального влияния ни на встраивание FSL в клетку, ни на его выход из клетки. В настоящей работе мы изучили влияние структуры липидного остатка на встраивание и выход FSL из клетки, чтобы понять, насколько оправдано использование DOPE- или Chol-конструктов для изучения процессов с участием ГСЛ,

т.е. церамид-содержащих молекул. Во всех случаях конструкты выявлялись в патчах, размер которых мало зависит от природы липидного компонента; DOPE- и Chol-конструкты накапливаются в составе клетки быстрее, чем церамидный, хотя разница невелика; количество молекул эта DOPE- и Chol-конструктов, встроенных в клетку, выше, чем церамидного; Chol-конструкт медленнее выходит из клетки, чем DOPE- и Cer-конструкты. Различия в выходе, скорее всего, объясняются удерживанием конструктов гликокаликсе клетки. Таким образом, в использованных экспериментальных системах изученные конструкты оказались сходными, хотя в некоторых процессах к церамилному конструкту ближе по свойствам оказался холестериновый, а в других – DOPE-конструкт. Несмотря на то, что универсального "миметика" для церамидного остатка мы не нашли, полученные данные позволяют гибко использовать конструкт того или иного типа в зависимости от конкретной решаемой задачи.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. В работе использовали культуральную среду DMEM-F12, фетальную сыворотку теленка (FCS) и глутамин (Gibco, США); конъюгаты холеротоксина В (СТВ) с Alexa Fluor 488 и стрептавидина с Alexa Fluor 594 (Invitrogen, США); бычий сывороточный альбумин (BSA) и мовиол® 4-88 (Sigma, США); частицы Immuno-Brite (10 мкм), содержащие 31000, 115000 или

450000 остатков флуоресцеина (Beckman Coulter Life Sciences, США); реактивы фирмы Реахим (Россия).

FSL. FSL-конструкты синтезированы, как описано ранее [16], их чистота, подтвержденная ЯМР-спектрометрией, составляет >95%.

Встраивание FSL в клетки EA.hy 926. Клетки EA.hy 926 предоставлены Edgell C.-J. (Chapel Hill, США). Клетки получены путем слияния эндотелиальных клеток из пупочной вены человека с клетками линии А-549 (карциномы легкого). По морфологии и фенотипу они воспроизводят клетки макрососудов [17]. Культивирование клеток проводили в среде DMEM-F12, содержавшей 10%-ную фетальную сыворотку теленка и 2 мМ глутамин, при 37°С в атмосфере 5% СО₂ (инкубатор Sanyo, Япония). В лунках 24-луночного планшета (Nunc, Дания) к монослою клеток после отмывки средой DMEM-F12, содержавшей 0.3%ную фетальную сыворотку теленка (DMEM-0.3% FCS), добавляли FSL (конечная концентрация 5 мкМ). Встраивание проводили, инкубируя клетки с FSL в течение разных промежутков времени при 37°C, 5% CO₂. Далее клетки снимали с пластика раствором Версена (PBS, содержавший 0.02% ЭДТА), отмывали 3 раза PBA (PBS, содержавший 0.2% BSA) центрифугированием при 90 g, 4°C в течение 3 мин. Для измерения флуоресценции клеточной суспензии добавляли конъюгат стрептавидина с флуоресцеинизотиоцианатом (Str-FITC) в разведении 1:50 в PBA, инкубировали при 4°С в течение 30 мин на шейкере. Затем клетки отмывали 3 раза РВА, переносили в пробирки для цитофлуориметрии, тщательно перемешивали с 2 мл PBS. Флуоресценцию клеток измеряли на проточном лазерном цитофлуориметре FACScan (Becton-Dickinson, CША) или FC500 (Beckman Coulter, США) при 488 нм и комнатной температуре. Обработку данных проводили с помощью программы FlowJo10.8.0 (Beckton-Dickinson, США) или Kaluza 1.3 (Beckman-Coulter, США). В каждой пробе анализировали не менее 5000 клеток. Параллельно измеряли флуоресценцию стандартных частиц, полученные значения использовали для построения калибровочного графика и определения количества молекул конструктов, встроенных в одну клетку.

Выход FSL из клеток. FSL инкубировали с клетками EA.hy 926 в лунках 24-луночного планшета в течение 2 ч при 37°С, как указано выше. Клетки отмывали в среде, содержавшей 0.3% FCS, и оставляли в этой же среде без перемешивания при 37°С в атмосфере CO₂ (5%) на определенные промежутки времени, после чего снимали с пластика раствором Версена, отмывали трижды PBA в течение 3 мин при 4°С, как описано выше. Флуоресценцию клеток анализировали методом цитофлуориметрии при 488 нм и комнатной температуре. Конфокальная микроскопия. Детекцию встроенного FSL проводили, инкубируя клетки EA.hy 926 с конъюгатом стрептавидина с Alexa Fluor 594 (разведение 1 : 200 в PBA) при 4°С в течение 20 мин.

Для окрашивания рафтов клетки отмывали PBS и инкубировали с конъюгатом CTB-Alexa Fluor 488 (разведение 1 : 100 в PBS) на льду в течение 20 мин.

На предметные стекла наносили 15 мкл смеси, содержавшей 2.4 г мовиола, 6 г глицерина, 6 мл воды и 12 мл 0.2 М Tris-HCl (pH 8.5), далее добавляли 10 мкл суспензии клеток. Изображения получали с помощью конфокального микроскопа Eclipse TE-2000-E (Nicon, Япония), в каждом опыте было проанализировано не менее десяти случайно выбранных клеток. Обработку данных проводили с помощью программы ImageJ (https://imagej.nih.gov/ij/download.html).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе проведено сравнение трех FSL, имеющих одинаковый полярный участок FS и разные липидные остатки L: остаток C18-церамида, DOPE или холестерина, показана их схожесть в отношении встраивания в клеточную мембрану и выхода этих FSL из нее. Это означает, что при исследовании межклеточного переноса гликосфинголипидов, липидная часть которых представлена церамидом, оправдано использование синтетических аналогов, в которых церамидный фрагмент заменен на другой липидный остаток, в частности на легко синтезируемые производные DOPE. По той же причине DOPE-аналоги природных гликосфинголипидов, встроенные во внеклеточные микровезикулы, обещают стать перспективными молекулами-векторами для увеличения селективности доставки микровезикул, нагруженных терапевтическими молекулами.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00672).

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

- Tettamanti G., Bassi R., Viani P., Riboni L. // Biochimie. 2003. V. 85. P. 423–437. https://doi.org/10.1016/s0300-9084(03)00047-6
- Hakomori S.-I. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 225–232. https://doi.org/10.1073/pnas.012540899
- Hakomori S.-I., Handa K. // Glycoconj. J. 2015. V. 32. P. 1–8.
- https://doi.org/10.1007/s10719-014-9572-4
- Marcus D.M. // Ann. N. Y. Acad. Sci. V. 169. P. 161– 163. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1970.tb55982.x
- *Hirsch H.F., Graham H.A.* // Transfusion. 1980. V. 20. P. 474–475.
- https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1980.20480260286.x
- Oriol R., Danilovs J., Lemieux R., Terasaki P., Bernoco D. // Hum. Immunol. 1980. V. 3. P. 195–205. https://doi.org/10.1016/0198-8859(80)90014-2
- Riboni L., Paola Giussani P., Paola Viani P. // In Sphingolipids as Signaling and Regulatory Molecules / Eds. Chalfant C., Poeta M.D. Adv. Exp. Med. Biol. V. 688. New York: Springer, 2010. P. 25–45. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6741-1 2
- Rapport E.M., Khasbiullina N.R., Komarova V.A., Ryzhov I.M., Gorbatch M.M., Tuzikov A.B., Khaidukov S.V., Popova I.S., Korchagina E.Y., Henry S.M., Bovin N.V. // Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 2021. V. 1863. P. 183645. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183645

9. *Henry S.* // Curr. Opin. Hematol. 2009. V. 16. P. 467–472.

https://doi.org/10.1097/moh.0b013e328331257e

- Oliver C., Blake D., Henry S. // Transfusion. 2011. V. 51. P. 1723–1730. https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.03034.x
- Korchagina E., Tuzikov A., Formanovsky A., Popova I., Henry S., Bovin N. // Carbohydr. Res. 2012. V. 356. P. 238–246. https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.03.044
- 12. Blake D., Bovin N., Bess D., Henry S. // J. Vis. Exp. 2011. V. 54. P. e3289. https://doi.org/10.3791/3289
- Schwarzmann G., Hoffmann-Bleihauer P., Schubert J., Sandhoff K., Marsh D. // Biochemistry. 1983. V. 22. P. 5041–5048. https://doi.org/10.1021/bi00290a025
- 14. Alberts B., Johnson A., Lewis Ju., Raff M., Roberts K., Walter P. // In Molecular Biology of the Cells, 4th ed. New York, Garland Science, 2002. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26871
- 15. Nichols B.J. // Curr. Biol. 2003. V. 13. P. 686–690. https://doi.org/10.1016/s0960-9822(03)00209-4
- Henry S., Williams E., Barr K., Korchagina E., Tuzikov A., Ilyushina N., Abayzeed S.A., Webb K.F., Bovin N. // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 2845. https://doi.org/10.1038/s41598-018-21186-3
- Baranska P., Jerczynska H., Pawlowska Z., Koziolkiewicz V., Cherniewski C. // Cancer Genomics Proteomics. 2005. V. 2. P. 265–270.

Influence of the Lipid Moiety Structure on the Insertion/Release of Glycolipids in/from the Cell: A Study with Synthetic Analogues

E. V. Slivka^{*}, A. B. Tuzikov^{*}, S. V. Khaidukov^{*}, V. A. Komarova^{*}, S. Henry^{**}, N. V. Bovin^{*}, and E. M. Rapoport^{*,#}

[#]*Phone:* +7(916) 518-15-71; *e-mail: eugenia_rapoport@mail.ru*

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

**Centre for Kode Technology Innovation, School of Engineering, Auckland University of Technology, Private Bag 92006, Auckland, 1142 New Zealand

Many important aspects of intercellular glycosphingolipid (GSL) transport remain unknown, in particular how GSLs cross the glycocalyx of the cell-donor and cell-acceptor. The use of synthetic analogues instead of natural GSLs alleviates the study. However, in order to obtain adequate results, we must know how simplifications in the structure of a synthetic probe affect its properties of interest to us. In particular, how the replacement of a ceramide residue in GSL with a synthetic analogue affects the release and insertion kinetics. To this end, we compared the properties of synthetic analogues, one of which contains natural ceramide moiety, while two others have lipid residues that are more convenient in terms of the probes chemical synthesis. FSL (Function-Spacer-Lipid) constructs containing DOPE (1.2-O-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho ethanolamine), cholesterol (Chol), or C18-ceramide (Cer) lipid fragments (L) were applied. In all three probed, the lipid residues were linked to biotin with hydrophilizing CMG2-spacer-arm. Using confocal microscopy, the similarity of the localization patterns of these three probes, both with each other and with the previously studied glycoprobes (F = glycan), was shown, namely: they were observed in the form of patches of an average size of $0.3 \,\mu\text{m}$, but were not detected at all in cell rafts. At the same time, the following differences were observed in the properties of the three studied FSLs: 1) the process of insertion of the ceramide construct reaches a plateau within 3 hours, while the other two - within 1 hour; 2) the amount of inserted ceramide construct is less than the other two: 3) release of the cholesterol construct from the cells where it is pre-inserted is slower than the other two. Thus, despite some quantitative differences, qualitatively all three constructs behave similarly, that is, they are interchangeable when studying the incorporation/release of the FSL into/from the cell.

Keywords: glycans, glycosphingolipids, cell, plasma membrane, molecular probes

УДК 577.181:577.112.6

СИНТЕТИЧЕСКИЕ АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ. IV. ВЛИЯНИЕ КАТИОННЫХ ГРУПП ЛИЗИНА, АРГИНИНА И ГИСТИДИНА НА АНТИМИКРОБНУЮ АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДОВ С "КРУГОВЫМ" ТИПОМ АМФИПАТИЧНОСТИ

© 2022 г. Н. В. Амирханов^{*, #}, А. В. Бардашева^{*}, Н. В. Тикунова^{*}, Д. В. Пышный^{*}

*ФГБУН "Институт химической биологии и фундаментальной медицины" СО РАН,

Россия, 630090 Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 11.03.2022 г. После доработки 25.03.2022 г. Принята к публикации 28.03.2022 г.

В ланной работе синтезированы три новых синтетических антимикробных пептила (САМП) XFXXFFXXFF (X5F5), обладающих "круговым" (спиральным или циклическим) типом амфипатичности (KTA), содержащих катионные аминокислотные остатки аргинина, лизина или гистидина (X = Arg, Lys или His), исследована антимикробная и гемолитическая активность синтезированных пептидных препаратов. Показано, что в целом такие пептиды в сравнении с САМП XXXXXXXFF (X9F2), обладающими "линейным" типом амфипатичности (ЛТА), проявляют более чем в 8 раз большую антибактериальную и в ~2 раза меньшую противогрибковую активность. Выявлено, что по отношению к бактериальным клеткам Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella enterica и Pseudomonas aeruginosa наибольшей антибактериальной активностью обладают пептиды, содержащие в качестве катионных составляющих остатки аргинина, а наименьшей – пептиды с остатками гистидина. По отношению к грибковым культурам Candida albicans, напротив, наибольшей фунгицидной активностью обладают пептилы, содержащие в качестве катионных составляющих гистидиновые остатки. Показано, что исследованные пептиды X5F5, независимо от их катионного состава, обладают повышенной гемолитической активностью (20-60% гемолиза при 500 мкМ концентрации пептидов в среде) по сравнению с пептидами, обладающими "линейным" типом амфипатичности Х9F2 (не более 4% гемолиза при той же концентрации пептидов). Несмотря на свою относительно высокую гемолитическую активность, средняя бактериальная селективность исследованных пептидов X5F5 остается достаточно высокой, среднегеометрический терапевтический индекс (СГТИ) для которых составляет ~10, за исключением пептида H5F5, содержащего остатки гистидина (СГ ТИ = 0.5). В то же время селективность гистидин-содержащего пептида H5F5 по отношению к клеткам грибов (TU = 2.7) в 5 раз выше его селективности по отношению к бактериальным клеткам, но в 200 раз ниже фунгицидной селективности гистидин-содержащего пептида H9F2 (TИ = 571.4), обладающего "линейным" типом амфипатичности. Учитывая повышенную антибактериальную активность препаратов на основе САМП Х5F5 с "круговым" типом амфипатичности, для создания антибактериальных препаратов наиболее перспективны пептиды, содержащие в качестве катионных групп аминокислотные остатки аргинина (RSF5) и лизина (KSF5), а для создания противогрибковых агентов – пептиды с "линейным" типом амфипатичности, содержащие в качестве катионных групп аминокислотные остатки гистидина (H9F2).

Ключевые слова: синтетические антимикробные пептиды, амфифильность, "линейный" тип амфипатичности, "круговой" тип амфипатичности, гемолитическая активность, селективность, антимикробная активность, фунгицидная активность, Candida albicans, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella enterica, Pseudomonas aeruginosa

DOI: 10.31857/S0132342322050049

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время все более актуальным становится поиск новых типов антибиотиков (анти-

микробных препаратов), к которым патогенные микроорганизмы не способны были бы вырабатывать устойчивость. Перспективными в этом плане могут оказаться выявленные в природе ан-

Сокращения: АБА – антибактериальная активность; АМП – антимикробные пептиды; ГА – гемолитическая активность; КТА – "круговой" тип амфипатичности; ЛТА – "линейный" тип амфипатичности; МГК – минимальная гемолитическая концентрация (концентрация пептида, которая вызывает лизис не более 4% свежих красных кровяных клеток); МПК₅₀ – минимальная подавляющая концентрация (концентрация пептида, при которой рост микроорганизмов подавляется на 50%); САМП – синтетические антимикробные пептиды; ФА – фунгицидная активность; ХГ – хлоргексидин; Fmoc – 9-флуоренилметоксикарбонил; НАТU – 2-(1*H*-7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуронийгексафторфосфат; Hst – гистатин; PBS – фосфатно-солевой буфер; TFA – трифторуксусная кислота.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (383) 363-51-35; эл. почта: nariman@niboch.nsc.ru).

тимикробные пептиды (АМП), синтезирующиеся в ответ на контакт с чужеродными микроорганизмами или их внедрение [1–4]. АМП – это в основном амфифильные катионные пептиды, которые воздействуют на отрицательно заряженную мембрану микробных клеток. В результате такого воздействия развитие резистентности патогенов к АМП в значительной степени затруднено, поскольку требует внесения серьезных изменений в структуру и электрофизиологические свойства их клеточной мембраны [1, 4–7].

В последнее время для исследования зависимости биологических свойств АМП от их структуры и аминокислотного состава с целью моделирования и поиска оптимальных и максимально простых по составу структур АМП с новыми улучшенными свойствами все больше используются искусственно создаваемые синтетические антимикробные пептиды (САМП) [4, 8–10], которые отличаются от природных АМП [11-14] или от их синтетических аналогов [9, 15–18] тем, что они могут быть сконструированы de novo, т.е. независимо от структуры многочисленно известных природных АМП [4, 8–10, 18–21]. Конструирование таких САМП должно быть основано на двух общих принципах воздействия АМП на микробные клетки, в частности на принципах катионности цепи и амфифильности пептида, т.е. наличия в молекуле пептида одновременно гидрофобных и гидрофильных катионных положительно заряженных групп [8, 9, 18]. Катионность цепи способствует взаимодействию с отрицательно заряженными микробными поверхностями, а гидрофобность позволяет встраиваться в микробные мембраны.

Однако для эффективного воздействия на мембраны микробных клеток наличия хаотично расположенных амфифильных групп в таких пептидах недостаточно. Существенное влияние на проявление биологических свойств может оказать последовательная линейная сгруппированность амфифильных групп вдоль цепи самой пептидной молекулы или образуемая определенным образом сосредоточенность таких групп в пространстве. Например, в зависимости от характера или типа сгруппированности и взаимного расположения полярных (гидрофильных и гидрофобных) амфифильных групп в АМП относительно друг друга в пространстве такие катионные амфифильные пептиды могут быть разделены на два подтипа или класса амфипатичности: пептиды с классическим широко известным и хорошо исследованным в литературе "круговым" (спиральным или кольцевым) типом амфипатичности (КТА) [2, 12, 13, 21, 22] (рис. 1а) и пептиды с малоизвестным "линейным" типом амфипатичности (ЛТА) (рис. 16) [23–25]. Следует подчеркнуть, что пространственная сгруппированность амфифильных групп в САМП-КТА предполагает обязательное наличие α-спиральной структурированности самой молекулы пептида. благодаря которой на молекуле пептида образуются разделенные в пространстве своеобразные поверхности – гидрофильная "спинка" и гидрофобный "животик" (рис. 1а), тогда как в случае САМП-ЛТА достаточно лишь последовательного (линейного) расположения катионных групп друг за другом, образующих так называемую "хвостовую" катионную (гидрофильную) область пептидной молекулы и отдельную концевую часть в виде гидрофобной "головки" (рис. 16). Оба типа таких пептидов (САМП-КТА и САМП-ЛТА) считаются амфифильными, поскольку имеют одновременно и гидрофильные, и гидрофобные группы, однако обладают различным типом амфипатичности, т.е. различным типом взаимного расположения амфифильных групп в пространстве.

Предполагается, что вследствие такой разной геометрической структурированности САМП-КТА и САМП-ЛТА механизмы и эффективность воздействия этих пептидов на микроорганизмы, так же как и их различная структура, могут быть разными [23, 24]. Говоря же о терапевтической значимости и токсичности таких пептидов, можно обратить внимание, например, на то, что САМП-КТА, исходя из своей структуры, должны быть более гидрофобными, а соответственно, и более токсичными по отношению к красным кровяным тельцам, т.е. обладать большей гемолитической активностью, чем САМП-ЛТА [23, 24].

Помимо разного типа амфипатичности пептидов на эффективность биологического воздействия также может оказывать влияние и их различный *катионный состав* [25]. Так, например, ранее было показано, что наличие различных катионных аминокислотных остатков, таких как аргинин, лизин или гистидин, в модельных САМП-ЛТА XXXXXXXFF (**X9F2**) (X = Arg, Lys или His), по-разному способно влиять на антимикробную активность самого пептида [25]. Было выявлено, что аргинин- и лизин-содержащие производные таких пептидов обладают повышенной антибактериальной активностью, а пептиды, содержащие остатки гистидина, — повышенной антигрибковой активностью [25].

Тем не менее на настоящий момент аналогичное влияние катионного аминокислотного состава на свойства САМП-КТА, обладающих классическим "круговым" типом амфипатичности, не было исследовано. В настоящей работе нам необходимо было выяснить, уникальны ли обнаруженные для САМП-ЛТА особенности их антимикробной активности в зависимости от катионного аминокислотного состава или такими же особенностями обладают и САМП-КТА. Также необходимо было сравнить биологические свойства таких типов САМП друг с другом.

Цель настоящей работы — синтез и сравнительное исследование антимикробных и гемолитических свойств, а также оценка терапевтического индекса САМП: RFRRFFRRFF, KFK- СИНТЕТИЧЕСКИЕ АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ



Рис. 1. Гипотетическое представление классического "*кругового*" (*a*) и "*линейного*" (*б*) типов амфипатичности α-спиральных пептидов. Прямоугольниками обозначены гидрофильные или катионные остатки аминокислот, треугольниками – гидрофобные остатки. В случае классического "кругового" типа амфипатичности (КТА) [2, 12, 13] гидрофобные и гидрофильные полярные поверхности α-спиральной молекулы пептида разделены продольной осевой линией (*a*). На рисунке верхняя поверхность гидрофильная, нижняя – гидрофобные и гидрофильные (катионные) остатки аминокислот типа амфипатичность по типу "спинка—животик"). В случае линейного типа амфипатичности (ЛТА) гидрофобные и гидрофобная и гидрофильные) остатки аминокислот разнесены на противоположных концах вдоль линейной оси пептида. Гидрофобная и гидрофильная полярные области в этом случае разделены поперечной линией, перпендикулярной продольной оси пептида (*б*), где один (левый) конец молекулы имеет гидрофильный "хвостик", а противоположный (правый) – гидрофобную "головку". Справа представлены двумерные проекции "спиральных колес" Шиффер и Эдмундсона [21, 22] этих же пептидов. Видно, что полярная однородность гидрофобных и гидрофильных групп в случае "линейного" типа амфипатичности (*б*) в проекции, представленной слева, гораздо выше, чем когда та же молекула представлена в классическом виде в виде двумерных проекции "спиральных колес" (справа).

КFFKKFF и HFHHFFHHFF (**X5F5**) (X = Arg, Lys или His), обладающих так называемым "круговым" (спиральным) типом амфипатичности, в зависимости от их катионного аминокислотного состава (аргинина, лизина или гистидина), а также сравнение полученных результатов с аналогичными данными для пептидов с "линейным" типом амфипатичности: RRRRRRRRFF, KKK-KKKKKKFF и HHHHHHHHFF (**X9F2**).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структура, синтез и физико-химические свойства пептидов. В качестве модельных последовательностей для изучения свойств САМП-КТА и САМП-ЛТА нами были использованы соответствующие пептиды общей структуры XFXXFFXXFF (X5F5) и XXXXXXXXFF (X9F2) (X = Arg, Lys или His), состоящие из катионных остатков аргинина, лизина или гистидина и гидрофобных остатков фенилаланина. Последовательности пептидов **X5F5** построены таким образом, что в проекциях спиральных колец [2, 21, 22] все катионные (гидрофильные) аминокислотные остатки расположены компактно на одной стороне круга, а гидрофобные остатки – на противоположной (рис. 2*a*), а на самой молекуле пептида эти остатки образуют разделенные друг от друга, соответственно, гидрофильные и гидрофобные поверхности (рис. 1*a*).

Напротив, в случае пептидов **X9F2** с "линейным" типом амфипатичности катионные (X) и гидрофобные (F) группы в двумерных проекциях расположены хаотично по проекционному кругу (рис. 26) и не образуют таким образом "круговой" тип амфипатичности. Полярно противоположные (гидрофобные и гидрофильные) амфифильные группы в таких пептидах компактно распределены по концам линейно вытянутой молекулы, образуя таким образом "линейный" тип амфипатичности, когда все катионные остатки сосредоточены на одном конце цепи в виде так называемого гидрофильного "хвоста", а гидрофобные



Рис. 2. Структуры пептидов XFXXFFXXFF (**X5F5**) (*a*) и XXXXXXXXFF (**X9F2**) (*b*) (X = Arg, Lys, His), образующих, соответственно, "круговой" и "линейный" тип амфипатичности, представленные в виде двумерных проекций "спиральных колес" Шиффер и Эдмундсона [2, 21, 22]. Видно, что последовательности аминокислот в пептиде **X5F5** сконструированы таким образом, что все пять гидрофильных остатков расположены на одной стороне круговой проекции, а пять гидрофобных остатков – на противоположной стороне круга, образуя таким образом некую полярную однородность гидрофобных и гидрофильных групп, т.е. строго амфипатичную гидрофобно-гидрофильную круговую асимметрию. В проекциях пептида **X9F2** амфифильные группы расположены хаотично по кругу, не образуя при этом какуюлибо строгую асимметрию, характерную для "кругового" типа амфипатичности.

остатки — на другом конце цепи в виде так называемой гидрофобной "головки" (рис. 1δ).

Синтез пептидов X5F5 и X9F2 проводили станлартным твердофазным методом с использованием Fmoc-стратегии [26] согласно ранее опубликованной схеме [25] на пептидном синтезаторе PS3. Структура синтезированных пептидов X5F5 и X9F2 (H₂N-XFXXFFXXFF-C(O)NH₂ и $H_2N-X_9F_2-C(O)NH_2$ (X = Arg, Lys, His)) включала в себя последовательность аминокислот, содержащую свободную *N*-концевую аминогруппу (придающую пептиду дополнительный положительный заряд), и амидную группу на С-конце цепи, нейтрализующую отрицательный заряд свободной концевой карбоксильной группы. Эффективность присоединения одного аминокислотного мономерного звена, определенная путем измерения количества удаляемых Fmoc-групп на каждой стадии конденсации, для синтезированных пептидов в среднем составляла 96.9–99.8%. Конечные выходы пептидов после деблокирования, удаления с полимерного носителя и очистки методом офВЭЖХ составили ~58-63% для САМП-КТА X5F5 и ~56-63% для САМП-ЛТА X9F2 (табл. 1). По данным офВЭЖХ и масс-спектрометрии, все выделенные пептиды соответствовали ожидаемой структуре и были гомогенными с содержанием основного вещества не менее 95%. Время удерживания на колонке при офВЭЖХ САМП-КТА X5F5 по сравнению с соответствующими САМП-ЛТА X9F2 [25] (табл. 1) было в целом закономерно выше, что связано с увеличенным содержанием в их составе гидрофобных остатков фенилаланина (пять и два остатка Phe соответственно). Согласно этим данным, в случае как САМП-КТА X5F5, так и САМП-ЛТА X9F2 наиболее гидрофобны пептиды, содержащие в качестве катионных групп остатки аргинина, затем – остатки гистидина, наименьшей гидрофобностью обладают пептиды, содержащие остатки лизина.

Таким образом, синтез всех пептидов X5F5 в указанном режиме проходит достаточно эффективно, как и в случае ранее полученных пептидов X9F2 [25] с относительно высокими выходами независимо от состава аминокислот в структуре пептида, а зависимость гидрофобности соответствующих пептидов от их катионного состава по данным офВЭЖХ для САМП-КТА и САМП-ЛТА может быть расположена в одном ряду следующим образом:

R5F5 > H5F5 > K5F5; R9F2 > H9F2 > K9F2.

Антимикробная активность пептидов. Антимикробную активность пептидов X5F5 и X9F2 изучали с использованием культур микроорганизмов: грамположительных (*Staphylococcus aureus*) и грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli, Salmonella enterica, Pseudomonas aeruginosa*), а также условно-
Пептил	Структура	Общий выход	ц Время удерживания ⁶ , мин		Молекулярная масса	
пеннид	Структура	синтеза ^а , %	80% CH ₃ CN	50% CH ₃ CN	расч. [<i>M</i> + H]	эксп. [<i>M</i> + H]
		САМП-КТА	$\mathbf{X5F5} (\mathbf{X} - \mathbf{Arg},$	Lys или His)		
R5F5	RFRRFFRRFF	60.3	17.5	22.6	1533.8	1533.4
K5F5	KFKKFFKKFF	57.8	16.9	21.9	1393.8	1393.2
H5F5	HFHHFFHHFF	62.9	17.0	22.0	1438.6	1438.2
	1	САМП-ЛТА	X9F2 (X - Arg,	Lys или His)		•
R9F2	RRRRRRRRFF	56.0	15.5	20.4	1717.0	1716.5
K9F2	KKKKKKKKKFF	57.8	14.6	18.2	1465.0	1465.3
H9F2	ННННННННББ	62.9	15.6	20.0	1545.7	1545.8

Таблица 1. Физико-химические характеристики пептидов

^а Конечный выход после удаления с полимерного носителя и очистки методом офВЭЖХ в расчете на первую загруженную аминокислоту на полимерном носителе.

⁶ В условиях аналитической офВЭЖХ (условия – см. "Эксперим. часть").

патогенного дрожжеподобного гриба Candida albicans.

Тестируемые пептиды в конечных концентрациях 0.3—100 мкМ добавляли к культурам клеток микроорганизмов и наблюдали за ростом клеток. Влияние присутствия пептидов в культуральной среде на рост клеток контролировали измерением оптической плотности суспензии клеток при длине волны 595 нм в течение 24 ч [23—25].

Для оценки антимикробной активности исследованных пептидов были определены их минимальные подавляющие концентрации (МПК₅₀), при воздействии которых доля микробных частиц составляла 50% от концентрации частиц в контрольной культуре [25]. Для сравнения усредненной антимикробной активности пептидных препаратов для всех протестированных культур микроорганизмов были определены их среднегеометрические (СГ) [27, 28] значения МПК₅₀. Значения МПК₅₀ и СГ МПК₅₀, характеризующие антимикробную активность каждой из групп САМП-КТА **Х5F5** и САМП-ЛТА **Х9F2**, представлены в табл. 2.

В качестве универсальных положительных контролей для сравнения относительной антимикробной активности исследуемых пептидов использовали известные антисептические препараты — водные растворы нитрата серебра (AgNO₃) и хлоргексидина (XГ). В некоторых случаях антимикробная активность исследуемых пептидов значительно превышала активность контрольных препаратов AgNO₃ и ХГ, а в других — оказалась ниже. Например, в случае дрожжевой культуры *C. albicans* значения МПК₅₀ для всех исследуемых пептидов — как САМП-КТА, так и САМП-ЛТА (МПК₅₀ от 1.4 до 25.9 мкМ) — были ниже, чем МПК₅₀ для контрольных препаратов AgNO₃ и ХГ (МПК₅₀ = 57.8 и 33.4 мкМ) (табл. 2), что указывает на большую противогрибковую активность исследуемых пептидов по сравнению с $AgNO_3 u X\Gamma$. В случае же бактериальных культур, напротив, антибактериальная активность контрольных препаратов $AgNO_3 u X\Gamma$ была выше ($C\Gamma M\Pi K_{50} = 38.6$ и 7.6 мкМ), чем у исследуемых пептидов. Таким образом, $AgNO_3 u X\Gamma$ проявили себя в качестве удобных, универсальных и надежных положительных контролей для исследования как антимикробной, так и антигрибковой активности САМП-КТА и САМП-ЛТА.

При сравнении антибактериальной активности пептидов в зависимости от их катионного состава следует отметить, что в группе исследуемых САМП-КТА максимальным антибактериальным действием по отношению ко всем исследованным бактериальным культурам, т.е. наименьшим значением СГ МПК₅₀, обладает аргинин-содержащий пептид R5F5 (3.3 мкМ), следующим по активности в этой группе пептидов оказался пептид К5F5 (5.5 мкМ), содержащий остатки лизина, тогда как пептид H5F5, содержащий остатки гистидина, проявил существенно меньшую активность (46.4 мкМ) (табл. 2). Аналогичная закономерность зависимости антибактериальной активности от катионного состава аминокислот наблюдается и в группе САМП-ЛТА X9F2. Таким образом, средняя антибактериальная активность для каждого из пептидов группы САМП-КТА и САМП-ЛТА в зависимости от их катионного состава понижается в ряду:

$R5F5 > K5F5 \gg H5F5;$

R9F2 > **K9F2** > **H9F2**.

Средняя антигрибковая активность (по отношению к условно-патогенной дрожжевой культуре *C. albicans*) для этих же пептидов (табл. 2), напротив, в каждой группе максимальна для гисти-

Пептид	Candida albicans	Staphylococcus aureus	Escherichia coli	Salmonella enterica	Pseudomonas aeruginosa	СГ ₁ , мкМ		
	САМП-КТА X5F5 (X – Arg, Lys или His)							
R5F5	17.0	6.2	4.7	2.1	1.9	3.3		
K5F5	25.9	17.0	6.5	3.2	2.6	5.5		
H5F5	7.7	58.1	80.0	30.3	32.8	46.4		
СГ2, мкМ	15.0	18.3	13.5	5.9	5.5	9.4 ^a		
	, ,	САМП-ЛТА	X9F2 (X $-$ Arg,	Lys или His)				
R9F2	12.9	44.2	46.0	68.8	67.0	55.3		
K9F2	18.9	>100.0	74.0	>100.0	70.5	>72.2		
H9F2	1.4	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0		
СГ ₂ , мкМ	7.0	≫76.2	>69.8	≥88.3	≥77.9	>77.8 ^a		
AgNO ₃ ⁶	57.8	51.2	32.9	39.5	33.5	38.6		
ΧΓ ⁶	33.4	4.1	6.5	12.0	10.5	7.6		

Таблица 2. Антимикробная активность пептидов

СГ₁ – среднегеометрические значения МПК₅₀ по всем бактериям отдельно для каждого пептида (СГ по горизонтали, учитывая лишь бактериальные культуры).

 $C\Gamma_2$ – среднегеометрические значения МПК₅₀ по всем трем пептидам (X – Arg, Lys и His) для каждой культуры клеток отдельно (СГ по вертикали).

^а Суммарное среднегеометрическое значение МПК₅₀ по всем бактериям и пептидам для соответствующей группы САМП-КТА и САМП-ЛТА.

⁶ Водные растворы нитрата серебра (AgNO₃) и хлоргексидина (ХГ) использовали в качестве внутренних положительных контролей для сравнения относительной антимикробной активности пептидов.

дин-содержащих пептидов **H5F5** и **H9F2** (МП K_{50} = = 7.7 и 1.4 мкМ соответственно):

H5F5 > R5F5 > K5F5;

$H9F2 \gg R9F2 > K9F2$.

Таким образом, катионный состав АМП играет существенную роль, как в случае САМП-КТА, так и САМП-ЛТА, и обусловливает различное воздействие на клетки бактерий и грибов.

В каждой группе пептидных препаратов в отдельности были определены также суммарные среднегеометрические значения МПК₅₀ (СГ₁, табл. 2) по всем четырем видам исследованных бактериальных культур и трем катионным производным (Arg, Lys или His) пептидов, которые для САМП-КТА и САМП-ЛТА составили 9.4 и >77.8 мкМ соответственно. Таким образом, антибактериальная активность (АБА) САМП-КТА в целом более чем в 8 раз превосходит активность САМП-ЛТА:

$A \overline{b} A_{CAM\Pi-KTA} \gg A \overline{b} A_{CAM\Pi-ЛTA}.$

При сравнении антигрибковой активности двух рассматриваемых групп пептидов, напротив, САМП-ЛТА в целом проявили более высокую противогрибковую активность (СГ₂ = 7.0), чем САМП-КТА (СГ₂ = 15.0) (табл. 2). Другими словами, средняя антигрибковая или фунгицидная активность (ФА) для пептидов из группы САМП-

ЛТА в целом более чем в 2 раза превышает ФА для пептидов из группы САМП-КТА:

$\Phi A_{\text{CAMIT-KTA}} < \Phi A_{\text{CAMIT-JITA}}.$

Противогрибковая активность САМП-ЛТА существенно выше не только по отношению к противогрибковой активности САМП-КТА, но и выше также по отношению к антибактериальной активности этой же группы пептидов внутри самой группы САМП-ЛТА. Так, например, в случае САМП-ЛТА общая средняя фунгицидная активность пептидов **R9F2**, **K9F2** и **H9F2** ($C\Gamma_2 = 7.0$ мкМ) более чем в 10 раз превышает их общую среднюю антибактериальную активность (СГ $_1$ > 77.8 мкМ) (табл. 2). Напротив, в случае САМП-КТА общая противогрибковая активность пептидов R5F5, **К5F5** и **H5F5** (СГ₂ = 15.0 мкМ) была в ~2 раза ниже их обшей антибактериальной активности (СГ₁ = 9.4 мкМ). Другими словами, пептиды из группы САМП-КТА более предпочтительно воздействуют на клетки бактерий, чем на клетки грибов, а пептиды из группы САМП-ЛТА, напротив, более эффективно воздействуют на клетки грибов, чем на клетки бактерий:

 $A E A_{CAM\Pi-KTA} > \Phi A_{CAM\Pi-KTA};$

АБА_{САМП-ЛТА} $\ll \Phi A_{CAMП-ЛТА}$.

Говоря о повышенной антибактериальной избирательной активности САМП-КТА по сравнению с САМП-ЛТА (АБА_{САМП-КТА} > АБА_{САМП-ЛТА}), можно предположить, что для проявления антибактериальной активности, вероятно, более характерен именно классический тип амфипатичности, образуемый α-спиральными пептидами. Катионные пептиды при контакте с микробными клетками проходят вначале через внешнюю мембрану и слой пептидогликана и далее взаимодействуют с отрицательно заряженными головками фосфолипидных групп цитоплазматической мембраны [17]. Согласно литературным данным, короткие α-спиральные АМР, как правило, не структурированы или слабо структурированы в растворе [8, 9, 17]. Отмечается, что при взаимодействии с отрицательно заряженной поверхностью мембран α-спиральная амфипатическая структурированность САМП-КТА способна усиливаться, и это способствует внедрению образовавшейся гидрофобной поверхности САМП-КТА во внутренний бислой фосфолипидной мембраны [17]. Вначале такие пептиды укладываются или плавают по поверхности мембраны в виде "бревен", затем собираются в агрегаты типа "плотов" и образуют торроидальные поры в мембране, через которые может выливаться наружу внутреннее содержимое цитоплазмы [17]. В конечном счете такое действие пептидов может приводить к гибели клетки.

Пептиды с "линейным" типом амфипатичности структурированы таким образом, что образуют лишь гидрофильные и гидрофобные концы (рис. 16), при этом исключается образование раздельных гидрофобных и гидрофильных α-спиральных поверхностей (рис. 16 и 26). Вследствие этого в случае САМП-ЛТА, скорее всего, возможна реализация другого, более простого, "коврового", способа воздействия на мембрану [17, 23]. Катионные пептиды при этом вначале устилают отрицательно заряженную поверхность в виде ковра с дальнейшим внедрением гидрофобных головок во внутренний бислой фосфолипидной мембраны и тем самым дестабилизируют цитоплазматическую мембрану в целом. Это приводит к разрушению мембраны и гибели клетки, но при больших концентрациях, чем в случае воздействия путем образования "торроидальных" пор с участием САМП-КТА.

Таким образом, "круговой" тип амфипатичности в случае воздействия на бактериальные клетки в исследованных нами случаях оказывается более эффективным по сравнению с "линейным" типом амфипатичности.

С другой стороны, в случае воздействия на клетки грибов "линейный" тип амфипатичности более эффективен и предпочтителен по сравнению с классическим типом амфипатичности. Вероятно, пептиды с "линейным" типом амфипатичности из-за своей меньшей структурированности в пространстве при взаимодействии с отрицательно заряженными компонентами клеточной стенки грибов и большей линейной однородности гораздо легче проникают (проскальзывают) через более жестко сформированные и структурированные клеточные стенки грибов, чем через стенки бактерий. Таким образом, пространственная α-спиральная структурированность пептидов, усиленная взаимодействием с отрицательно заряженными компонентами клеточной стенки грибов, в случае САМП-КТА создает некоторые стерические препятствия или барьеры при прохождении через клеточные стенки грибов, тем самым снижая эффективность их воздействия по сравнению с эффективностью воздействия САМП-ЛТА.

Следует также обратить внимание на избирательное отношение САМП к грибковым клеткам по сравнению с бактериальными клетками в зависимости не только от типа амфипатичности (КТА или ЛТА), но и от их катионного состава пептидов. Так, например, среди всех исследованных катионных пептидов как в группе САМП-КТА, так и САМП-ЛТА наблюдается повышенная противогрибковая активность гистидин-содержащих пептидов **H5F5** и **H9F2** (МП $K_{50} = 7.7$ и 1.4 мкМ соответственно), которая в $\sim 2-3$ и 9–13 раз превышает противогрибковую активность, проявляемую соответствующими аргинин- (R5F5 и **R9F2**) (МПК₅₀ = 17.0 и 12.9 мкМ) и лизин-содержащими (**K5F5** и **K9F2**) (МПК₅₀ = 25.9 и 18.9 мкМ) катионными производными (табл. 2). Такое избирательное действие пептидов H5F5 и H9F2, содержащих остатки гистидина, по отношению к грибковым культурам по сравнению с аргинин-и лизин-содержащими катионными пептидами подтверждается литературными данными, в которых указывается на целый класс гистилин-содержащих природных АМП, так называемых гистатинов (Hst) - богатых гистидином (катионных) антимикробных белков [29]. Известно, что Hst содержатся в слюне [30] и проявляют избирательную активность как к условно-патогенным дрожжевым культурам, таким как *C. albicans* [30], так и к другим дрожжевым культурам [31].

Согласно литературным данным (см., например, обзор Puri et al. [29] и приведенные в нем ссылки), один из представителей гистатинов -Hst 5 – связывается с белками клеточной стенки C. albicans (Ssa1/2) и гликанами и поглошается клетками посредством переносчиков грибковых полиаминов. Попав внутрь грибковых клеток, Hst 5 может влиять на функции митохондрий и вызывать окислительный стресс, однако конечная причина гибели клеток – дисрегуляция объема и дисбаланс ионов, вызванный осмотическим стрессом. Но поскольку специфической активностью по отношению к C. albicans обладает не только Hst 5, но и остальные гистатины, содержащие в своем составе остатки гистилинов, вполне уместно предположить, что на поверхности дрожжевых клеток C. albicans имеются специфические рецепторы к гистидин-богатым пептидам. Другими словами, причина проникновения гистатинов, как можно предположить, — это не их катионные свойства (например, у гистидин-содержащих пептидов **H9F2** и **H5F5** один положительный заряд, образованный за счет открытой концевой аминогруппы, и слабый положительный заряд за счет остатков гистидина), а наличие рецепторов, специфических к гистидин-богатым пептидам. Проникновение в клетку в данном случае, скорее всего, должно идти не по электростатическому, а по рецептор-опосредованному механизму, хотя электростатическое взаимодействие также играет немаловажную роль в первоначальном связывании с отрицательно заряженной поверхностью клетки *C. albicans*.

В случае САМП-ЛТА **H9F2** избирательное противогрибковое воздействие многократно усиливается как за счет содержания в составе пептида гистидина, так и одновременно за счет его типа амфипатичности. Так, например, при сравнении действия САМП-ЛТА и САМП-КТА на С. albicans и на клетки бактерий, пептид H9F2 из группы САМП-ЛТА проявил антигрибковую активность (МПК₅₀ = 1.4 мкМ), превышающую его антибактериальную активность (МПК₅₀ > 100.0 мкМ) более чем в 70 раз, тогда как аналогичный гистидин-содержащий пептид H5F5 из группы САМПантигрибковую проявил активность KTA $(M\Pi K_{50} = 7.7 \text{ мкM})$, превышающую его антибактериальную активность (МПК₅₀ = 46.4 мкМ) всего лишь в 6 раз. Другими словами, гистидин-содержащие пептиды проявляют высокую избирапротивогрибковую активность тельную по сравнению с действием на клетки бактерий не только за счет содержания остатков гистидинов, обладающих определенным повышенным сродством к поверхности грибковых клеток, но и за счет своего типа амфипатичности.

Таким образом, в группе пептидов САМП-КТА, как и в случае ранее исследованных САМП-ЛТА, наибольшей антибактериальной активностью обладают пептиды, содержащие в качестве катионных составляющих аргининовые остатки, и наименышей – пептилы с остатками гистилина. По отношению же к грибковым культурам, напротив, наибольшей противогрибковой активностью обладают пептиды, содержащие в качестве катионных составляющих гистидиновые остатки. В целом САМП-КТА при сравнении их с САМП-ЛТА проявляют большую антибактериальную активность и меньшую фунгицидную активность, при этом особо высокой антигрибковой активностью обладает гистидин-содержащий пептид H9F2 из группы САМП-ЛТА, активность которого существенно выше аналогичной активности, проявляемой гистидин-содержащим пептидом H5F5 из группы САМП-КТА.

Гемолитическая активность пептидов. Эксперименты, проведенные с лизисом эритроцитов, показали, что САМП-КТА X5F5 обладают не только повышенной антибактериальной актив-

ностью, но также и существенно большей гемолитической активностью (рис. 3а), чем САМП-ЛТА (рис. 36). Например, как ранее было показано [25], гемолитическая активность при действии САМП-ЛТА **R9F2**, **K9F2** и **H9F2** *in vitro* даже при лостаточно высокой их концентрации в среде (1000 мкМ), содержащей эритроциты, составляла 3-4%, а при концентрации 500 мкМ лизису подвергалось всего лишь 2.4. 1.0 и 2.7% эритроцитов соответственно (рис. 36), тогда как уровень гемолиза для пептидов **R5F5**. **К5F5** и **H5F5** из группы САМП-КТА при той же их концентрации в среде 500 мкМ составил уже 37.9, 22.9 и 62.6% соответственно (рис. 3*a*). т.е. САМП-КТА по уровню их действия на эритроциты оказались в 15-20 раз более токсичными, чем САМП-ЛТА.

Такая высокая гемолитическая активность САМП-КТА **X5F5**, скорее всего, связана с их повышенной гидрофобностью, обусловленной содержанием в составе этих пептидов пяти гидрофобных остатков фенилаланина, тогда как в САМП-ЛТА **X9F2** содержится всего два таких гидрофобных остатка. Аналогичное влияние гидрофобности АМП на их гемолитическую активность было отмечено ранее во многих работах [8, 9, 32, 33]. Таким образом, в целом гемолитическая активность (ГА), проявляемая САМП-КТА, больше той же активности, проявляемой САМП-ЛТА:

$\Gamma A_{CAM\Pi-KTA} > \Gamma A_{CAM\Pi-\Pi TA}.$

Среди аргинин-, лизин- и гистидин-содержащих пептидов, как в группе САМП-КТА, так и в ранее исследованной группе САМП-ЛТА, наименьшей токсичностью по отношению к эритроцитам обладают лизин-содержащие пептиды **К5F5** и **К9F2**, а наибольшей – гистидин-содержащие пептиды **H5F5** и **H9F2** (рис. 3).

Таким образом, в зависимости от катионного состава аминокислот (Arg, Lys или His) относительную токсичность как САМП-КТА **Х5F5**, так и САМП-ЛТА **Х9F2** можно расположить в одном ряду по возрастанию их гемолитической активности:

H5F5 > R5F5 > K5F5; H9F2 > R9F2 > K9F2.

Терапевтический индекс. Увеличение антимикробной активности АМП часто сопровождается увеличением их гемолитического действия, т.е. способности разрушать эритроциты [8, 9, 34, 35]. Другими словами, активный в отношении микроорганизмов препарат может оказаться в свою очередь также и довольно токсичным. В таком случае терапевтический потенциал антимикробных агентов оценивается на основе селективности их действия на исследуемые патогенные микроорганизмы по сравнению с аналогичным их действием на эритроциты, в виде терапевтического индекса (ТИ), т.е. как отношение величины минимальной гемолитической концентрации (МГК) к величине МПК, где МГК – концентра-



Рис. 3. Гемолитическая активность САМП-КТА (а) и САМП-ЛТА (б).

ция пептида, вызывающая лизис определенной доли свежих красных кровяных телец [24, 27].

Для оценки селективности действия пептидов нами были определены величины МГК пептидов и вычислены их значения ТИ (табл. 3). Для сравнения селективности каждого пептида по отношению ко всем бактериальным культурам в целом были подсчитаны также среднегеометрические (СГ) значения ТИ для каждого из пептидов по отношению ко всем исследованным бактериальным культурам, а также среднегеометрические значения ТИ по всем трем пептидам (X – Arg, Lys и His) для каждой культуры клеток отдельно.

В случае САМП-КТА **Х5F5** наблюдается их высокая антибактериальная (СГ МПК₅₀ = 9.4 мкМ) (табл. 2) и одновременно высокая гемолитическая активность (СГ МГК = 35 мкМ) (табл. 3). Последний фактор существенно снижает среднюю селективность препаратов на основе САМП-КТА (СГ ТИ = 3.7) (табл. 3). Тем не менее, несмотря на свою повышенную токсичность,

некоторые САМП-КТА благодаря своей повышенной антибактериальной активности проявили относительно высокую селективность по отношению к отдельным бактериальным культурам. Например, высокая бактериальная селективность проявляется у аргинин- и лизин-содержащих пептидов **R5F5** и **K5F5** по отношению к бактериальным культурам *S. enterica* (ТИ = 15.7 и 18.8) и *P. aeruginosa* (ТИ = 17.4 и 23.1) – значения ТИ у этих пептидов выше значений ТИ аналогичных менее токсичных САМП-ЛТА **R9F2** и **К9F2** по отношению к тем же культурам клеток (ТИ = 13.4 и <10.0 для *S. enterica*; ТИ = 13.7 и 14.2 для *P. aeruginosa*) (табл. 3).

В случае САМП-ЛТА **Х9F2**, напротив, наблюдается меньшая антибактериальная активность пептидов при их меньшей гемолитической активности. Первый из этих факторов уменьшает, а последний — увеличивает селективность этих препаратов. Например, СГ ТИ для САМП-КТА **R5F5** и **K5F5** составляет 10.0 и 10.9 соответственно, за исключением пептида **H5F5**, содержащего остатки гистидина (СГ ТИ = 0.5), а значение СГ ТИ

Π			ТИб					
пептиды	МІ К ", МКМ	C. albicans	S. aureus	E. coli	S. enterica	P. aeruginosa		
САМП-КТА X5F5 (X – Arg, Lys или His)								
R5F5	33	1.9	5.3	7.0	15.7	17.4	10.0	
K5F5	60	2.3	3.5	9.2	18.8	23.1	10.9	
H5F5	21	2.7	0.4	0.3	0.7	0.6	0.5	
$C\Gamma_2$	35	2.3	1.9	2.6	5.9	6.4	3.7 ^в	
		CAMI	Т-ЛТА Х9F2 (Х	К — Arg, Lys ил	и His)	1 1		
R9F2	920	71.3	20.8	20.0	13.4	13.7	16.6	
K9F2	1000	52.9	<10.0	13.5	<10.0	14.2	<11.8	
H9F2	800	571.4	<8.0	<8.0	<8.0	<8.0	<8.0	
$C\Gamma_2$	903	129.2	<11.9	<12.9	<10.2	<11.6	<11.6 ^в	

Таблица 3. Минимальная гемолитическая концентрация (МГК), терапевтический индекс (ТИ) и среднегеометрические (СГ) значения МГК и ТИ исследуемых пептидов

^а МГК – минимальная гемолитическая концентрация – такая концентрация пептида (мкМ), которая вызывает лизис 4% свежих красных кровяных клеток. Средняя ошибка приведенных значений МГК, ТИ и СГ не превышает величины 15–20%.

⁶ ТИ – терапевтический индекс для каждой культуры микроорганизмов по отдельности, выраженный в виде отношения значения МГК к МПК₅₀. Большие значения ТИ указывают на большую селективность пептида.

^в Суммарное среднегеометрическое значение ТИ по всем бактериям и пептидам для соответствующей группы САМП-ЛТА и САМП-КТА.

СГ₁ – среднегеометрические значения ТИ по всем бактериям отдельно для каждого пептида (СГ по горизонтали, учитывая лишь бактериальные культуры).

СГ₂ – среднегеометрические значения МГК (мкМ) и ТИ по всем трем пептидам (X – Arg, Lys и His) для каждой культуры клеток отдельно (СГ по вертикали).

для САМП-ЛТА **R9F2** составляет 16.6 – величину не только сравнимую, но и даже превышающую аналогичное значение СГ ТИ для САМП-КТА **R5F5** (СГ ТИ = 10.0) (табл. 3). Другими словами, несмотря на свою сниженную антибактериальную активность, САМП-ЛТА **R9F2** обладает большим терапевтическим индексом, чем аналогичный аргинин-содержащий пептид **R5F5** из группы САМП-КТА, благодаря именно своей низкой гемолитической активности.

Таким образом, величины ТИ, представляемые в виде соотношения значений МГК к МПК в этих случаях, — это некий баланс, определяющий, в конечном счете, какой из этих двух факторов (антимикробная активность или токсичность) доминирует при оценке их реальной селективности или терапевтической значимости. Однако в целом сравнивать величины ТИ для САМП-ЛТА и САМП-КТА затруднительно из-за низкой, а порой и неопределенной в условиях эксперимента антибактериальной активности некоторых САМП-ЛТА, таких как **К9F2** и **H9F2**, среднегеометрические значения МПК₅₀ для которых составили >72.2 и >100 мкМ (табл. 2).

В случае фунгицидной активности особо следует отметить селективность гистидин-содержащего пептида **H9F2** из группы САМП-ЛТА по отношению к условно-патогенному грибу *C. albicans*. В данном случае высокая фунгицидная активность этого пептида одновременно сопровождается низкой токсичностью, что приводит к его достаточно высокой селективности (ТH = 571.4), более чем в 200 раз превышающей аналогичную селективность гистидин-содержащего пептида **H5F5** из группы САМП-КТА (ТH = 2.7). По сравнению с пептидом **H9F2**, для пептида **H5F5** сниженная фунгицидная активность одновременно сопровождается его высокой гемолитической активностью, что дополнительно вносит вклад в снижение значения его фунгицидной селективности.

Таким образом, САМП с "круговым" типом амфипатичности характеризуются одновременно повышенной антимикробной и гемолитической активностью. Увеличение гемолитической активности такого типа пептидов, вероятно, связано с увеличением их гидрофобности. Однако у САМП с "круговым" типом амфипатичности сохраняется высокая бактериальная селективность, связанная с их увеличенной антибактериальной активностью. У пептидов же с "линейным" типом амфипатичности также сохраняется высокая бактериальная селективность, связанная в данном случае с их низкой гемолитической активностью.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. В работе использовали реактивы для пептидого синтеза (Sigma, Fisher Scientific,

Васhem, Protein Technologies, США); полистирольный полимер 855013 Novabiochem® NovaSyn®TG Sieber resin, функционализированный 9-Fmoc-аминоксантен-3-илоксильным фрагментом, 200 ммоль/г (Merck Schuchardt OHG, Германия); защищенные аминокислотные мономеры (Protein Technologies, США); конденсирующий реагент НАТU – 2-(1*H*-7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуронийгексафторфосфат (кат. № 023926, Oakwood Products Inc., США).

Синтез пептидов. Пептиды были синтезированы твердофазным методом с использованием Fmoc-стратегии [26] аналогично опубликованной ранее схеме [25] на пептидном синтезаторе PS3 (Protein Technologies, США). Содержание основного вещества в синтезированных пептидах по данным офВЭЖХ составляло не менее 95%.

Штаммы микроорганизмов. Штаммы патогенных бактерий *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica* ATCC 14028 и условно-патогенного гриба *Candida albicans* ЭМТК 34 поддерживали и нарабатывали в Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Аналитическую офВЭЖХ проводили на хроматографе LC-20 AD (Shimadzu, Япония) с использованием детектора SPD-M20A (Shimadzu, Япония) на колонке Gemini 5 µm NX-C18, 110 Å, 4.6 × \times 250 мм (Phenomenex Inc., США), уравновешенной 0.1%-ным раствором TFA, в линейном градиенте концентрации ацетонитрила 0–50% или 0– 80% в течение 30 мин при скорости потока 1 мл/мин, УФ-детекция при длине волны 210, 220, 240 и 260 нм.

Молекулярные массы пептидов (табл. 1) определяли с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF (REFLEX III, Bruker Daltonics, Германия) и ESI-MS (LC/MS XCT Ultra, Agilent Technologies, США) в Центре масс-спектрометрического анализа Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Антимикробная активность пептидов. Растворы пептидов определенной концентрации для оценки антимикробной активности готовили из сухих навесок. Для пептидов R9F2, K9F2 и H9F2, а также пептидов **R5F5**, **K5F5** и **H5F5**, которые содержали по два или пять остатков фенилаланина соответственно, дополнительно проводили определение концентрации путем измерения поглощения в ближней УФ-области спектра с использованием значений молярных коэффициентов поглощения при длине волны 260 нм, равных 330 и 820 л моль⁻¹ см⁻¹, молярные коэффициенты которых ранее были определены. исходя из соответствующих растворов пептидов, приготовленных из сухих навесок. Исходные растворы пептидов с концентрацией 1–2 мМ хранили при –15°С в темноте не более месяца. Непосредственно перед экспериментом растворы разбавляли до нужной концентрации средой Мюллера—Хинтона. Исходная концентрация пептидов для приготовления проб для дальнейшего испытания их гемолитической активности составляла 10 мМ в воде.

Для работы использовали взвесь ночных бульонных культур, выращенных на стандартных питательных средах. Количество микроорганизмов (титр) во взвеси определяли по оптической плотности при длине волны 595 нм.

Для оценки антибактериального действия пептидов проводили совместное инкубирование клеточных культур с исследуемыми пептидными препаратами в 96-луночных планшетах для культивирования. Ночные бульонные культуры ресуспендировали в среде Мюллера-Хинтона (для C. albicans – в среде Сабуро), доводя количество микроорганизмов до посевной дозы $\sim 5 \times 10^5$ КОЕ/мл. В лунки последовательно вносили раствор исследуемых пептидных препаратов, а затем клеточную суспензию в соотношении 1:9 по объему (общий объем 200 мкл) в конечных концентрациях 0.3-100 мкМ. В качестве отрицательного контроля вместо тестируемого пептида вносили аналогичный объем среды Мюллера-Хинтона (для С. albicans – среды Сабуро). В качестве положительного контроля вместо тестируемого пептида вносили аналогичный объем водных растворов AgNO₃ или хлоргексидина (ХГ) в соответствующих разведениях, так же как и для пептидов, в конечных концентрациях 0.3-100 мкМ. Инкубацию проводили в течение 24 ч при 37°С и 560 об/мин на шейкер-инкубаторе (Kuhner LT-X, АБТЕК, Россия). В нулевой точке и через 2, 4, 5, 6, 7, 8 и 24 ч после начала инкубации измеряли оптическую плотность суспензии на планшетном спектрофотометре iMark[™] (Bio-Rad, США) при длине волны 595 нм. Результаты выражали в виде среднего значения оптической плотности клеточной суспензии в трех независимых экспериментах, выполненных в двух повторах. Среднестатистическая ошибка (или стандартное отклонение значений экспериментальных данных) при этом не превышала 15-30%. Стандартное отклонение (S) рассчитывали по формуле:

$$S = \sqrt{\frac{1}{n}} \sum_{i=1}^{n} (x_i - x_m)^2,$$

где n — число измерений, $x_i - i$ -тый элемент выборки, x_m — среднее арифметическое значение выборки.

Расчет МПК₅₀. Исходя из полученных средних значений оптической плотности суспензий клеточных культур, определяли величины относительной степени роста культуры микробных клеток (N_p/N_0) в виде отношения оптической плотности микробных частиц после добавления пептидного препарата (N_p) к оптической плотности в контрольной культуре (N_0). Концентрацию

пептида, при которой величина относительной степени роста культуры микробных клеток составляла 50%, определяли по кривым зависимости величины относительной степени роста культуры микробных клеток (N_p/N_0) в процентах от концентрации пептидов [25].

Фотометрический метод оценки гемолитической активности антимикробных пептидов в отношении эритроцитов человека. Гемолитическую активность исследуемых пептидов тестировали в отношении свежих эритроцитов человека согласно ранее опубликованным методикам [25, 27, 36]. Образец крови для получения эритроцитов был предоставлен ООО "Лаборатория Гемотест" (Новосибирск, Россия).

Метод основан на измерении оптической плотности при длине волны 540 нм в надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования суспензии эритроцитов, поскольку при разрушении эритроцитов вышедший из клеток гемоглобин придает среде характерную красную окраску, сохраняющуюся после осаждения эритроцитов. Свежие эритроциты человека трижды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS: 10 мМ Na₂HPO₄, 1.76 мМ K₂HPO₄, pH 7.4), содержащим 173 мМ NaCl и 2.7 мМ KCl. К 50 мкл суспензии эритроцитов в PBS добавляли растворы пептидов в виде двукратных серийных разведений до конечного объема 100 мкл и концентрации суспензии эритроцитов 4% (по объему, за 100%) принимали объем суспензии осажденных центрифугированием эритроцитов), инкубировали в течение 30 мин при 37°С. После центрифугирования и отделения осадка измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости при длине волны 540 нм. За 100% гемолиза принимали оптическую плотность раствора, полученную при действии на эритроциты 10%-ного раствора тритона Х-100. За 0% принимали оптическую плотность, полученную при действии на эритроциты "холостого" буферного раствора, не содержащего пептидных проб. Гемолитический анализ проводили дважды с использованием одного образца крови человека. Данные представлены как среднее значение ± стандартные отклонения трех независимых экспериментов. Средняя ошибка эксперимента при этом не превышала 15-20%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе синтезированы три новых антимикробных пептида XFXXFFXXFF (**X5F5**) (X – Arg, Lys или His), обладающих "круговым" типом амфипатичности (САМП-КТА), изучены антимикробные и гемолитические свойства синтезированных пептидов в зависимости от их катионного аминокислотного состава (аргинина, лизина или гистидина) в сравнении с тремя антимикробными пептидами XXXXXXXFF (**X9F2**) с "линейным" типом амфипатичности (САМП-ЛТА). Показано, что все исследуемые САМП-КТА обладают ярко выраженной антибактериальной активностью (в отношении *S. aureus, E. coli, S. enterica, P. aeruginosa*) и меньшей фунгицидной активностью (в отношении *C. albicans*). Напротив, антибактериальная активность САМП-ЛТА существенно ниже их фунгицидной активности. По отношению к бактериальным клеткам наибольшая антибактериальная активность выявлена у пептидов, содержащих в качестве катионных составляющих остатки аргинина (**R5F5, R9F2**), а наименьшая – у пептидов с остатками гистидина (**H5F5, H9F2**).

По отношению к грибковым культурам, напротив, наибольшей фунгицидной активностью обладают пептиды, содержащие в качестве катионных составляющих гистидиновые остатки (H5F5, H9F2).

В экспериментах с лизисом эритроцитов человека показано, что гемолитическая активность САМП-КТА превышает активность САМП-ЛТА. Наименьшей токсичностью к эритроцитам обладают лизин-содержащие пептиды (K5F5, K9F2), а наибольшей — гистидин-содержащие пептиды (H5F5, H9F2).

Несмотря на относительно высокую гемолитическую активность, средняя бактериальная селективность исследованных пептидов **X5F5** остается достаточно высокой (СГ ТИ \approx 10), за исключением пептида **H5F5**, содержащего остатки гистидина (СГ ТИ = 0.5). В то же время селективность гистидин-содержащего пептида **H5F5** по отношению к клеткам грибов (ТИ = 2.7) в 5 раз выше его селективности по отношению к бактериальным клеткам, но в 200 раз ниже фунгицидной селективности гистидин-содержащего пептида **H9F2** (ТИ = 571.4), обладающего "линейным" типом амфипатичности.

Таким образом, учитывая высокую антибактериальную активность САМП-КТА и несмотря на их повышенную гемолитическую активность, можно рекомендовать их аргининин и лизин-содержащие производные (R5F5, K5F5) в качестве перспективных антимикробных препаратов, поскольку в этом случае для получения одинакового терапевтически значимого эффекта требуется меньшая концентрация, а следовательно, и меньшее количество пептидного препарата по сравнению с аналогичными препаратами из группы САМП-ЛТА. Для создания противогрибковых препаратов наиболее перспективны пептиды из группы САМП-ЛТА, содержащие в качестве катионных групп аминокислотные остатки гистидина (**H9F2**).

БЛАГОДАРНОСТИ

Штаммы микроорганизмов получены из Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 48 № 5 2022

культур Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование поддержано в рамках государственного задания Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН № 121031300042-1.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Peschel A., Sahl H.G. // Nat. Rev. Microbiol. 2006. V. 4. P. 529–536. https://doi.org/10.1038/nrmicro1441
- Bahar A.A., Ren D. // Pharmaceuticals (Basel). 2013. V. 6. P. 1543–1575.
- https://doi.org/10.3390/ph6121543 3. *Chung P.Y., Khanum R.J.* // Microbiol. Immunol. In-
- fect. 2017. V. 50. P. 405–410. https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.12.005
- Kim H., Jang J.H., Kim S.C., Cho J.H. // J. Antimicrob. Chemother. 2014. V. 69. P. 121–132. https://doi.org/10.1093/jac/dkt322
- Баландин С.В., Овчинникова Т.В. // Биоорг. химия. 2016. Т. 42. С. 255–275. [Balandin S.V., Ovchinnikova T.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2016. V. 42. P. 229– 248.] https://doi.org/10.1134/S1068162016030055
- Mookherjee N., Hancock R.E. // Cell. Mol. Life Sci. 2007. V. 64. P. 922–933. https://doi.org/10.1007/s00018-007-6475-6
- Navon-Venezia S., Feder R., Gaidukov L., Carmeli Y., Mor A. // Antimicrob. Agents Chemother. 2002. V. 46. P. 689–694.
 - https://doi.org/10.1128/AAC.46.3.689-694.2002
- Liu X., Cao R., Wang S., Jia J., Fei H. // J. Med. Chem. 2016. V. 59. P. 5238–5247. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b02016
- Hollmann A., Martínez M., Noguera M.E., Augusto M.T., Disalvo A., Santos N.C., Semorile L., Maffía P.C. // Colloids Surf. B: Biointerfaces. 2016. V. 141. P. 528–536. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.02.003
- Clark S., Jowitt T.A., Harris L.K., Knight C.G., Dobson C.B. // Commun. Biol. 2021. V. 4. P. 605. https://doi.org/10.1038/s42003-021-02137-7
- 11. Азимова В.Т., Потатуркина-Нестерова Н.И., Нестеров А.С. // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 1. С. 1336. [Azimova V.T., Potaturkina-Nesterova N.I., Nesterov A.S. // Modern Prob-

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 48 № 5 2022

lems of Science and Education. 2015. № 1. P. 1336.] https://science-education.ru/en/article/view?id=17746

- Jiang Z., Vasil A.I., Hale J.D., Hancock R.E., Vasil M.L., Hodges R.S. // Biopolymers. 2008. V. 90. P. 369–383. https://doi.org/10.1002/bip.20911
- 13. *Huang Y.B., Huang J.F., Chen Y.X.* // Protein Cell. 2010. V. 1. P. 143–152.
- https://doi.org/10.1007/s13238-010-0004-3 14. Vlieghe P., Lisowski V., Martinez J., Khrestchatisky M. //
- Drug Discov. Today. 2010. V. 15. P. 40–56. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.10.009
- Смирнова М.П., Афонин В.Г., Шпень В.М., Тяготин Ю.В., Колодкин Н.И. // Биоорг. химия. 2004. Т. 30. С. 458–465. [Smirnova M.P., Afonin V.G., Shpen' V.M., Tyagotin Yu.V., Kolodkin N.I. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2004. V. 30. P. 409–416.] https://doi.org/10.1023/B:RUBI.0000043782.21640.c2
- Giangaspero A., Sandri L., Tossi A. // Eur. J. Biochem. 2001. V. 268. P. 5589–5600. https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2001.02494.x
- Tossi A., Sandri L., Giangaspero A. // Biopolymers. 2000. V. 55. P. 4–30. https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)55:1<4::AID-BIP30>3.0.CO:2-M
- Dinh T.T.T., Kim D.-H., Lee B.-J., Kim Y.-W. // Bull. Korean Chem. Soc. 2014. V. 35. P. 3632–3636. https://doi.org/10.5012/BKCS.2014.35.12.3632
- Tew G.N., Liu D., Chen B., Doerksen R.J., Kaplan J., Carroll P.J., Klein M.L., de Grado W.F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 5110–5114. https://doi.org/10.1073/pnas.082046199
- Javadpour M.M., Juban M.M., Lo W.C., Bishop S.M., Alberty J.B., Cowell S.M., Becker C.L., McLaughlin M.L. // J. Med. Chem. 1996. V. 39. P. 3107–3113. https://doi.org/10.1021/jm9509410
- Chen Y., Mant C.T., Farmer S.W., Hancock R.E., Vasil M.L., Hodges R.S. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 12316–12329. https://doi.org/10.1074/jbc.m413406200
- 22. *Schiffer M., Edmundson A.B.* // Biophys. J. 1967. V. 7. P. 121–135.
 - https://doi.org/10.1016/S0006-3495(67)86579-2
- Амирханов Н.В., Тикунова Н.В., Пышный Д.В. // Биоорг. химия. 2018. Т. 44. С. 492–505. [Amirkhanov N.V., Tikunova N.V., Pyshnyi D.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. P. 492–503.] https://doi.org/10.1134/S1068162018050035
- 24. Amirkhanov N.V., Tikunova N.V., Pyshnyi D.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 833–841. https://doi.org/10.1134/S1068162019060037
- 25. Амирханов Н.В., Бардашева А.В., Тикунова Н.В., Пышный Д.В. // Биоорг. химия. 2021. Т. 47. С. 315– 326. [Amirkhanov N.V., Bardasheva A.V., Tikunova N.V., Pyshnyi D.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2021. V. 47. P. 681–690.] https://doi.org/10.1134/S106816202103002X
- 26. *Chan W.C., White P.D.* // Fmoc Solid Phase Peptide Sythesis: a Practical Approach / Eds. Chan W.C., White P.D. Oxford: IRL Press, 2000. P. 64–66.
- Panteleev P.V., Bolosov I.A., Balandin S.V., Ovchinnikova T.V. // J. Pept. Sci. 2015. V. 21. P. 105–113. https://doi.org/10.1002/psc.2732

- 28. Jiang Z., Vasil A.I., Gera L., Vasil M.L., Hodges R.S. // Chem. Biol. Drug Des. 2011. V. 77. P. 225–240. https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2011.01086.x
- 29. Puri S., Edgerton M. // Eukaryot. Cell. 2014. V. 13. P. 958–964. https://doi.org/10.1128/ec.00095-14
- Khurshid Z., Najeeb S., Mali M., Moin S.F., Raza S.Q., Zohaib S., Sefat F., Zafar M.S. // Saudi Pharm. J. 2017. V. 25. P. 25–31. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.04.027
- Tsai H., Bobek L.A. // Biochim. Biophys. Acta. 1997.
 V. 1336. P. 367–369. https://doi.org/10.1016/s0304-4165(97)00076-7
- Wiradharma N., Sng M.Y., Khan M., Ong Z.Y., Yang Y.Y. // Macromol. Rapid Commun. 2013. V. 34. P. 74–80. https://doi.org/10.1002/marc.201200534

- Wieprecht T., Dathe M., Epand R.M., Beyermann M., Krause E., Maloy W.L., MacDonald D.L., Bienert M. // Biochemistry. 1997. V. 36. P. 12869–12880. https://doi.org/10.1021/bi971398n
- 34. Dathe M., Wieprecht T., Nikolenko H., Handel L., Maloy W.L., MacDonald D.L., Beyermann M., Bienert M. // FEBS Lett. 1997. V. 403. P. 208–212. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00055-0
- Окороченков С.А., Желтухина Г.А., Небольсин В.Е. // Биомед. химия. 2012. Т. 58. С. 131–143. [Okorochenkov S.A., Zheltukhina G.A., Nebol'sin V.E. // Biochem. Moscow Suppl. Ser. B. 2011. V. 5. P. 95–102.] https://doi.org/10.1134/S1990750811020120
- Jacobsen F., Mohammadi-Tabrisi A., Hirsch T., Mittler D., Mygind P.H., Sonksen C.P., Raventos D., Kristensen H.H., Gatermann S., Lehnhardt M., Daigeler A., Steinau H.U., Steinstraesser L. // J. Antimicrob. Chemother. 2007. V. 59. P. 493–498. https://doi.org/10.1093/jac/dkl513

Synthetic Antimicrobial Peptides. IV. The Effect of Cationic Groups of Lysine, Arginine and Histidine on the Antimicrobial Activity of Peptides with a "Circular" Type of Amphipathicity

N. V. Amirkhanov*, #, A. V. Bardasheva*, N. V. Tikunova*, and D. V. Pyshnyi*

[#]*Phone:* +7(383) 363-51-35; e-mail: nariman@niboch.nsc.ru

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of RAS, prosp. Akad. Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

The antimicrobial and hemolytic activity of synthetic antimicrobial peptides (SAMP) XFXXFFXXFF (X5F5) with a "circular" (helical or cyclic) type of amphipathicity (CTA) containing cationic amino acid residues of arginine, lysine, or histidine (X = Arg, Lys, or His) was studied. It was shown that, in general, such peptides, when compared with SAMP XXXXXXFF (X9F2), which have a "linear" type of amphipathicity (LTA), exhibit more than 8 times greater antibacterial and approximately 2 times less antifungal activity. It was found that peptides containing arginine residues as cationic components have the highest antibacterial activity, and peptides with histidine residues have the lowest antibacterial activity. In relation to fungal cultures of *Candida albicans*, on the contrary, peptides containing histidine residues as cationic components have the highest fungicidal activity. It was shown that the studied X5F5 peptides, regardless of their cationic composition, have increased hemolytic activity (20-60% hemolysis at 500 μ M peptide concentration in the medium) compared to peptides X9F2 with a "linear" type of amphipathicity (no more than 4% hemolysis at the same peptide concentrations). Despite their relatively high hemolytic activity, the average bacterial selectivity of the studied X5F5 peptides remains quite high, the average geometric therapeutic index (AG TI) for which is about 10, except for the H5F5 peptide containing histidine residues (AG TI = 0.5). At the same time, the selectivity of the histidine-containing peptide H5F5 with respect to fungal cells (TI = 2.7) is 5 times higher than its selectivity with respect to bacterial cells, but 200 times lower than the fungicidal selectivity of the histidine-containing peptide H9F2 (TI = 571.4), which has a linear amphipathic type. Taking into account the increased antibacterial activity of drugs based on SAMP X5F5 with a "circular" type of amphipathicity, it is recommended to use peptides containing arginine (R5F5) and lysine amino acid residues (K5F5) as cationic groups to create antibacterial drugs, and to create antifungal agents based on SAMP X9F2 with a "linear" type of amphipathicity, containing histidine amino acid residues as cationic groups (H9F2).

Keywords: synthetic antimicrobial peptides, amphiphilicity, "linear" amphipathicity type, "circular" amphipathicity type, hemolytic activity, selectivity, antimicrobial activity, fungicidal activity, Candida albicans, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella enterica, Pseudomonas aeruginosa

УДК 57.088.6

МЕТОДИКА РАДИОЛИГАНДНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ β₁- И β₂-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ В КЛЕТКАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

© 2022 г. А. Я. Шевелев^{*}, Н. М. Каширина^{**}, Л. Н. Липатова^{**}, Е. В. Янушевская^{**}, М. М. Пекло^{**}, И. Н. Рыбалкин^{*, **}, П. Н. Руткевич^{*, **}, О. К. Чусовитина^{**}, Н. А. Скоблова^{***}, Ю. С. Скоблов^{***, #}, Т. Н. Власик^{*, **}, К. А. Зыков^{**, ****}

*ЗАО "Фрамон", Россия, 121552 Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а

**Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России,

Россия, 121552 Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а

***ФГБУН "Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова" РАН,

Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

****ФГБОУ ВО "Московский государственный медико-стоматологический университет

им. А.И. Евдокимова" Минздрава России, Россия, 127473 Москва, ул. Делегатская, 20/1

Поступила в редакцию 11.12.2021 г. После доработки 22.12.2021 г. Принята к публикации 24.12.2021 г.

Разработана методика одновременного раздельного определения β_1 - и β_2 -адренорецепторов на основе радиолигандного анализа с использованием ¹²⁵І-иодоцианопиндолола, включающая проведение трех измерений: 1) без лигандов-конкурентов; 2) в присутствии селективного лиганда ICI 118,551 (0.25 мкМ); 3) в присутствии двух селективных лигандов – ICI 118,551 и CGP 20712 (по 0.25 мкМ каждого). Методика протестирована на модельной системе из двух трансгенных линий клеток ADL-7A и A2R9 с экспрессией рекомбинантных β_1 - и β_2 -адренорецепторов. При соотношении количества β_1 -адренорецепторов к β_2 -адренорецепторам 1 : 10 погрешность измерения составляет ~15%. Анализ девяти клеточных линий, представляющих различные типы клеток крови, показал наличие β2-адренорецепторов в клетках Daudi, Raji, Dami, K-562, HL-60, U-937 и THP-1 и их отсутствие в Т-лимфоцитарных клетках Jurkat и MOLT-4. В1-Адренорецепторы достоверно зарегистрированы лишь в клетках ТНР-1 моноцитарного происхождения. В остальных клетках, за исключением линии Dami, их количество оказалось ниже порога детекции, оцениваемого на уровне 200 молекул на клетку. Измерения, выполненные на мононуклеарных клетках периферической крови семи здоровых доноров, продемонстрировали присутствие β₂-адренорецепторов в диапазоне 1000-2500 молекул на клетку, тогда как содержание β_1 -адренорецепторов во всех случаях находилось на грани или за гранью порога детекции.

Ключевые слова: β_1 - и β_2 -адренорецепторы, радиолигандный анализ, клетки человека **DOI:** 10.31857/S0132342322050219

введение

В патогенезе сердечно-сосудистых и бронхообструктивных заболеваний — двух самых распространенных неинфекционных патологий важную роль играют адренергические механизмы. Людям, страдающим этими заболеваниями, часто необходимо назначение препаратов, воздействующих на β₁- и β₂-адренорецепторы. Основные мишени β-агонистов и β-блокаторов ткани сердца и легких, труднодоступные для лабораторных анализов. Однако в ряде исследований продемонстрирована высокая степень корреляции (~0.9) между содержанием β -адренорецепторов в лимфоцитах крови и их содержанием в ткани предсердий [1, 2]. Таким образом, открывается возможность оценивать процессы, происходящие в этих тканях под воздействием применяемых в ходе лечения препаратов, наблюдая за динамикой поведения β -адренорецепторов в клетках периферической крови.

На поверхности лейкоцитов крови в основном представлены β_2 -адренорецепторы [3, 4]. Систематических сравнительных измерений содержания β_2 -адренорецепторов в клетках крови у паци-

Сокращения: FBS – фетальная бычья сыворотка; PBMC – мононуклеарные клетки периферической крови.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (905) 538-25-14; эл. почта: sur@ibch.ru).

ентов с сердечно-сосудистыми и бронхообструктивными заболеваниями ранее не проводилось, поэтому экспериментальные данные о динамике поведения β_2 -адренорецепторов при использовании препаратов, воздействующих на адренорецепторную систему, носят фрагментарный, случайный характер.

Анализ содержания β_1 -адренорецепторов весьма затруднен из-за крайне низкой их представленности в клетках крови. У большинства людей содержание β_1 -адренорецепторов в лейкоцитах в ~20 раз ниже содержания β_2 -адренорецепторов [5]. Есть косвенные свидетельства, указывающие на присутствие β_1 -адренорецепторов в моноцитах [6]. Не исключено также, что количество β_1 -адренорецепторов на Т-лимфоцитах может резко возрастать при некоторых сердечно-сосудистых патологиях или под влиянием какихлибо других факторов [5].

Содержание β_1 - и β_2 -адренорецепторов обычно измеряют при помощи ¹²⁵I-меченного лиганда иодоцианопиндолола, способного одинаково эффективно связываться с обоими типами рецепторов. Присутствие преобладающих количеств β_2 -адренорецепторов на лейкоцитах крови — дополнительный фактор, препятствующий определению минорной фракции β_1 -адренорецепторов.

Настоящая статья — продолжение работ по модификации радиолигандного анализа для определения β-адренорецепторов в крови индивидуальных людей [5, 7].

Цель данного исследования — разработка методики радиолигандного анализа, позволяющей проводить одновременное раздельное определение содержания β_1 - и β_2 -адренорецепторов на поверхности клеток крови человека.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетические параметры реакции связывания. Корректная постановка экспериментов по радиолигандному анализу подразумевает такой выбор условий и параметров, при котором реакция связывания лиганда с рецептором доходит до состояния, близкого к равновесному [8]. На рис. 1 представлена кинетика прямой реакции связывания ¹²⁵I-иодоцианопиндолола с трансгенными клетками ADL-7A и A2R9, экспрессирующими, соответственно, рекомбинантные β_1 - или β_2 -адренорецепторы, при температуре 37°C и концентрации лиганда 114 пМ (400000 имп. мин⁻¹ мл⁻¹). Как можно видеть, 30-минутной инкубации вполне достаточно для того, чтобы обе кривые связывания вышли на плато.

Кинетика обратной реакции, определенная при температурах 25 и 37°С (рис. 2), демонстрирует тот факт, что за время, необходимое для проведения отмывок (~30 мин), потеря связанной радиоактивности за счет диссоциации лиганда хотя и имеет место, но ее доля невелика — не более 15% за время манипуляций.

Константы связывания и число рецепторов на клетку. Константы связывания ¹²⁵I-иодоцианопиндолола с β_1 - и β_2 -адренорецепторами (K_d) и число рецепторов, приходящееся на одну клетку ADL-7A или A2R9 (величину B_{max}), определяли по графикам Скетчарда (рис. 3). Результаты представлены в табл. 1.

Ингибирование селективными лигандами. Агаповой с соавт. [7] ранее была продемонстрирована возможность определения β_2 -адренорецепторов в Т-лимфоцитах по разнице сигналов связывания ¹²⁵I-иодоцианопиндолола в присутствии и в отсутствие высокоселективного лиганда-конкурента ICI 118,551. Однако попытки непосред-



Рис. 1. Кинетика прямой реакции связывания ¹²⁵I-иодоцианопиндолола с клетками ADL-7A (*a*) и A2R9 (*б*) при 37°C и концентрации лиганда 114 пМ.



Рис. 2. Кинетика обратной реакции диссоциации ¹²⁵I-иодоцианопиндолола при 25°С (а) и 37°С (б).



Рис. 3. Графики Скетчарда для связывания ¹²⁵I-иодоцианопиндолола с клетками ADL-7A (*a*) и A2R9 (*б*).

ственно применить аналогичный подход для определения β₁-адренорецепторов, используя лиганд-конкурент CGP 20712 вместо ICI 118,551, потерпели неудачу. Причина заключается в том, что селективность CGP 20712 не абсолютна: при концентрациях лиганда, в достаточной степени ингибирующих связывание ¹²⁵І-иодоцианопиндолола с β₁-адренорецепторами, имеет место хотя и небольшое, но заметное ингибирование связывания¹²⁵I-иодоцианопиндолола и с β₂-адренорецепторами. А поскольку содержание В₂-адренорецепторов в клетках крови в норме на порядок превосходит содержание β_1 -адренорецепторов, возникающая интерференция препятствует вычленению и идентификации той части разницы в сигналах, которая обусловлена присутствием именно β₁-адренорецепторов.

С целью свести к минимуму помехи, обусловленные присутствием преобладающих количеств β₂-адренорецепторов, мы предложили схему анализа, включающую три измерения связывания ¹²⁵I-иодоцианопиндолола с клетками: 1) в отсутствие лигандов-конкурентов; 2) в присутствии лиганда ICI 118,551 в такой концентрации, кото-

Таблица 1. Константы диссоциации и содержание β_1 - и β_2 -адренорецепторов в модельных трансгенных клетках

Модельные клетки	Тип адрено- рецептора	<i>К</i> _d , пМ	Количество молекул рецепторов на клетку (B _{max})
ADL-7A	β_1	40	4.3×10^{6}
A2R9	β_2	16	3.7×10^{6}

рая подавляла бы связывание с β_2 -адренорецепторами почти до нуля; 3) в присутствии обоих лигандов ICI 118,551 и CGP 20712. В условиях, когда связывание с β_2 -адренорецепторами практически блокировано, даже небольшая разница между вторым и третьим измерениями должна отражать содержание β_1 -адренорецепторов в системе. Разумеется, при расчетах необходимо учесть, что высокие концентрации ICI 118,551 до определенной степени ингибируют связывание ¹²⁵I-иодоцианопиндолола с β_1 -адренорецепторами.

В рамках простой линейной модели связывание ¹²⁵І-иодоцианопиндолола с клетками, несущими оба типа адренорецепторов, можно представить в виде суммы трех независимых компонентов: В₀ – фонового связывания, не подверженного влиянию селективных лигандов; B₁ – специфического связывания с β_1 -адренорецепторами; B_2 – специфического связывания с В₂-адренорецепторами. Фоновое связывание включает в себя как полностью неспецифическое налипание меченого цианопиндолола на поверхность клетки, не вытесняемое высокими концентрациями немеченого лиганда, так и специфическое связывание с другими клеточными рецепторами, в частности с серотониновыми рецепторами [9]. присутствии В ICI 118,551 (второе измерение) связывание с β₁-адренорецепторами будет ослаблено до уровня k₁B₁, а с β₂-адренорецепторами – до уровня k₂B₂, где коэффициенты k₁ и k₂ характеризуют уровни остаточного связывания ¹²⁵І-иодоцианопиндолола, соответственно, с β_1 - и β_2 -адренорецепторами. В присутствии обоих селективных лигандов специфическое связывание меченого иодоцианопиндолола будет описываться аналогичными величинами k₃B₁ и k₄B₂. В соответствии с формулой Ченга-Прусоффа [10] коэффициенты k₁-k₄ зависят как от концентраций лигандов-конкурентов,

так и от концентрации способного к связыванию ¹²⁵I-иодоцианопиндолола в пробе, поэтому при проведении измерений эти концентрации должны быть фиксированы.

Для результатов трех вышеуказанных измерений можно записать систему трех линейных уравнений и, зная коэффициенты k_1-k_4 , разрешить ее относительно неизвестных B_0 , B_1 и B_2 . При условии малости доли связавшегося ¹²⁵І-иодоцианопиндолола по отношению к его полному количеству в системе количества адренорецепторов каждого типа далее рассчитываются по приближенным формулам:

$$R_1 = B_1(1 + K_1/L); R_2 = B_2(1 + K_2/L),$$

где R₁ и R₂ – искомые количества β_1 - и β_2 -адренорецепторов, K₁ и K₂ – соответствующие константы связывания, L – концентрация фракции "bindable" ¹²⁵I-иодоцианопиндолола в пробе: 400000 (имп. мин⁻¹ мл⁻¹) или 114 пМ в стандартных условиях анализа.

Рабочие концентрации селективных лигандов ICI 118,551 и CGP 20712 — по 0.25 мкМ каждого — были выбраны на основании анализа кривых ингибирования (рис. 4). Соответствующие коэффициенты $k_1 - k_4$ приведены в табл. 2.

Модельное смешивание клеток. Тестирование описанной выше схемы анализа проводили с использованием клеток ADL-7A и A2R9, которые смешивали друг с другом в различных пропорциях. При этом соотношение модельных клеток выбирали так, чтобы имитировать ситуацию, характерную для клеток крови: содержание β_1 -адренорецепторов существенно ниже содержания β_2 -адренорецепторов. Приготовленные смеси подвергали анализу по предложенной методике и на основании полученных данных вычисляли, сколько клеток ADL-7A и A2R9 было в каждой смеси. Работоспособность методики оценивали



Рис. 4. Кривые ингибирования лигандами-конкурентами связывания ¹²⁵I-иодоцианопиндолола с β_1 - (*a*, *б*) и β_2 -адренорецепторами (*в*).

Лиганды-ингибиторы	β ₁ -Адренорецептор клетки ADL-7A	β ₂ -Адренорецептор клетки A2R9
0.25 мкМ ІСІ 118,551	$k_1 = 0.76$	k ₂ = 0.032
0.25 мкМ ІСІ 118,551 + 0.25 мкМ СGР 20712	$k_3 = 0.11$	$k_4 = 0.032$

Таблица 2. Коэффициенты остаточного связывания ¹²⁵І-иодоцианопиндолола в присутствии селективных лигандов-ингибиторов

по тому, насколько близки оказывались полученные значения к истинным количествам клеток обоих типов, использованным при составлении смесей.

Результаты трех типичных экспериментов представлены на рис. 5. Эти и другие подобные эксперименты показали, что если соотношение β_1 - и β_2 -адренорецепторов составляет ~1 : 10, по-грешность анализа находится в пределах 15%. Если же доля β_1 -адренорецепторов снижается до 1 : 40, то ошибка в их определении может достигать 40%, что превращает результат анализа в качественную оценку.

Связывание лиганда на суспензионных клеточных культурах и мононуклеарных клетках крови здоровых доноров. Разработанная методика была применена для оценки содержания β_1 - и β_2 -адренорецепторов в клетках ряда линий, ведущих свое начало от различных типов клеток крови человека. Результаты анализа представлены в табл. 3. Как можно видеть, β_2 -адренорецепторы практически не представлены в клетках, происходящих от Т- и В-лимфоцитов (Jurkat, MOLT-4, Daudi и Raji), и относительно высоко представлены в клетках моноцитарного происхождения THP-1 и U-937. Что касается β_1 -адренорецепторов, то их присутствие достоверно выявлено в клетках THP-1 и под сомнением — в клетках Dami. Для большинства остальных исследованных клеточных линий содержание β_1 -адренорецепторов ока-



Рис. 5. Модельное смешивание разных количеств клеток, экспрессирующих β₁-адренорецептор (ADL-7A) и β₂-адренорецептор (A2R9), в разных пропорциях. Три группы столбцов – это результаты трех независимых экспериментов.

Vacant	Проноуоулогио	Количество молекул рецепторов на клетку			
Клетки	происхождение	β_1 -адренорецепторы	β ₂ -адренорецепторы		
Jurkat	Т-лимфоциты	<50	<30		
MOLT-4	Т-лимфобласты	<150	<120		
Daudi	В-лимфоциты	<30	130 ± 20		
Raji	В-лимфоциты	<100	230 ± 60		
Dami	Мегакариоциты	480 ± 230	250 ± 120		
K-562	Гранулоциты	<300	480 ± 200		
HL-60	Промиелоциты	<500	4000 ± 300		
U-937	Макрофаги	<800	6900 ± 900		
THP-1	Моноциты	23000 ± 3000	6200 ± 1800		

Таблица 3. Содержание β_1 - и β_2 -адренорецепторов в клеточных линиях

залось ниже порога детекции, который в среднем можно оценить на уровне 250 молекул на клетку.

Полученные нами данные на культурах суспензионных клеток имеет смысл сопоставить с результатами аналогичных исследований других групп авторов. Sager et al. [11] измерили содержание β_2 -адренорецепторов в клетках HL-60. Их данные (~2000 молекул на клетку) по порядку величины сравнимы с полученным в настоящей работе значением 4000. В работе Mäki et al. [12] проведен радиолигандный анализ содержания β-адренорецепторов (без дифференциации по типам) в мембранных фракциях клеток ряда линий, в том числе HL-60, U-937, К-562 и Raji. Как и следовало ожидать, β-адренорецепторы обнаружены в клетках HL-60 и U-937, причем в сравнимых количествах. Однако в клетках K-562 и Raji присутствие В-адренорецепторов авторами не зарегистрировано, что расходится с результатами нашего исследования. По-видимому, порог детекции в работе Mäki et al. проходил выше и не позволил выявить в 5–10 раз меньшие количества β_2 -адренорецепторов, которые, по нашим данным, содержатся в этих клетках. Наибольшее число β₁- и β₂-адренорецепторов выявлено нами в клетках моноцитарной линии THP-1. В работах Grisanti et al. [6] и Talmadge et al. [13] методами иммуноблоттинга и радиолигандного анализа также показано, что клетки ТНР-1 производят значительные количества β₁- и β₂-адренорецепторов. Таким образом, тестирование разработанной нами методики на клеточных линиях дало результаты, близкие к результатам работ других авторов.

Выполненный аналогичным образом анализ содержания β_1 - и β_2 -адренорецепторов в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) семи здоровых доноров показал (табл. 4), что количество β_2 -адренорецепторов в этих клетках варьирует в диапазоне 1000—2500 молекул на клетку. Присутствие β_1 -адренорецепторов в клетках PBMC ни

у одного из доноров достоверно зарегистрировать не удалось.

Обсуждение полученных результатов. В настоящее время известны три типа В-адренорецепторов: β_1 , β_2 и β_3 . В лейкоцитах человека β_3 -адренорецептор не обнаружен, β₂-адренорецептор встречается практически во всех типах белых клеток крови. Изучению представленности β-адренорецепторов в клетках крови больных и здоровых людей посвящены многочисленные исследования [4, 5, 8, 14–17]. Сопоставлять результаты этих исследований довольно сложно, т.к. анализы проводились по разным методикам и часто не верифицировались количественно другими методами. Несмотря на отсутствие строгой метрологической верификации, в некоторых случаях удавалось выявить очень интересные и клинически значимые изменения представленности β₂-адренорецепторов, связанные с респираторными патологиями [17]. В данной работе количество рецепторов определяли по количеству связавшейся с клетками радиоактивности в имп./мин на 1 млн

Таблица 4. Содержание β_1 - и β_2 -адренорецепторов в мононуклеарных клетках периферической крови здоровых доноров

Лоцор	Количество молекул рецепторов на клетку				
донор	β_1 -адренорецепторы	β ₂ -адренорецепторы			
1	<200	2370 ± 120			
2	(60 ± 60)	1320 ± 60			
3	<70	1260 ± 60			
4	(140 ± 160)	1890 ± 150			
5	<250	1890 ± 170			
6	(240 ± 440)	1130 ± 240			
7	(220 ± 460)	2030 ± 270			

Примечание: в скобках указаны данные для случаев, когда погрешность измерения превышает полученное значение.

клеток. Очевидно, прямой пересчет количества радиоактивного лиганда, связанного с клетками, в количество рецепторов, экспонированных на поверхности этих клеток, без учета K_d приводит к некоторому занижению результатов измерений. Поэтому данные работы Агаповой с соавт. [17] следует рассматривать скорее как оценочные.

Тем не менее, анализируя результаты различных исследований, можно заключить, что содержание β_2 -адренорецепторов в мононуклеарных клетках периферической крови варьирует в диапазоне 400—2500 молекул на клетку, что вполне согласуется и с нашими данными.

В большинстве органов и тканей человека β₁и β₂-адренорецепторы присутствуют совместно, поэтому актуальна задача их раздельного определения. В работе Бундкирхена с соавт. [18] представлено одно из возможных решений этой задачи при помощи математического анализа кривых связывания ¹²⁵І-иодоцианопиндолола в зависимости от концентраций лигандов-ингибиторов ICI 118.551 и CGP 20712. Построение таких кривых требует большого объема экспериментального материала, поскольку подразумевает проведение не менее 40 измерений. Предложенная нами более простая схема анализа из трех измерений имеет то преимущество, что для ее выполнения достаточно ~6 млн клеток, которые можно получить из 10-20 мл крови.

Как правило, одновременно с содержанием рецепторов проводят оценку соответствующих K_d иодоцианопиндолола. В ряде работ K_d измеряли на модельных клетках, экспрессирующих тот или иной тип адренорецепторов [19, 20]. K_d для обоих типов рецепторов, по-видимому, близки между собой и заключены в пределах между 17 и 53 пМ. Похожие значения, 40 пМ для β_1 -адренорецептора и 16 пМ для β_2 -адренорецептора, получены и в нашей работе.

Вопрос о том, сколько β_1 -адренорецепторов в норме содержится в различных типах клеток крови, на сегодняшний день остается открытым. Сообщение Смоляковой с соавт. [5] о высоком уровне β_1 -адренорецепторов в клетках крови некоторых пациентов с кардиологическими патологиями, возможно, связано с какими-то особыми обстоятельствами и нуждается в дополнительном экспериментальном подтверждении. Нам удалось лишь показать, что количество β_1 -адренорецепторов в суммарной фракции мононуклеарных клеток у семи здоровых людей не превышает 250 молекул на клетку и не может быть достоверно измерено при помощи предложенной методики.

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 48 № 5 2022

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Линии клеток и условия культивирования. Линия клеток ADL-7А была получена нами ранее [21] путем трансфекции клеток эмбриональной почки человека НЕК293 (из коллекции Института экспериментальной кардиологии НМИЦ) плазмидой pMC4IPW-ADRBopt, кодирующей оптимизированный ген β_1 -адренорецептора человека под контролем промотора ранних генов цитомегаловируса. Линию клеток A2R9 получали трансфекцией исходных клеток НЕК293 плазмидой pC4IPW-hADRB2-EGFP, кодирующей ген β_2 -адренорецептора, соединенного на *C*-конце с зеленым флуоресцентным белком, который служил маркером для идентификации трансфицированных клонов. Клетки указанных линий культивировали в среде DMEM, содержащей 10%-ную фетальную бычью сыворотку (FBS), 2 мМ L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина и 0.1 мг/мл стрептомицина (все реактивы Invitrogen, США), в атмосфере 5% СО₂ при 37°С.

Для проведения реакции связывания с 125 I-иодоцианопиндололом клетки снимали с поверхности флаконов обработкой трипсином, реакцию протеолиза останавливали добавлением культуральной среды с 10% FBS, клетки осаждали центрифугированием 15 мин при 1100 об/мин (200 g), дважды промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) при комнатной температуре и суспендировали в PBS до конечной концентрации 10^1 – 10^6 кл./мл (HEK293) или 10^6 кл./мл (ADL-7A, A2R9).

Суспензионные клетки человека линий Raji, Daudi, Jurkat, K-562, U-937, MOLT-4, Dami, HL-60 и THP-1 из коллекции Института экспериментальной кардиологии НМИЦ культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10% FBS, 2 мМ L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина и 0.1 мг/мл стрептомицина. Для проведения радиолигандного анализа клетки осаждали центрифугированием и дважды промывали PBS, как описано выше.

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC). Забор крови у добровольцев проводили в лаборатории Института экспериментальной кардиологии НМИЦ. Венозную кровь семи здоровых добровольцев собирали в вакуумные пробирки BD Vacutainer CPT (Becton, Dickinson and Company, США) и обрабатывали согласно инструкции производителя. Мононуклеарные клетки переносили в другие пробирки и дважды промывали PBS.

Лиганды. В работе использовали следующие лиганды: цианопиндолол хемифумарат (Віо-Techne Corporation, США), ICI 118,551 (Sigma-Aldrich, США) и CGP 20712 (Bio-Techne Corporation, США).

¹²⁵І-иодоцианопиндолол. Радиоактивный изотоп иода в составе молекулы Na¹²⁵I (2000 Ки/ммоль) получали от АО "Радиевый институт им. В.Г. Хлопина" (Санкт-Петербург, Россия). Внедрение атома ¹²⁵ I в молекулу цианопиндолола при помощи хлорамина Т проводили методом Greenwood et al. [22] с некоторыми модификациями. В реакцию мечения брали 1 мкг цианопиндолола хемифумарата и 1 мКи Na¹²⁵I в 50 мкл 0.2 М калийфосфатного буфера, рН 7.0. Реакцию инициировали добавлением 10 мкл раствора хлорамина Т (5 мг/мл), инкубировали при комнатной температуре в течение 30 с, останавливали реакцию добавлением 10 мкл тиосульфата натрия (20 мг/мл). Смесь выдерживали 5 мин при комнатной температуре, после чего добавляли 1 мкл раствора "холодного" иодида натрия (6 мг/мл).

Целевой продукт очищали при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке Диасорб 130 (5 мкм, 4 × 150 мм; Елсико, Россия) в ион-парном режиме с элюцией в градиенте концентрации ацетонитрила 0–90% в 10%-ной уксусной кислоте. Фракции, содержащие ¹²⁵I-иодоцианопиндолол, объединяли, упаривали досуха, растворяли в 70%-ном этиловом спирте и хранили при –20°С. Долю радиоактивности во фракции, способной к связыванию с адренорецепторами (фракция "bindable"), оценивали в предварительных экспериментах с избыточным количеством клеток ADL-7A или A2R9.

Реакция связывания с 125 I-иодоцианопиндололом. Модельные клетки смешивали с таким расчетом, чтобы в 100 мкл суспензии находилось 2 × × 10⁵ клеток НЕК293, выполняющих роль носителя, и дозированное число клеток ADL-7A и/или A2R9, как правило, 100–5000 клеток. В случае суспензионных клеточных линий использовали от 2 × 10⁵ до 2 × 10⁶ клеток в 100 мкл, клетки РВМС брали в количестве от 5 × 10⁵ до 10⁶ в 100 мкл суспензии. Для снижения неспецифического связывания в суспензию добавляли казеиновый концентрат СВС2 (Stereospecific Detection Technologies, Германия) в разведении 1 : 10.

В пробирки типа эппендорф последовательно вносили 100 мкл клеточной смеси, 20 мкл PBS, или 20 мкл 2.5 мкМ раствора селективного лиганда ICI 118,551, или 20 мкл смеси 2.5 мкМ ICI 118,551 и 2.5 мкМ CGP 20712, затем добавляли 80 мкл раствора ¹²⁵I-иодоцианопиндолола в PBS с 10% CBC2. В стандартных экспериментах количество радиоактивности во фракции "bindable" составляло 80000 имп./мин на пробу. Пробирки с реакционной смесью инкубировали в течение 30 мин при 37°C с перемешиванием на шейкере.

По окончании инкубации пробирки с пробами центрифугировали 10 мин при 2000 *g*. Супернатант удаляли, осадок суспендировали в 200 мкл

PBS, центрифугировали 10 мин при 2000 *g*, после чего осадок вторично суспендировали в 200 мкл PBS, центрифугировали 5 мин при 10000 *g* и удаляли супернатант. Количество связавшейся с клетками радиоактивности определяли при помощи гамма-счетчика 2470 Wizard² (Perkin-Elmer, США) с эффективностью счета 79%. Все измерения проводили в трех или четырех параллелях. Отклонение от средней величины не превышало 20%.

В кинетических экспериментах по истечении времени инкубации для полной остановки реакции связывания в пробы добавляли немеченый цианопиндолол до 10 мкМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании разработана и верифицирована методика одновременного раздельного определения β_1 - и β_2 -адренорецепторов на основе радиолигандного анализа с использованием ¹²⁵І-иодоцианопиндолола, определен порог детекции β₁-адренорецепторов, обсуждаются методологические вопросы сопоставления результатов анализа. Верификация методики проведена с помошью модельного смешивания трансгенных линий клеток ADL-7A и A2R9 друг с другом в различных пропорциях и последующего раздельного определения количества β₁- и β₂-адренорецепторов в получаемых смесях. При соотношении количества β_1 -адренорецепторов к β_2 -адренорецепторам 1:10 погрешность измерения не превышает 15%, однако с уменьшением доли β_1 -адренорецепторов до 1:40 ошибка измерения резко возрастает и может достигать 40%.

По разработанной методике проанализировано содержание β_1 - и β_2 -адренорецепторов в девяти клеточных линиях (различных типах клеток крови), а также в мононуклеарных клетках периферической крови семи здоровых доноров.

Измерение количества β_1 - и β_2 -адренорецепторов в мононуклеарных клетках крови здоровых доноров, описанное в настоящей статье, выступает скорее демонстрацией возможности применения разработанной нами методики и не может претендовать на серьезные медико-биологические заключения вследствие явно недостаточного количества исследованных образцов крови.

Важным достижением предложенного метода можно считать возможность использования этого анализа для индивидуального человека (пациента), что делает метод весьма привлекательным для прикладных медицинских целей. Однако, учитывая высокую динамику рецепторного аппарата человека под действием различных факторов (патологии, стресс, лекарственные препараты и проч.), к получаемым данным надо относиться осторожно. Видимо, более информативными и более корректными с медицинской точки зрения будут такие исследования по динамике изменений адренорецепторной активности, как ответ на действие лекарственных препаратов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках НИР Национального медицинского исследовательского центра кардиологии Минздрава России по государственному заданию № 056-00153-19-01 от 17.01.2019 г.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из участвующих в исследовании доноров-добровольцев было получено информированное добровольное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Michel M.C., Beckeringh J.J., Ikezono K., Kretsch R., Brodde O.E. // J. Hypertens Suppl. 1986. V. 4. P. S215– S218.
- Brodde O.E., Kretsch R., Ikezono K., Zerkowski H.R., Reidemeister J.C. // Science. 1986. V. 231. P. 1584– 1585.

https://doi.org/10.1126/science.3006250

- Zoukos Y., Leonard J.P., Thomaides T., Thompson A.J., Cuzner M.L. // Ann. Neurol. 1992. V. 31. P. 657–662. https://doi.org/10.1002/ana.410310614
- Zoukos Y., Thomaides T.N., Kidd D., Cuzner M.L., Thompson A. // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 2003. V. 74. P. 197–202. https://doi.org/10.1126/jnpp.74.2.107

https://doi.org/10.1136/jnnp.74.2.197

 Смолякова Е.В., Скоблов Ю.С., Скоблова Н.А., Агапова О.Ю., Амбатьелло Л.Г., Климова А.А., Кузнецова Т.В., Масенко В.П., Нистор С.Ю., Рвачева А.В., Чазова И.Е., Зыков К.А. // Биоорг. химия. 2019. Т. 45. С. 295–301. [Smolyakova E.V., Skoblov Yu.S., Skoblova N.A., Agapova O.Y., Ambatiello L.G., Klimova A.A., Kuznetsova T.V., Masenko V.P., Nistor S.Y., Rvacheva A.V., Chazova I.E., Zykov K.A. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 129–134.] https://doi.org/10.1134/S1068162019020134

https://doi.org/10.1134/S1068162019020134

 Grisanti L.A., Evanson J., Marchus E., Jorissen H., Woster A.P., DeKrey W., Sauter E.R., Combs C.K., Porter J.E. // Mol. Immunol. 2010. V. 47. P. 1244– 1254.

https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.12.013

7. Агапова О.Ю., Скоблов Ю.С., Зыков К.А., Рвачева А.В., Бейлина В.Б., Масенко В.П., Чазова И.Е. // Биоорг.

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 48 № 5 2022

химия. 2015. Т. 41. С. 592–598. [Agapova O.Y., Skoblov Yu.S., Zykov K.A., Rvacheva A.V., Beilina V.B., Masenko V.P., Chazova I.E. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2015. V. 41. P. 529–535.] https://doi.org/10.1134/s1068162015050027

- Hulme E.C., Trevethick M.A. // Br. J. Pharmacol. 2010.
 V. 161. P. 1219–1237. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00604.x
- Adham N., Tamm J.A., Salon J.A., Vaysse P.J., Weinshank R.L., Branchek T.A. // Neuropharmacology. 1994. V. 33. P. 387–391. https://doi.org/10.1016/0028-3908(94)90068-x
- Cheng Y., Prusoff W.H. // Biochem. Pharmacol. 1973. V. 22. P. 3099–3108. https://doi.org/10.1016/0006-2952(73)90196-2
- Sager G., Bang B.E., Pedersen M., Aarbakke J. // J. Leukoc. Biol. 1988. V. 44. P. 41–45. https://doi.org/10.1002/jlb.44.1.41
- Mäki T., Andersson L.C., Kontula K.K. // Eur. J. Haematol. 1992. V. 49. P. 263–268. https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1992.tb00059.x
- Talmadge J., Scott R., Castelli P., Newman-Tarr T., Lee J. // Int. J. Immunopharmacol. 1993. V. 15. P. 219–228. https://doi.org/10.1016/0192-0561(93)90098-j
- 14. Brodde O.E., Engel G., Hoyer D., Bock K.D., Weber F. // Life Sci. 1981. V. 29. P. 2189–2198. https://doi.org/10.1016/0024-3205(81)90490-2
- Fujii N., Homma S., Yamazaki F., Sone R., Shibata T., Ikegami H., Murakami K., Miyazaki H. // Am. J. Physiol. 1998. V. 274. P. E1106–E1112. https://doi.org/10.1152/ajpendo.1998.274.6.E1106
- 16. Красникова Т.Л., Коричнева И.Л., Радюхин В.А. // Биохимия. 1989. Т. 54. С. 235–243.
- Агапова О.Ю., Скоблов Ю.С., Ткачев Г.А., Миронова Н.А., Голицын С.П., Масенко В.П., Чазова И.Е., Зыков К.А. // Мол. биология. 2016. Т. 50. С. 999– 1006. https://doi.org/10.7868/S0026898416050025
- Bundkirchen A., Brixius K., Bölck B., Nguyen Q., Schwinger R.H. // Eur. J. Pharmacol. 2003. V. 460. P. 19–26. https://doi.org/10.1016/s0014-2999(02)02875-3
- Tate K.M., Briend-Sutren M.M., Emorine L.J., Delavier-Klutchko C., Marullo S., Strosberg A.D. // Eur. J. Biochem. 1991. V. 196. P. 357–361. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb15824.x
- Hoffmann C., Leitz M.R., Oberdorf-Maass S., Lohse M.J., Klotz K.N. // Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 2004. V. 369. P. 151–159. https://doi.org/10.1007/s00210-003-0860-y
- Шевелев А.Я., Каширина Н.М., Кузнецова И.Б., Шарф Т.В., Мамочкина Е.Н., Агапова О.Ю., Гурская Т.Х., Липатова Л.Н., Пекло М.М., Руткевич П.Н., Янушевская Е.В., Рыбалкин И.Н., Скоблов Ю.С., Ефремов Е.Е., Власик Т.Н., Зыков К.А. // Вестник биотехнол. и физ.-хим. биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2015. Т. 11. С. 5–14.
- Greenwood F.C., Hunter W.M., Glover J.S. // Biochem. J. 1963. V. 89. P. 114–123. https://doi.org/10.1042/bj0890114

Radiolig and Binding Assay for the Simultaneous Determination of β_1 - and β_2 -Adrenergic Receptors in Human Blood Cells

A. Y. Shevelev^{*}, N. M. Kashirina^{**}, L. N. Lipatova^{**}, E. V. Yanushevskaya^{**}, M. M. Peklo^{**}, I. N. Rybalkin^{*, **}, P. N. Rutkevich^{*, **}, O. K. Chusovitina^{**}, N. A. Skoblova^{***}, Yu. S. Skoblov^{***, #}, T. N. Vlasik^{*, **}, and K. A. Zykov^{**, ****}

[#]*Phone:* +7(916) 644-30-95; e-mail: sur@ibch.ru

*Framon Joint Stock Company, ul. 3-ya Cherepkovskaya 15A, Moscow, 121552 Russia

**National Medical Research Center of Cardiology, ul. 3-ya Cherepkovskaya 15A, Moscow, 121552 Russia

***Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,

ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

****Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Delegatskaya 20/1, Moscow, 127473 Russia

In this study, a method for the separate determination of both types of adrenoceptors based on radioligand binding analysis using ¹²⁵I-iodocyanopindolol is proposed, comprising three measurements: (1) without competing ligands, (2) in the presence of selective ligand ICI 118,551 (0.25 μ M) and (3) in the presence of two selective ligands – ICI 118,551 and CGP 20712 (0.25 μ M each). The technique was tested on a model system of two transgenic cell lines ADL-7A and A2R9 with the expression of recombinant β_1 - and β_2 -adrenergic receptors. If the ratio of the number of β_1 -adrenergic receptors to β_2 -adrenergic receptors is 1 : 10, the measurement error is about 15%. Analysis of 9 cell lines representing different types of blood cells showed the presence of β_2 -adrenergic receptors in Daudi, Raji, Dami, K-562, HL-60, U-937 and THP-1 cells and their absence in Jurkat and MOLT-4 cells. β_1 -Adrenergic receptors are reliably registered only in THP-1 cells of monocytic origin. In the remaining cell lines, with the exception of Dami, the number of β_1 -adrenergic receptors was found below the detection limit, estimated as 250 molecules per cell. Measurements performed on the peripheral blood mononuclear cells of seven healthy donors showed the presence of β_2 -adrenergic receptors in all cases appeared to be on the border or beyond the detection limit.

Keywords: β_1 - and β_2 -adrenergic receptors, radioligand binding assay, human cells



УДК 577.112.6

СИНТЕЗ И ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНТАГОНИСТА РЕЦЕПТОРА ГАЛАНИНА GalR2 ПРИ ИШЕМИИ И РЕПЕРФУЗИИ СЕРДЦА КРЫС *in vivo*

© 2022 г. М. В. Сидорова^{*, #}, М. Е. Палькеева^{*}, Д. В. Авдеев^{*}, И. М. Студнева^{*}, Л. И. Серебрякова^{*}, О. М. Веселова^{*}, И. В. Доброхотов^{*}, А. С. Молокоедов^{*}, О. И. Писаренко^{*}

*ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова" Минздрава России, Россия, 121552 Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

> Поступила в редакцию 11.03.2022 г. После доработки 19.03.2022 г. Принята к публикации 22.03.2022 г.

На модели региональной ишемии и реперфузии сердца крысы *in vivo* изучено дозозависимое действие антагониста рецептора галанина GalR2, синтетического пептида M871 (H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Glu-His-Pro-Pro-Pro-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-NH₂) и фармакологического агониста G (H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-βAla-Ĥis-OH) на размеры инфаркта миокарда (ЙМ) и активность креатинкиназы-МВ (КК-МВ) в плазме крови. Пептиды синтезировали автоматическим твердофазным методом с применением Fmoc-методологии и очищали с помощью ВЭЖХ. Они имели корректную молекулярную массу и чистоту 97-98%. Блокада рецепторов GalR2 внутривенным введением M871 в дозе 3, 6 и 8 мг/кг перед началом реперфузии не влияла на размеры ИМ и активность КК-МВ по сравнению с контролем. Внутривенное введение агониста G в дозе 1 мг/кг в начале реперфузии достоверно снижало ИМ и активность КК-МВ в плазме на 38 и 40% соответственно по сравнению с контролем. Препараты М871 и G не оказывали существенного влияния на гемодинамические показатели сердца. Предварительное внутривенное введение возрастающих доз препарата M871 перед введением агониста G приводило к постепенному увеличению размеров ИМ и активности КК-МВ. Использование соединения М871 в дозе 6 или 8 мг/кг полностью отменяло кардиопротекторные эффекты агониста G. Полученные результаты свидетельствуют об участии рецептора GalR2 в механизмах защитного действия химерного агониста G на сердце, подвергнутое ишемии и реперфузии, и указывают на перспективность разработки лекарственных препаратов для терапии сердечно-сосудистых заболеваний на основе молекулярного конструирования пептидных агонистов рецептора GalR2.

Ключевые слова: рецептор GalR2, N-концевые фрагменты галанина, пептиды, твердофазный синтез, ишемия и реперфузия сердца, инфаркт миокарда, повреждение кардиомиоцитов **DOI:** 10.31857/S0132342322050220

ВВЕДЕНИЕ

Создание лекарственных средств на основе биоактивных пептидов значительно ускорилось в

последние годы благодаря исследованиям генома, расширившим выбор клеточных мишеней, и успехам комбинаторной химии и твердофазного синтеза пептидов с помощью Fmoc-методологии. В частности, большое внимание уделяется использованию галанина и лигандов его рецепторов для разработки препаратов, корректирующих нарушения метаболизма при ожирении, диабете и нейродегенеративных заболеваниях мозга [1]. Нейропептид галанин, состоящий из 29 а.о. у большинства видов животных и 30 а.о. у человека. широко распространен в центральной и периферической нервной системе, а также в других тканях и органах. В периферических органах, включая сердце, галанин действует не только через нейрональные механизмы, но и активируя трансмембранные рецепторы GalR1–3. За связывание с рецепторами отвечает *N*-концевой фрагмент

Сокращения: Вос – трет-бутилоксикарбонил; Ви^t – трет-бутил; DCM – дихлорметан; DMF – N, N-диметилформамид; DMSO – диметилсульфоксид; Fmoc – 9-флуоренилметоксикарбонил; GalR – рецептор галанина; MALDI-TOF – времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией; 4-MePip – 4-метилпиперидин; NMM – N-метилморфолин; TIS – триизопропилсилан; TBTU – N, N, N, Nтетраметил-O-(бензотриазол-1-ил)урония тетрафторборат; TFA – трифторуксусная кислота; Trt – тритил; AФK – активные формы кислорода; ЗР – зона риска; ИМ – инфаркт миокарда; И/Р – ишемия/реперфузия; КК-MB – креатинкиназа MB; ЛЖ – левый желудочек; САД – систолическое артериальное давление; ЧСС – частота сердечных сокращений.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (495) 414-67-16; эл. почта: peptide-cardio@yandex.ru).

пептида, первые 15 а.о. которого консервативно сохраняются у большинства видов млекопитающих. С-концевой фрагмент (17–29) варьирует у животных и человека и имеет слабую аффинность по отношению к рецепторам [2].

Влияние рецепторов галанина на регуляцию метаболизма и функции сердца при экспериментальной патологии изучено нелостаточно полно. Однако исследования последних лет показали, что экзогенные *N*-концевые фрагменты галанина (2-11) и (2-15), обладающие высоким сродством к рецептору GalR2, оказывают защитное действие на кардиомиоциты при ишемическом и реперфузионном (И/Р) повреждении. Это защитное действие приводит к снижению образования супероксидных радикалов в митохондриях и запуску сигнальных каскадов, уменьшающих гибель клеток от апоптоза и некроза и улучшаюших энергетическое состояние миокарда (возможные механизмы обсуждены в работах Timotin et al. [3] и Pisarenko et al. [4]). Впоследствии был синтезирован ряд оригинальных модифицированных аналогов фрагментов галанина (2-11) и (2-15) с сохранением фармакофорных остатков, ответственных за связывание с рецептором GalR2. Изучение этих пептидов на моделях И/Р повреждения сердца и доксорубицин-индуцируемой кардиомиопатии продемонстрировало их способность снижать гибель клеток, улучшать метаболическое и антиоксидантное состояние миокарда и уменьшать повреждения мембран кардиомиоцитов [5-7].

Наиболее эффективным оказалось соединение, представляющее собой химерный агонист G – последовательность галанина (2–13), дополненная природным дипептидом карнозином (βAla-His), H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-βAla-His-OH [6]. Существенно, что действие полноразмерного галанина, связывающегося со всеми тремя подтипами рецепторов GalR1-3, эффективно воспроизводилось модифицированным *N*-концевым фрагментом галанина G или его природным аналогом (2-15), обладающими высокой аффинностью к рецептору GalR2 [7]. Эти данные предполагают участие рецептора GalR2 в кардиопротекторном действии этих лигандов. В то же время рецептор-зависимые механизмы действия *N*-концевых фрагментов галанина при экспериментальной патологии сердца остаются невыясненными.

Цель данной работы состояла в выяснении роли активации рецепторов GalR2 в уменьшении повреждения сердца, происходящего под действием пептида G, при ишемии и реперфузии *in vivo*. Для этого мы использовали новый химерный пептидный антагонист рецепторов галанина GalR2 M871.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез пептидов G и М871. Пептиды G и М871 получали автоматическим твердофазным синтезом с применением Етос-методологии. Синтез пептида G (H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-βAla-His-OH) был описан нами ранее [5, 6]. При получении пептида М871 (H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Glu-His-Pro-Pro-Pro-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-NH₂) [8] в сочетании с N^α-Fmoc-зашитной группой для блокирования функциональных групп боковых цепей аминокислот были использованы кислотолабильные защитные группы: Вос – для индольного кольца Trp, $Bu^t - для$ гидроксильных функций Thr, Ser, Tyr и у-карбоксильной функции Glu, Trt – для карбоксамидной функции Asn и имидазольного кольца His. Для создания амидных связей применяли метод с использованием урониевых солей (ТВТU/NMM). По окончании синтеза пептид удаляли с полимерного носителя с одновременным деблокированием функциональных групп аминокислот действием TFA со скэвенджерами. После очистки методом ВЭЖХ пептид М871 имел корректную молекулярную массу (рис. 1). Характеристики пептидов G и М871 представлены в табл. 1.

Влияние пептидов G и M871 на размеры инфаркта миокарда и повреждение мембран кардиомиоцитов. Влияние блокады рецепторов GalR2 с помощью высокоаффинного антагониста M871 на кардиопротекторное действие химерного агониста рецепторов галанина G было изучено на модели региональной ишемии и реперфузии сердца крысы *in vivo*. Данная модель была использована нами ранее для оценки действия полноразмерного галанина и его *N*-концевых фрагментов [3, 4, 6].

Антагонист М871 связывается с рецепторами галанина GalR2 с более чем 30-кратной селективностью по сравнению с GalR1, оказывая мощное антагонистическое действие на рецептор GalR2. В дополнение пептид такой последовательности блокирует агонистические свойства галанина в экспериментах in vitro на клеточной линии, полученной из яичников китайского хомячка (СНО). Аффинность М871 в отношении подтипа рецепторов GalR3 не изучена. Однако известно, что GalR3 в основном экспрессируется в периферической нервной системе, а GalR2 – в центральных и периферических органах и тканях [9, 10]. Такие различия в распределении рецепторов обосновывают возможность использования пептида М871 в исследованиях на сердце.

В исходном состоянии среднее систолическое артериальное давление (САД) было практически одинаковым во всех экспериментальных группах (см. "Эксп. часть") и составляло 85 ± 2 мм рт. ст., частота сердечных сокращений (ЧСС) – 330 ± 5 мин⁻¹. Внутривенное введение физиологического рас-



Рис. 1. Химическая структура, аналитическая ВЭЖХ и масс-спектр MALDI-TOF пептида М871.

твора в контроле или растворителя (0.5%-ного DMSO в физиологическом растворе, который применяли для растворения антагониста M871) в период региональной ишемии не приводило к изменению САД и ЧСС при реперфузии. Введение пептида G в дозе 1.0 мг/кг веса вызывало незначительное снижение САД и ЧСС на первых минутах реперфузии, которое сменялось практически полным восстановлением этих параметров к окончанию реперфузии. Введение антагониста M871 в дозе 3, 6 или 8 мг/кг за 5 мин до окончания реперфузии не оказывало достоверного влияния на САД и ЧСС в ходе эксперимента. Гистохимический анализ срезов левого желудочка (ЛЖ) после реперфузии не выявил достоверных различий в размерах зоны риска (ЗР/ЛЖ) между контрольной группой, группой растворителя (0.5%-ный DMSO) и группами пептида M871, использовавшегося в дозе 3, 6 и 8 мг/кг (табл. 2). Это означает, что И/Р повреждение было смоделировано одинаково у животных всех групп. В контроле величина инфаркта миокарда (ИМ), выраженная отношением ИМ/ЗР, составила (45.8 \pm 2.0)%. Внутривенное введение 0.5%ного DMSO после периода региональной ишемии не оказывало достоверного влияния на этот

		Молекулярная	Выхол*	Растворимость	воримость ВЭЖХ МАІ		MALDI-TOF
Пептид	Последовательность	масса, г/моль	<i>%</i>	в воде, мг/мл	<i>R</i> _t , мин	чистота, %	m/z
G	H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser- Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu- Gly-Pro-βAla-His-OH	1499.67	46.3	>20	14.66	98.20	1499.76 $[M + H]^+$, 1521.73 $[M + Na]^+$, 1537.72 $[M + K]^+$
M871	H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser- Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly- Pro-Glu-His-Pro-Pro-Pro- Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-NH ₂	2287.61	33.2	~10	18.63	97.13	2287.20 [<i>M</i> + H] ⁺

Таблица 1. Характеристики пептидов G и М871

* Выход в расчете на стартовую аминокислоту, присоединенную к полимерному носителю.

Группа	3Р/ЛЖ, %	ИМ/ЗР, %	КК-МВ, ед./л
Исходное состояние	_	_	172.4 ± 16.2
Контроль	41.0 ± 3.1	45.8 ± 2.0	$1732.8 \pm 216.0^{\#}$
DMSO	39.7 ± 3.1	39.5 ± 4.0	$1703.9 \pm 239.2^{\#}$
G	40.1 ± 3.0	$28.4 \pm 2.1*$	$1023.5 \pm 106.3^{\#, *}$
M871-3	39.4 ± 4.5	45.1 ± 2.7	$1822.4 \pm 116.5^{\#, +}$
M871-6	41.0 ± 4.8	45.6 ± 2.2	$1789.8 \pm 197.1^{\#, +}$
M871-8	42.3 ± 2.7	46.8 ± 2.3	$1910.3 \pm 188.4^{\#, \ +}$

Таблица 2. Влияние введения пептидов G и M871 на размеры зоны риска, инфаркта миокарда и активность КК-МВ в плазме крови крыс

Примечание: данные представлены как М \pm m для серий из пяти опытов. Отмечены достоверные отличия (p < 0.05) по сравнению с контролем (*), исходным состоянием ([#]) и пептидом G (⁺).

показатель. В соответствии с ранее полученными результатами [6], размер ИМ достоверно снижался на 38% (по сравнению с контрольной группой, p < 0.001) под действием агониста рецептора GalR2 — пептида G. Введение изученных доз антагониста M871 (3, 6 и 8 мг/кг) за 5 мин до начала реперфузии не влияло на ИМ по сравнению с контрольной группой.

Развитие ИМ в контрольной группе сопровождалось увеличением активности маркера некроза креатинкиназы МВ (КК-МВ) в плазме крови в конце реперфузии на порядок по сравнению с исходным состоянием (табл. 2). Введение 0.5%ного DMSO не влияло на активность КК-МВ по сравнению с контролем. Под действием пептида G активность КК-МВ к окончанию реперфузии снижалась на 40% по сравнению с контролем (p == 0.019). При введении антагониста M871 в дозе 3. 6 или 8 мг/кг этот показатель не отличался от значения в контроле и был достоверно выше, чем после введения пептида G. Полученные данные показывают, что блокада рецепторов GalR2 возрастающими дозами антагониста М871 перед началом реперфузии не увеличивала некротическое повреждение реперфузированного сердца. Это подтверждается величинами ИМ и активности маркера некроза КК-МВ, достоверно не отличающимися от этих показателей у животных контрольной группы.

На следующем этапе было изучено влияние совместного действия антагониста М871 и агониста G на показатели повреждения реперфузированного сердца. В этих опытах блокаду рецепторов GalR2 различными дозами антагониста M871 осушествляли за 5 мин до окончания окклюзии левой коронарной нисходящей артерии перед введением оптимальной дозы агониста G (1 мг/кг) в начале реперфузии. Результаты этих экспериментов суммированы на рис. 2. Предварительное введение возрастающих доз антагониста М871 перед введением агониста G приводило постепенному увеличению размеров ИМ K

(рис. 2*a*). Начиная с дозы антагониста M871 6 мг/кг, различия в ИМ/ЗР между группами совместного введения пептидов (М871-6 + G и M871-8 + G) и группой введения агониста G становились достоверными (p < 0.001), а величина ИМ у животных этих групп не отличалась от контрольной группы. Увеличение ИМ при совместном введении пептидов M871 и G сопровождалось возрастанием активности КК-МВ в плазме крови крыс (рис. 26). В группах животных, которые получали оба пептида M871-6 + G и M871-8 + G, активность КК-МВ в плазме достоверно не отличалась от значения этого показателя в контрольной группе, а в группе, подвергнутой воздействию пептидов M871-8 + G, была достоверно выше (p = 0.007), чем в группе агониста G.

Приведенные результаты показывают, что использованные дозы пептида M871 не оказывали дополнительного повреждающего действия на сердце при реперфузии. Однако введение пептида M871 перед использованием фармакологического агониста G заметно снижало или полностью отменяло, как в случае высоких доз 6 и 8 мг/кг, кардиопротекторное действие последнего. Это свидетельствует об участии рецепторов GalR2 в механизмах защитного действия химерного лиганда G на ишемизированный миокард.

Роль активации рецепторов GalR2 в кардиопротекторном действии пептида G. Для изучения механизмов действия фармакологического агониста рецепторов галанина пептида G на сердце крыс in vivo был впервые использован химерный пептидный антагонист рецепторов GalR2 M871. Дозозависимое влияние антагониста М871 при использовании оптимальной дозы агониста G оценивали по изменениям размеров ИМ И активности маркера некроза МВ-КК в плазме крови крыс при региональной ишемии миокарда и реперфузии. Ранее на этой модели была показана возможность эффективного снижения некротического повреждения миокардиальной ткани и улучшения метаболизма реперфузированного

50

45

сердца под действием природных и модифицированных *N*-концевых фрагментов галанина, обладающих высокой аффинностью к рецепторам GalR2, при их внутривенном введении в начальной стадии реперфузии [6]. Однако действие этих агонистов не было изучено в условиях предварительной блокады рецепторов GalR2. Результаты данной работы показывают, что фармакологическое посткондиционирование пептидом G обладает выраженным GalR2-зависимым терапевтическим потенциалом, способным уменьшать размеры пораженного участка миокарда при остром ИМ.

Активация пептидами галанина различных путей передачи сигнала при связывании с рецептором GalR2 обсуждена нами в работе Писаренко с соавт. [11]. Сопряжение GalR2 с G-белками различных типов (Gi/o, Gq/11 и G12/13) [12] стимулирует захват и окисление глюкозы кардиомиоцитами [13, 14], ингибирует проапоптозные белки ВАD/ВАХ и снижает активности каспазы-3 и каспазы-9 [1, 15], блокирует открытие митохондриальных пор временной проницаемости (mPTP) и, таким образом, способствует выживанию и подвижности клеток [16]. Наряду с этим пептидные агонисты галанина способны усиливать механизмы антиоксидантной защиты при И/Р повреждении сердца. На это указывают снижение продукции АФК, уменьшение образования продуктов перекисного окисления липидов и увеличение активности супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы в реперфузированном миокарде [7]. Эти эффекты могут быть вызваны как усилением экспрессии генов, кодирующих антиоксидантные ферменты [17], так и прямым перехватом АФК и ингибированием перекисного окисления липидов [18]. Результат посткондиционирования сердца пептидом G – повышение эффективности метаболических путей образования АТР, поддержка ионного гомеостаза и улучшение антиоксидантного состояния кардиомиоцитов при реперфузии. Важно, что действие полноразмерного галанина, связывающегося co всеми подтипами рецепторов GalR1-3, воспроизводится его N-концевыми фрагментами, обладающими аффинностью к рецептору GalR2. Это относится как к природным фрагментам (2-11) и (2-15), так и к их модифицированным аналогам, среди которых высокую эффективность на всех использованных моделях обнаруживал синтетический химерный агонист G. Эти данные указывают на принципиальную роль активации рецепторов GalR2 в кардиопротекторном действии пептидных агонистов рецепторов галанина, которая была подтверждена при совместном использовании антагониста М871 и фармакологического лиганда G.



(a)

стом М871 на снижение повреждения сердца при ишемии и реперфузии, вызванное введением фармакологического агониста рецепторов галанина G. (a) – Дозозависимое влияние антагониста M871 на изменение размеров инфаркта миокарда (ИМ/ЗР, %), вызванное введением агониста G в начале реперфузии. 0 – введение пептида G в дозе 1 мг/кг без предварительного введения пептида М871; 3, 6 и 8 – введение антагониста M871 в дозе 3, 6 или 8 мг/кг с последующим введением пептида G (1 мг/кг). Данные представлены как М ± m для серий из пяти опытов. Отмечены достоверные отличия (р < 0.05) по сравнению с контролем (*) и пептидом $\tilde{G}(^{\#})$. Черным цветом показан размер инфаркта миокарда в контроле; (б) – дозозависимое влияние антагониста М871 на изменение активности КК-МВ в плазме крови крыс в конце реперфузии, вызванное введением агониста G. G – введение агониста G в дозе 1 мг/кг без предварительного введения M871; M871-3 (M871-6, M871-8) + G введение антагониста M871 в дозе 3, 6 или 8 мг/кг с последующим введением пептида G (1 мг/кг); К - контроль. Данные представлены как M ± m для серий из пяти опытов. Отмечены достоверные отличия (p < 0.05) по сравнению с контролем (*) и пептидом G ([#]).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез пептидов G и М871. В работе использованы производные L-аминокислот (Novabiochem, Германия); TBTU, TIS, NMM (Fluka,

#

Q

8

Швейцария). Для синтеза применяли DMF, дихлорметан и TFA (Panreac, Испания). Препаративную ВЭЖХ проводили на хроматографе Well-Chrom (Knauer, Германия), аналитическую ВЭЖХ – на приборе Smartline (Knauer, Германия). Для ВЭЖХ использовали ацетонитрил (Panreac, Испания). Аналитическую ВЭЖХ проводили на колонке Kromasil 100-5 C18 (4.6×250 мм), размер частиц сорбента 5 мкм; элюенты: буфер А – 0.05 М КН₂РО₄ (рН 3.0), буфер Б – 70%-ный ацетонитрил в буфере А, элюция со скоростью 1 мл/мин градиентом концентрации буфера Б в буфере А от 20 до 80% за 30 мин, детекция при 220 нм. Препаративную ВЭЖХ проводили на колонке Eurosphere 100-10 С18 (20 × 250 мм), размер частиц сорбента 10 мкм. На первом этапе очистки пептида М871 в качестве элюентов использовали буфер А (0.05 М КН₂РО₄, рН 3.0) и буфер Б (70%ный ацетонитрил). Элюцию проводили от 90% буфера А градиентом буфера Б (0.5%/мин) со скоростью 10 мл/мин. После этого фракции, содержащие целевой продукт, собирали, ацетонитрил упаривали, остаток обессоливали на той же колонке с использованием в качестве буфера А 0.01%-ной TFA в тех же условиях. Детекцию пептидов осуществляли при 220 нм.

Синтез пептида G (H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-βAla-His-OH) описан ранее [5, 6].

Автоматический твердофазный синтез пептида M871 (H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Glu-His-Pro-Pro-Pro-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-NH₂) проводили на синтезаторе Tribute-UV (Protein Technologies, Inc., CIIIA) в масштабе 0.125 ммоль в соответствии с программой однократной конденсации **Fmoc**-аминокислот, включавшей функцию спектрофотометрического контроля полноты отщепления Fmoc-защитных групп. Пептидную цепь наращивали с С-конца по одной аминокислоте на полимере Ринка, представляющем собой сополимер стирола с 1% дивинилбензола с 4-(2',4'-диметоксифенил-Fmoc-аминометил)-феноксиметильной якорной группой (Novabiochem, Германия) с содержанием аминогрупп 0.33 ммоль/г. Цикл твердофазного синтеза включал следующие стадии: 1) деблокирование α-аминогрупп 25%-ным 4-MePip/DMF (2 × 2 мин); 2) 4 промывки DMF; 3) конденсация 0.4 М раствора 4-кратного избытка ацилирующего агента (0.5 ммоль Fmoc-аминокислоты + 0.5 ммоль TBTU + 1.0 ммоль NMM) в DMF в течение 1 ч: 4) 4 промывки DMF. Пептид отщепляли от полимерного носителя действием смеси TFA-водатриизопропилсилан-дитиотреитол (85:5:5:5) в течение 1.5 ч. Полимер отфильтровывали, промывали на фильтре деблокирующей смесью, фильтрат упаривали, продукт осаждали сухим диэтиловым эфиром. Осадок отфильтровывали,

промывали эфиром, DCM, эфиром и высушивали. Получено 95 мг (33.2%) пептида M871, характеристики приведены в табл. 1.

Влияние пептидов M871 и G на размеры инфаркта миокарда и повреждение мембран кардиомиоцитов. Опыты проведены на самцах крыс Wistar (300–350 г, возраст 10 недель). Животные получены из филиала "Столбовая" ФГБУН "Научный центр биомедицинских технологий" ФМБА России. В каждой экспериментальной группе было по пять животных.

Препарирование наркотизированных 20%ным уретаном (1.2 г/кг веса, внутрибрюшинно) животных в условиях торакотомии осуществляли при искусственной вентиляции легких комнатным воздухом, как указано в работе Palkeeva et al. [6]. Регистрацию среднего артериального давления (САД) и частоты сокращений сердца (ЧСС) осуществляли на полиграфе Biograph-4 (Санкт-Петербургский государственный университет аэрокосмического приборостроения, Россия). Запись данных на компьютер в режиме online проводили с помощью аналого-цифрового преобразователя USB 6210 (National Instruments, США) и программы в системе LabVIEW 7 (National Instruments, США). После 30-мин стабилизации гемолинамических показателей (исходное состояние) выполняли 40-мин окклюзию левой коронарной нисходящей артерии, продолжительность последующей реперфузии составляла 60 мин. Для определения активности маркера некроза креатинкиназы-МВ (КК-МВ) проводили отбор крови в гепаринизированные пробирки из венозного катетера в исходном состоянии и после 60-мин реперфузии. Проведены следующие серии опытов: Контроль – указанный выше протокол с внутривенным введением 0.5 мл физиологического раствора одновременно с началом реперфузии; G – тот же протокол с внутривенным введением оптимальной дозы химерного агониста пептида G (1.0 мг/кг болюсом [6]) в начале реперфузии; М871 – внутривенное введение антагониста GalR2 M871 болюсом в дозах 3, 6 или 8 мг/кг за 5 мин до начала реперфузии; M871 + G2 – внутривенное введение пептида М871 в дозах 3.6 или 8 мг/кг за 5 мин до начала реперфузии с последующим внутривенным введением пептида G (1.0 мг/кг) одновременно с началом реперфузии; DMSO – внутривенное введение растворителя M871 (0.5%-ного раствора DMSO в физиологическом растворе) за 5 мин до начала реперфузии. Пептиды растворяли в DMSO, а затем до необходимой концентрации в физиологическом растворе непосредственно перед введением.

В конце опыта для гистохимической оценки размеров зоны риска (ЗР) и интактной области сердца использовали 2%-ный раствор Эванса и инкубацию срезов левого желудочка (ЛЖ) сердца

в 1%-ном растворе 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида в 0.1 М калий фосфатном буфере (pH 7.4 при 37°C), как указано в работе Palkeeva et al. [6]. Площади инфаркта миокарда (ИМ) и 3P в окрашенных срезах ЛЖ определяли методом компьютерной планиметрии, используя программу ImageJ (NIH, США). В каждой группе рассчитывали отношения зона риска/вес левого желудочка (3P/ЛЖ) и инфаркт миокарда/зона риска (ИМ/3P), в процентах. Активность КК-МВ в плазме крови определяли на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония) при $\lambda = 340$ нм, используя наборы фирмы BioSystems (Испания).

Статистический анализ данных. Использован пакет программ SigmaPlot 11.2 (SysStat, США). Значения представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего значения (M \pm m). При сравнении нескольких групп с контролем использовали *t*-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони. Статистически значимыми отличия считали при *p* < 0.05.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние десятилетия усилия многих лабораторий сосредоточены на исследовании молекулярных механизмов регуляции функций жизненно важных органов человека с помошью природных и синтетических пептидов. Результаты настоящей работы расширяют представление о галанинергической системе как перспективной мишени для фармакологического воздействия при функциональных и метаболических нарушениях сердца. Нами впервые использован высокоселективный антагонист рецептора галанина GalR2 M871 для изучения действия фармакологического пептидного агониста G – модифицированного *N*-концевого фрагмента галанина (2–15) – при региональной ишемии и реперфузии сердца крыс in vivo. С его помощью показано, что блокада рецепторов GalR2 перед возобновлением коронарного кровотока отменяет полезные эффекты агониста G, увеличивая величину ИМ и повреждение мембран кардиомиоцитов в реперфузированном сердце. Эти данные указывают на физиологическое значение активации рецептора GalR2 в защите сердца от И/Р стресса и демонстрируют перспективность молекулярного конструирования агонистов рецептора GalR2 для разработки лекарственных пептидных препаратов для терапии сердечно-сосудистых заболеваний.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 18-015-0008-а, 18-015-0009-а) и Министерства здравоохранения Российской Федерации (рег. № НИОКТР 121031700143-1).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования на животных проводили в соответствии с Международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с использованием животных, принятыми Международным советом медицинских научных обществ в Женеве в 1985 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lang R., Gundlach A.L., Kofler B. // Pharmacol. Ther. 2007. V. 115. P. 177–207. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.05.009
- Branchek T.A., Smith K.E., Gerald C., Walker M. // Trends Pharmacol. Sci. 2000. V. 21. P. 109–117. https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01446-2
- Timotin A., Pisarenko O., Sidorova M., Studneva I., Shulzhenko V., Palkeeva M., Serebryakova L., Molokoedov A., Veselova O., Cinato M., Tronchere H., Boal F., Kunduzova O. // Oncotarget. 2017. V. 8. P. 21241– 21252. https://doi.org/10.18632/oncotarget.15071
- 4. Pisarenko O., Timotin A., Sidorova M., Studneva I., Shulzhenko V., Palkeeva M., Serebryakova L., Molokoedov A., Veselova O., Cinato M., Boal F., Tronchere H., Kunduzova O. // Oncotarget. 2017. V. 8. P. 101659– 101671.

https://doi.org/10.18632/oncotarget.21503

- Азьмуко А.А., Веселова О.М., Молокоедов А.С., Овчинников М.В., Палькеева М.Е., Писаренко О.И., Серебрякова Л.И., Сидорова М.В., Студнева И.М. // Патент RU2648846C1. Опубл. 28.03.2018.
- Palkeeva M., Studneva I., Molokoedov A., Serebryakova L., Veselova O., Ovchinnikov M., Sidorova M., Pisarenko O. // Biomed. Pharmacother. 2019. V. 109. P. 1556–1562. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.182
- Писаренко О.И., Студнева И.М., Серебрякова Л.И., Тимошин А.А., Коновалова Г.Г., Ланкин В.З., Тихазе А.К., Веселова О.М., Доброхотов И.В., Любимов Р.О., Сидорова М.В., Палькеева М.Е., Молокоедов, А.С. // Биохимия. 2021. Т. 86. С. 584–594. [Pisarenko O.I., Studneva I.M., Serebryakova L.I., Timoshin A.A., Konovalova G.G., Lankin V.Z., Tikhaze A.K., Veselova O.M., Dobrokhotov I.V., Lubimov R.O., Sidorova M.V., Palkeeva M.E., Molokoedov A.S. // Biochemistry (Moscow). 2021. V. 86. P. 496–505.] https://doi.org/10.1134/S0006297921040106
- Sollenberg U.E., Lundstrom L., Bartfai T., Langel U. // Int. J. Peptide Res. Ther. 2006. V. 12. P. 115–119. https://doi.org/10.1007/s10989-005-9008-x
- 9. Wang S., He C., Hashemi T., Bayne M. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 31949–31952.

- 10. O'Donnell D., Ahmad S., Wahlestedt C., Walker P. // J. Comp. Neurol. 1999. V. 409. P. 469–481.
- Писаренко О.И., Студнева И.М., Веселова О.М. // Биохимия. 2021. Т. 86. С. 1502–1512. [Pisarenko O.I., Studneva I.M., Veselova O.M. // Biochemistry (Moscow). 2021. V. 86. Р. 1342–1351.] https://doi.org/0.1134/S000629792110014X
- Webling K.E.B., Runesson J., Bartfai T., Langel Ü. // Front. Endocrinol. 2012. V. 3. P. 146. https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00146
- Fang P., Shib M., Guo L., He B., Wang Q., Yu M., Bo P., Zhang Zh. // Peptides. 2014. V. 62. P. 159–163. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.10.001
- 14. Jay M.A., Ren J. // Curr. Diab. Rev. 2007. V. 3. P. 33–39. https://doi.org/10.2174/157339907779802067

- Krijnen P.A., Nijmeijer R., Meijer C.J., Visser C.A., Hack C.E., Niessen H.W. // J. Clin. Pathol. 2002. V. 55. P. 801–811. https://doi.org/10.1136/jcp.55.11.801
- 16. Hausenloy D.J., Yellon D.M. // J. Clin. Invest. 2013. V. 123. P. 92–100. https://doi.org/10.1172/JCI62874
- Timotin A., Cinato M., Kramar S., Loy H., Merabishvili G., Boal F., Tronchere H., Kunduzova O. // 2019. Preprint at https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_ id=3424189 https://doi.org/10.2139/ssrn.3424189
- Power O., Jakeman P., FitzGerald R.J. // Amino Acids. 2013. V. 44. P. 797–820. https://doi.org/10.1007/s00726-012-1393-9

Synthesis of Galanine Receptor GalR2 Antagonist and Its Biological Activity in Ischemia and Reperfusion of Rat Heart *in vivo*

M. V. Sidorova^{*, #}, M. E. Palkeeva^{*}, D. V. Avdeev^{*}, I. M. Studneva^{*}, L. I. Serebryakova^{*}, O. M. Veselova^{*}, I. V. Dobrokhotov^{*}, A. S. Molokoedov^{*}, and O. I. Pisarenko^{*}

[#]Phone: +7 (495) 414-67-16; e-mail: peptide-cardio@yandex.ru *National Medical Research Center of Cardiology, Ministry of Health Care, ul. 3-ya Cherepkovskaya 15A, Moscow, 121552 Russia

The dose-dependent effect of galanin receptor antagonist GalR2 M871 (H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Glu-His-Pro-Pro-Pro-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-NH2) and pharmacological agonist G (H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro- β Ala) on the size of myocardial infarction (MI) and creatine kinase-MB activity (CK-MB) in blood plasma was studied on a model of regional ischemia and reperfusion of rat heart in vivo. Peptides were synthesized by automatic solid-phase method using Fmoc methodology and purified using HPLC. They had the correct molecular weight and purity of 97–98%. Blockade of GalR2 receptors by intravenous (IV) administration of M871 at a dose of 3, 6, and 8 mg/kg before the start of reperfusion did not affect the size of MI and the activity of CK-MB compared with the control. Intravenous administration of G at a dose of 1 mg/kg at the beginning of reperfusion significantly reduced MI and CK-MB activity in plasma by 38 and 40%, respectively, compared with the control. M871 and G did not significantly affect the hemodynamic parameters of the heart. Preliminary intravenous administration of increasing doses of M871 before the introduction of G led to a gradual increase in the size of MI and the activity of CK-MB. Using of M871 at a dose of 6 or 8 mg/kg completely canceled the cardioprotective effects of G. Results indicate the participation of GalR2 receptors in the mechanisms of the protective action of the chimeric agonist G on the heart subjected to ischemia and reperfusion. They point to the prospects of developing drugs for the treatment of cardiovascular diseases based on the molecular design of peptide agonists of the GalR2 receptor.

Keywords: GalR2 receptor, N-terminal fragments of galanin, peptides, solid-phase synthesis, cardiac ischemia and reperfusion, myocardial infarction, cardiomyocyte damage

УДК 615.276;547.854.4;544.165

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИМИДИНА – ИНГИБИТОРОВ ИЗОФОРМ ЦИКЛООКСИГЕНАЗ

© 2022 г. Ю. З. Хазимуллина^{*, #}, А. Р. Гимадиева^{*}, В. Р. Хайруллина^{**}, Л. Ф. Зайнуллина^{***}, Ю. В. Вахитова^{***}, А. Г. Мустафин^{*, **}

*Уфимский Институт химии — обособленное структурное подразделение ФГБНУ "Уфимский федеральный исследовательский центр" РАН, Россия, 450054 Уфа, просп. Октября, 71

**ФГБОУ ВО "Башкирский государственный университет", Россия, 450076 Уфа, ул. Заки Валиди, 32

***Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение

ФГБНУ "Уфимский федеральный исследовательский центр" РАН, Россия, 450054 Уфа, просп. Октября, 71

Поступила в редакцию 02.11.2021 г.

После доработки 10.12.2021 г.

Принята к публикации 22.12.2021 г.

Методом молекулярного докинга проведено моделирование комплексообразования 17 производных урацила с циклическими и ациклическими сера- и кислородсодержащими заместителями в пиримидиновом цикле с активными центрами изоформ циклооксигеназ (COX). Из набора протестированных соединений выявлены два соединения-лидера, представляющие собой конъюгаты 5-гидрокси-1,3,6-триметилурацила с *N*-фталил-L-аминокислотами, которые могут быть эффективными ингибиторами изоформ COX с повышенной селективностью действия в отношении фермента COX-2, индуцируемого при воспалительных процессах в организме. Осуществлен синтез этих соединений и проведены их биологические испытания в условиях *in vivo* на четырех моделях воспаления, вызванного введением каррагинана, лидокаина, яичного белка и формалина. Установлено, что конъюгаты 5-гидрокси-1,3,6-триметилурацила с *N*-фталилаланином и *N*-фталилметионином обладают выраженной противовоспалительной активностью и по эффективности противовоспалительного действия сопоставимы с лекарственным препаратом Ортофеном. Приведена оценка изоэнзим-специфического ингибирования ферментов-изоформ COX, выявлена выраженная противовоспалительная активность полученных соединений.

Ключевые слова: 5-гидрокси-1,3,6-триметилурацил, природные аминокислоты, молекулярный докинг, противовоспалительная активность, изоформы циклооксигеназ (COX-1/COX-2), стерическая комплементарность, аффинность

DOI: 10.31857/S0132342322050104

введение

Производные пиримидина, модифицированные по положениям N1, N3, C5 и C6, обладают широким спектром фармакологической активности, включая противоопухолевую, иммуномодулирующую, гепатопротекторную, а также антиокислительную и противовоспалительную активность в сочетании с умеренной или низкой токсичностью [1–6]. В настоящее время ведется активный поиск новых лекарственных средств с выраженным противовоспалительным действием среди производных данного класса органических соединений [7].

Известно, что противовоспалительное действие органических соединений может быть реализовано в живых системах по нескольким механизмам: ингибирование фосфолипазы A₂, циклооксигеназы-2 (COX-2) или обеих изоформ циклооксигеназ (COX-1 и COX-2), 5-липоксигеназы, лейкотриен-A₄-гидролазы и т.д. [8–15]. При этом в научной медицинской литературе имеется большое количество данных о том, что использование противовоспалительных лекарственных средств стероидной природы, снижающих каталитическую активность фосфолипазы A₂, способствует развитию выраженных побочных эффектов, таких как увеличение индекса массы тела, тяжелые депрессивные состояния и др. [14–17].

Сокращения: СОХ – циклооксигеназа; IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования; НПВП – нестероидный противовоспалительный лекарственный препарат.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (987) 476-49-00; эл. почта: yulialion91@mail.ru).

В этой связи в настоящее время ведется активный поиск нестероидных противовоспалительных лекарственных средств. Однако при разработке нестероидных противовоспалительных лекарственных препаратов (НПВП) нового поколения актуальной проблемой оказывается исследование селективности их действия в отношении изоформ COX.

СОХ представляет собой гемсодержащий фермент, который катализирует реакцию биосинтеза простагландинов и тромбоксанов из арахидоновой кислоты [18-26]. Он существует в двух изоформах: циклооксигеназа-1 (СОХ-1) и циклооксигеназа-2 (СОХ-2) [20-25], которые гомологичны друг другу на 60%. Известно, что СОХ-1 – это конститутивный фермент, присутствующий в тканях млекопитающих практически повсеместно [18-24]. В тромбоцитах СОХ-1 обеспечивает превращение арахидоновой кислоты в тромбоксан [18-22]. Ингибирование каталитической активности СОХ-1 при приеме неселективных НПВП приводит к повреждению стенки желудка и развитию язв [22-24]. СОХ-2 в обычных условиях присутствует в мозге и корковом слое почек [18-20]. В других тканях СОХ-2 индуцируется при воспалении [20-24]. Кроме того, в литературе имеется множество фактов, подтверждающих участие СОХ-2 в канцерогенезе кишечника и молочных желез [18-24]. Все вышеперечисленные данные позволяют заключить, что поиск соединений, обладающих выраженной противовоспалительной активностью и высокой селективностью в отношении СОХ-2, оказывается также нерациональным. В этой связи разработка новых эффективных НПВП, характеризующихся умеренным фармакологическим профилем и умеренной активностью в отношении СОХ-2, можно считать актуальной научно-практической задачей.

К настоящему времени в научной литературе накоплен значительный объем количественной информации по эффективности ингибирования активности изоформ COX разными классами биологически активных веществ. В этих условиях эмпирический поиск органических соединений, обладающих повышенной избирательностью действия в отношении COX-2, без привлечения методов компьютерной химии представляет собой трудновыполнимую задачу, требующую значительных временных затрат [25–32]. По этим же причинам синтез новых биологически активных веществ, основанный исключительно на интуитивном опыте исследователя, также нерационален. Современным и более эффективным способом решения научных и практических задач поиска новых эффективных потенциальных лекарств среди разных классов гетероциклических соединений оказывается привлечение методов виртуального скрининга, базирующихся на изучении стерической комплементарности органических соединений с активными центрами ферментов и рецепторов. Эти методы позволяют уже на начальных стадиях создания потенциальных лекарственных соединений предсказывать их биологическую активность [27–32] и, следовательно, отбирать соединения-лидеры для дальнейших доклинических и клинических испытаний.

Цель настоящей работы — изучение возможности ингибирования каталитической активности изоформ СОХ производными пиримидина, модифицированными по положениям N1, N3, C5 и C6, с гетероциклическими и ациклическими заместителями, селективности действия этих соединений в отношении СОХ-1 и СОХ-2, а также их противовоспалительной активности *in silico* и *in vivo*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярный докинг. На первом этапе скрининговых исследований нами была изучена стерическая комплементарность и аффинность соединений (I-XVII) (табл. 1) (соединения (I-XV) синтезированы ранее [33]) к активным центрам изоформ СОХ методом молекулярного докинга с использованием программы AutoDock 4.2 (Scripps Research, США). Результаты этих исследований приведены в табл. 2. Анализ данных показал, что из 17 протестированных соединений только лиганды (XVI) и (XVII), содержащие в качестве заместителей в положении R₃ достаточно объемный полярный 2-замещенный изоиндолин-1,3-дионовый фрагмент, характеризуются сравнительно высокими численными значениями свободных энергий связывания с активными центрами изоформ СОХ, сопоставимыми с аналогичными характеристиками для референсных ингибиторов данных ферментов – действующих веществ НПВП Диклофенак, Флурбипрофен и Целекоксиб. Программа AutoDock 4.2 присваивает достаточно высокие численные значения оценочных функций этим соединениям благодаря их способности образовывать водородные связи, а также участию в образовании полярных и Т-стэкинговых взаимодействий с активными центрами изоформ СОХ. В частности, положение соединений (XVI) и (XVII) в активном центре COX-1 и COX-2 стабилизируют водородные связи и полярные взаимодействия с Туг355 и Met522, а также Т-стэкинговые взаимодействия с His90, Tyr355 и Trp387 (рис. 1). На основании этих данных можно предположить, что структуры моделируемых соединений (XVI) и (XVII) способны в пуле изоформ COX замещать арахидоновую кислоту. Установлено, что вследствие достаточно высокого структурного

Габлица 1. Производные пиримидина	, модифицированные по положениям	N1, N3	, С5 и С6
-----------------------------------	----------------------------------	--------	-----------

 $\begin{array}{c} O\\ R_2 \cdot \overset{3}{\overset{N}{\underset{5}{\overset{5}{\underset{5}{\underset{1}{\underset{1}{\atop}}}}}}} R_3\\ O \overset{1}{\overset{1}{\underset{R_1}{\overset{6}{\underset{1}{\atop}}}}} R_4\\ R_4\end{array}$

Соединение	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(I)	Н	CH ₃	ОН	CH ₃
(II)	CH ₃	CH ₃	ОН	CH ₃
(III)	CH ₃	CH ₃	OCH ₃	CH ₃
(IV)	-CH ₂ CH ₂ SC ₄ H ₉ - <i>i</i>	-CH ₂ CH ₂ SC ₄ H ₉ - <i>i</i>	Н	CH ₃
(V)	-CH ₂ CH ₂ SC ₄ H ₉ - <i>i</i>	-CH ₂ CH ₂ SC ₄ H ₉ - <i>i</i>	–OCH ₂ CH ₂ SC ₄ H ₉ - <i>i</i>	CH ₃
(VI)	-CH ₂ CH ₂ SC ₄ H ₉ - <i>i</i>	-CH ₂ CH ₂ SC ₄ H ₉ - <i>i</i>	ОН	CH ₃
(VII)	Н	-CH ₂ CH ₂ SC ₄ H ₉ - <i>i</i>	Н	CH ₃
(VIII)	CH ₃	CH ₃	-OCH ₂ CH ₂ SC ₄ H ₉	CH ₃
(IX)	-CH ₂ CH ₂ SC ₄ H ₉	CH ₃	-OCH ₂ CH ₂ SC ₄ H ₉	CH ₃
(X)	-CH ₂ CH ₂ SOC ₄ H ₉ - <i>i</i>	-CH ₂ CH ₂ SOC ₄ H ₉ - <i>i</i>	Н	CH ₃
(XI)	Н	-CH ₂ CH ₂ SOC ₄ H ₉ - <i>i</i>	Н	CH ₃
(XII)	-CH ₂ CH ₂ SOC ₄ H ₉ - <i>i</i>	-CH ₂ CH ₂ SOC ₄ H ₉ - <i>i</i>	ОН	CH ₃
(XIII)	-CH ₂ CH ₂ SOC ₄ H ₉ - <i>i</i>	-CH ₂ CH ₂ SOC ₄ H ₉ - <i>i</i>	-OCH ₂ CH ₂ SOC ₄ H ₉ - <i>i</i>	CH ₃
(XIV)	-CH ₂ CH ₂ SOC ₄ H ₉	CH ₃	-OCH ₂ CH ₂ SOC ₄ H ₉	Н
(XV)	CH ₃	CH ₃	-OCH ₂ CH ₂ SOC ₄ H ₉	Н
(XVI)	CH ₃	CH ₃		CH ₃
(XVII)	CH ₃	CH ₃	S ^{CH3} O O O	CH3

	СО	X-1	COX-2		
Соединение или препарат	свободная энергия связывания, ккал/моль	количество докинг- решений в первом кластере	свободная энергия связывания, ккал/моль	количество докинг- решений в первом кластере	
(I)	-4.70	9	-4.60	10	
(II)	-5.05	8	-4.90	11	
(III)	-5.04	8	-4.90	8	
(IV)	-5.87	11	-6.71	10	
(V)	-5.00	10	-6.03	6	
(VI)	-6.20	9	-5.76	10	
(VII)	-6.01	9	-6.28	12	
(VIII)	-5.89	11	-5.78	12	
(IX)	-6.03	10	-6.42	12	
(X)	-6.53	10	-6.88	13	
(XI)	-6.51	9	-6.56	13	
(XII)	-4.00	8	-6.66	12	
(XIII)	-4.00	8	-3.90	9	
(XIV)	-6.09	10	-7.15	10	
(XV)	-6.31	10	-6.22	5	
(XVI)	-8.45	12	-9.67	10	
(XVII)	-7.98	10	-9.58	8	
Целекоксиб	-10.01	12	-10.27	20	
SC-558	_	_	-10.09	20	
Диклофенак	-8.41	14	-7.55	10	
Флурбипрофен	-8.01	19	_	_	
Арахидоновая кислота	-5.80	10	-6.45	10	

Таблица 2. Результаты докинга активных центров СОХ-1 и СОХ-2

сходства они позиционируются в активных центрах данных ферментов в том же кластере, что и структуры действующего вещества НПВП Целекоксиб и соединения SC-558 (рис. 2). Кроме того, анализ данных табл. 3 позволяет заключить, что оба соединения-лидера будут преимущественно ингибировать каталитическую активность COX-2, и, следовательно, не исключено, что в доклинических испытаниях они могут обнаружить наряду с противовоспалительным выраженный кардиотоксический эффект.

Остальные лиганды, содержащие ациклические сера- и кислородсодержащие заместители в положениях R_1 , R_2 и R_3 , образуют меньшее число водородных связей (преимущественно с Arg120, Met522 и Val523) по сравнению с соединениями (XVI) и (XVII) и характеризуются низкими значениями оценочной функции. Следует ожидать,

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 48 № 5 2022



Рис. 1. Позиционирование соединений (XVI) и (XVII) в активном центре COX-1 (a) и COX-2 (б).



Рис. 2. Структуры референсных ингибиторов изоформ СОХ-1 и СОХ-2.

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 48 № 5 2022

Соединение	IC ₅₀ , мкМ	
COX-1		
(XVI)	95.5 ± 3.4	
(XVII)	1.0 ± 0.1	
COX-2		
(XVI)	~60.4 ± 7.9	
(XVII)	11.7 ± 4.6	

Таблица 3. Влияние конъюгатов (XVI) и (XVII) на активность COX-1 и COX-2

что в условиях *in vivo* они могут не обнаружить противовоспалительного действия и по этой причине в дальнейшем не рассматривались. Таким образом, результаты оценки стерической комплементарности и аффинности соединений (**XVI**) и (**XVII**) к активным центрам изоформ COX свидетельствуют о том, что оба соединения перспективны для дальнейших исследований *in vivo*. Мы осуществили синтез этих соединений и провели испытания их противовоспалительной активности *in vivo*.

Синтез хлорангидридов N-фталоилзащищенных аминокислот с 5-гидрокси-1,3,6-триметилурацилом. Конъюгаты 5-гидрокси-1,3,6-триметилурацила с аминокислотами аланином и метионином (XVI) и (XVII) были получены ацилированием 5-гидрокси-1,3,6-триметилурацила хлорангидридами соответствующих N-фталимидзащищенных аминокислот. Реакцию проводили в хлористом метилене CH₂Cl₂ в присутствии K₂CO₃ при комнатной температуре (схема 1).



 $(XVI): R = CH_3 (98\%)$ (XVII): R = CH₂CH₂SCH₃ (96%)

Схема 1. Получение конъюгатов 5-гидрокси-1,3,6-триметилурацила с *N*-фталоил-защищенными аминокислотами.

Индивидуальность синтезированных соединений подтверждена методом тонкослойной хроматографии, структуры синтезированных соединений доказаны на основании спектральных данных. Так, в спектре ¹Н-ЯМР всех полученных соединений, зарегистрированных в дейтерированном хлороформе, наблюдается появление сигналов протонов ароматического ядра фталильной группы в области 7.74 и 7.86 м.д., сигнала протона метиленовой группы в области 5.2 м.д. Исчезновение сигналов протона ОН-группы доказывает образование продуктов реакции.

Противовоспалительная активность соединений (XVI) и (XVII). Противовоспалительная активность соединений (XVI) и (XVII) была изучена *in vivo* на белых мышах обоих полов в сравнении с Ортофеном (лекарственным препаратом противовоспалительного действия, входящим в число жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств) на четырех моделях воспаления, вызванного введением формалина, каррагинана, яичного белка и лидокаина. Результаты этих исследований приведены в табл. 4. Полученные данные позволяют заключить, что конъюгаты (XVI) и (XVII) обладают выраженным противовоспалительным эффектом в дозе 50 мг/кг и по эффективности противовоспалительного действия сопоставимы с Ортофеном на всех моделях воспаления.

Изоэнзим-специфического ингибирование COX-1 и COX-2. Как известно, COX-1 участвует в регуляции клеточного гомеостаза. COX-2 регулирует биосинтез простагландинов при остром воспалении и служит ключевым ферментом противовоспалительной активности для НПВП. Для оценки селективности действия соединений (XVI) и (XVII) в отношении изоформ COX-1 и COX-2 использовали коммерческий набор COX Fluorescent Inhibitor Screening Assay Kit (Cayman Chemical, CША), позволяющий оценить ингибирование двух изоформ фермента во внеклеточной системе. Согласно полученным данным, для соединения (XVI) в концентрации 0.1, 1, 10 и 100 мкМ обнаружено концентрационно-зависимое снижеТаблица 4. Противовоспалительная активность конъюгатов (XVI) и (XVII) *in vivo* на разных моделях воспаления

Соединение или препарат	Увеличение отека лапок, %	Угнетение воспаления, %
1) Каррагинановая модель		
(XVI)	37.9 ± 3.2	29.0
(XVII)	38.5 ± 5.0	27.9
Ортофен	36.8 ± 1.2	31.1
Контроль	53.4 ± 4.5	_
2) Лидокаиновая модель		
(XVI)	36.9 ± 3.4	32.3
(XVII)	38.2 ± 1.8	29.9
Ортофен	38.1 ± 1.5	30.1
Контроль	54.5 ± 5.0	_
3) Белковая модель		
(XVI)	43.4 ± 2.1	36.3
(XVII)	44.2 ± 4.1	35.1
Ортофен	40.2 ± 4.0	41.0
Контроль	68.2 ± 5.7	_
4) Формалиновая модель		
(XVI)	37.2 ± 2.0	35.0
(XVII)	38.6 ± 3.5	32.6
Ортофен	33.3 ± 2.7	42.0
Контроль	57.3 ± 3.5	_

Примечание: соединения (XVI) и (XVII) вводили в концентрации 50 мг/кг, лекарственный препарат Ортофен – в концентрации 25 мг/кг.

ние активности COX-1; при концентрации соединения (**XVI**) 95.5 \pm 3.4 мкМ установлено ингибирование фермента на 50%. Зависимый от концентрации эффект в отношении COX-1 показан и для конъюгата (**XVII**), который уже в концентрации 1.0 \pm 0.1 мкМ на 50% ингибирует работу фермента. Кроме того, соединение (**XVI**) в концентрации 60.4 \pm 7.9 мкМ, а соединение (**XVII**) в концентрации 11.7 \pm 4.6 мкМ в 2 раза ингибируют активность COX-2 (табл. 3). Следовательно, селективность в отношении изоформ COX-2/COX-1 для соединения (**XVII**) составляет 0.63, для соединения (**XVII**) – 11.7, для диклофенака – 0.68 [34].

Таким образом, соединения (XVI) и (XVII) перспективны для дальнейших доклинических испытаний в условиях *in vivo* с целью разработки на их основе потенциальных лекарственных средств с выраженным противовоспалительным действием и повышенной избирательностью ингибирующего действия в отношении COX-1 и COX-2.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование. Анализ структур синтезированных соединений выполняли на оборудовании ЦКП "Химия" Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН. Спектры ¹Н- и ¹³С-ЯМР (б, м.д.) регистрировали на импульсных спектрометрах АМХ-300 (Bruker, Германия) с рабочей частотой 300.13 МГц (¹Н) и 75.47 МГц (¹³С) при постоянной температуре образца 298 К в CDCl₃. Внутренний стандарт – тетраметилсилан (ТМС). Оптическую активность измеряли на поляриметре 241 MC (Perkin-Elmer, США) в трубке длиной 1 дм. Температуру плавления определяли на микростолике Boetius (Nagema, Германия). Тонкослойную хроматографию проводили на пластинах Sorbfil ПТСХ-АФ-В (ЗАО "Сорбполимер", Краснодар, Россия), используя систему растворителей CHCl₃-EtOH 9 : 1. Пятна веществ обнаруживали парами иода, нингидриновым проявителем. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле MN Kieselgel 60 (Macherey-Nagel, Германия).

Молекулярный докинг. Молекулярный докинг структур производных пиримидина (I-XVII) с активными центрами изоформ СОХ проводили с использованием программы AutoDock 4.2 (Scripps Research, США). В качестве моделей белков СОХ-1 и СОХ-2 выбрали, соответственно, цепи В и А макромолекул с кодами 3n8x и 1pxx в банке данных белков PDB (http://www.rcsb.org). Молекулы белков в ходе расчетов были жесткими, в то время как молекулы лигандов - подвижными. Размер трехмерного бокса, в котором проводили молекулярный докинг лигандов, во всех случаях составлял 50 шагов с разметкой шага 0.375 Å. За центр бокса принимали положение естественного субстрата данных ферментов арахидоновой кислоты и структур референсных ингибиторов изоформ СОХ, представляющих собой активные компоненты нестероидных НПВП Целекоксиб, Флурбипрофен, Диклофенак и соединения SC-558 (рис. 1). Поиск биологически активных конформаций осуществляли на основе ламарковского генетического алгоритма с параметрами по умолчанию, за исключением угла вращения вокруг ординарных связей и вращательного движения молекул, которые были равны 30°. Решения докинга кластеризовали на основе величины RMSD = 2.0 Å. Оценку эффективности связывания лигандов (**I**–**XVII**) с белками проводили по полуэмпирической оценочной функции, заложенной в программе AutoDock 4.2 (http://autodock.scripps.edu/), при наложении силового поля AMBER [35].

Общая методика получения конъюгатов (XVI) и (XVII). К раствору 0.17 г (0.001 моль) 5-гидрокси-1,3,6-триметилурацила в 10 мл сухого хлористого метилена присыпали 0.14 г (0.0015 моль) K_2CO_3 . Затем при перемешивании без доступа влаги в реакционную смесь добавляли 0.0015 моль хлорангидридов соответствующих *N*-фталиламинокислот в 10 мл сухого хлористого метилена. Реакционную смесь выдерживали с перемешиванием при 20–22°С в течение 24 ч. Образовавшиеся продукты в виде осадка отфильтровывали. Затем фильтрат упаривали в вакууме водоструйного насоса. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя хлороформом.

1,3,6-Триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил-*N*-фталилаланинат (XVI). Бежевое кристаллическое вещество. Выход 360 мг (98%), т. пл. 312°С (ЕtOH). Спектр ¹Н-ЯМР: 1.79 (д, 3H, CH-<u>CH₃</u>); 2.18 (с, 3H, C6-<u>CH₃</u>); 3.13 (с, 3H, N1-C<u>H₃</u>); 3.42 (с, 3H, N3-C<u>H₃</u>); 5.81 (д, 1H, C<u>H</u>); 7.58 (t, 1H, C2(Ar)-<u>H</u>); 7.58 (t, 1H, C3(Ar)-<u>H</u>); 7.81 (t, 1H, C1(Ar)-<u>H</u>); 7.81 (t, 1H, C4(Ar)-<u>H</u>). Спектр ¹³С-ЯМР: 12.60 (C6-<u>C</u>H3); 15.01 (CH<u>C</u>H₃); 28.68 (N3-<u>C</u>H₃); 31.91 (N1-<u>C</u>H₃); 54.69 (<u>C</u>HCH₃); 110.46 (<u>C5</u>); 123.57 (C1(Ar)); 123.57 (C4(Ar)); 132.53 (C5(Ar)); 132.53 (C6(Ar)); 133.90 (C2(Ar)); 133.90 (C3(Ar)); 146.86 (<u>C2</u>=O); 157.85 (<u>C4</u>=O); 166.77 (<u>2C</u>=O); 169.42 (<u>C6</u>); 180.11 (<u>C</u>=O).

1,3,6-Триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил-*N*-фталилметионинат (XVID. Темно-бежевое кристаллическое вещество. Выход 451 мг (96%), т. пл. >320°С (ЕtOH). Спектр ¹Н-ЯМР: 2.08 (с, 3Н, S-С<u>Н</u>₃); 2.43 (м, 2Н, СH(CH₂)SCH₃); 2.51 (м, 2H, CH(CH₂)SCH₃); 2.66 (c, 3H, C6-CH₃); 3.11 (c, 3H, N1-CH₃); 3.26 (c, 3H, N3-CH₃); 6.86 (M, 1H, CH(CH₂)SCH₃); 7.53 (t, 1H, C2(Ar)-H; 7.53 (t, 1H, C3(Ar)-H); 7.84 (t, 1H, С1(Ar)-<u>H</u>); 7.84 (t, 1H, С4(Ar)-<u>H</u>). Спектр ¹³С-ЯМР: 14.08 (CH(CH₂)S<u>C</u>H₃); 18.51 (<u>С6</u>); 27.80 (N3-<u>CH₃</u>); 29.04 (CH(<u>CH₂</u>)SCH3); 29.36 (N1- \underline{CH}_3 ; 30.63 $(CH(\underline{C}H_2)SCH_3);$ 56.23 $(\underline{CH}(CH_2)SCH_3); 110.27 (\underline{C5}); 123.68 (C1(Ar));$ 123.68 (C4(Ar)); 131.41 (C5(Ar)); 133.00 (C2(Ar)); 133.00 (C3(Ar)); 148.40 (<u>C2</u>=O); 157.65 (<u>C4</u>=O); 169.32 (<u>2C</u>=O); 168.96 (<u>C6</u>); 181.81 (C=O).

Противовоспалительная активность соединений (XVI) и (XVII). Противовоспалительную активность конъюгатов (XVI) и (XVII) в сравнении с Ортофеном изучали *in vivo* на четырех моделях воспаления, вызванного введением каррагинана, лидокаина, яичного белка и формалина [36].

Опыты проводили на белых мышах Mus albus officinarum обоего пола (n = 96) (возраст 30 дней, масса 18-20 г, получены из питомника факультета биотехнологий и ветеринарной медицины ФГБОУ ВО "Башкирский государственный аграрный университет"), разделенных на 16 групп по 6 животных в каждой. Каррагинановое, лидокаиновое, белковое и формалиновое воспаление у мышей вызывали субплантарным введением 50 мкл флогогена (патогенного раздражителя, вызывающего воспалительную реакцию) – 1%ного раствора каррагинана, 2%-ного раствора лидокаина, 15%-ного раствора яичного белка, 2%ного раствора формалина – в переднюю левую лапку. Антифлогистическую активность исследуемых соединений оценивали по угнетению отека воспаленной лапки мышей, вызванного введением флогогена. Соединения (XVI) и (XVII), а также Ортофен в указанных концентрациях (табл. 4) вводили внутрижелудочно в объеме 300 мкл за 1 ч до введения флогогена, сразу после введения флогогена и далее через 1 и 2 ч после введения флогогена. Животным контрольной группы по той же схеме вместо исследуемых веществ вводили физиологический раствор. Величину отека лапок измеряли онкометрически [37] через 3 ч после введения флогогена.

Противовоспалительную активность рассчитывали по формуле:

Угнетение воспаления (%) = $(V_{\kappa} - V_0) \times 100$,

где $V_{\rm k}$ — среднее увеличение объема лапки в контрольной группе, V_0 — среднее увеличение объема лапки в опытной группе животных.

Изоэнзим-специфическое ингибирование COX-1 и COX-2. Метод определения изоэнзим-специфического ингибирования COX-1 и COX-2 с помощью набора COX Fluorescent Inhibitor Screening Assay Kit (Cayman Chemical, США) основан на реакции превращения арахидоновой кислоты в нестабильный простагландин G2 (PGG2). Образовавшийся PGG2 реагирует с флуоресцентным субстратом (ADHP), превращая последний в резоруфин. Резоруфин обладает высокой флуоресцентной активностью, которая детектируется при 535–590 нм.

Валидацию набора COX Fluorescent Inhibitor Screening Assay Kit проводили с помощью ингибиторов COX-1 (SC-560) и COX-2 (DuP-697), поставляемых в наборе. При концентрации, равной IC₅₀, данные соединения показали ~50%-ное ингибирование ферментов: (54.38 ± 0.62)% для SC-560 (кат. № 760159, ингибитор COX-1, IC₅₀ = 5 нМ) и

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 48 № 5 2022
(57.38 ± 8.23)% для DuP-697 (кат. № 760158, ингибитор COX-2, IC₅₀ = 25 нМ). Процент ингибирования ферментов при инкубации с соединениями (XVI) и (XVII) рассчитывали по формуле:

Ингибирование (%) =

= ((Базовая активность фермента – Активность фермента в опытной группе) Базовая активность фермента) × 100.

Базовая активность фермента — 0 мкМ соединения. Селективность в отношении COX-2 или COX-1 рассчитывали по соотношению IC_{50} соединения для данных изоформ.

Воздействие изучаемых соединений на активность COX-1 и COX-2 оценивали в трех независимых экспериментах. Среднее арифметическое по общей выборке данных и стандартную ошибку среднего (SEM) находили с помощью модуля описательной статистики в программе Statistica 6.1 (StatSoft. Inc., США). Расчет IC₅₀ активности ферментов проводили с помощью модуля нелинейной регрессии с использованием логарифма концентраций и нормализованных значений процента ингибирования (log(inhibitor) vs. response) в программе GraphPad Prism (версия 10; GraphPad Software Inc., США).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании результатов вычислительных экспериментов с использованием программы AutoDock 4.2, реализующей базовые принципы метода молекулярного докинга, из 17 протестированных производных урацила с циклическими и ациклическими сера- и кислородсодержащими заместителями в пиримидиновом цикле для синтеза отобраны два соединения-лидера (XVI) и (XVII), которые теоретически могут быть эффективными ингибиторами обеих форм СОХ, а следовательно, обладать выраженным противовоспалительным действием in vivo. Эти соединения представляют собой конъюгаты 5-гидрокси-1,3,6-триметилурацила с *N*-фталил-L-аминокислотами. Сравнительный анализ свободных энергий связывания, рассчитанных с использованием скоринг-функции AutoDock 4.2, позволил предположить, что оба этих соединения будут отличаться повышенной селективностью действия в отношении СОХ-2. Хлорангидридным методом осуществлен синтез соединений (XVI) и (XVII), методом хроматографии доказана индивидуальность полученных соединений, структура соединений подтверждена с помощью ЯМР. В результате биологических испытаний in vivo на мышах на четырех моделях воспаления, вызванного введением каррагинана, лидокаина, яичного белка и

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 48 № 5 2022

формалина, показано, что полученные конъюгаты (XVI) и (XVII) действительно обладают выраженной противовоспалительной активностью, сопоставимой с лекарственным препаратом Ортофеном. Однако результаты оценки изоэнзимспецифического ингибирования ферментов изоформ СОХ свидетельствуют о том, что только соединение (XVII) оказалось селективным ингибитором COX-2, в то время как соединение (XVI) характеризуется повышенной селективностью действия в отношении COX-1 и, следовательно, в клинических условиях может обнаружить выраженный гастро- и нефротоксический эффект. Оба соединения перспективны для дальнейших исследований в качестве потенциальных противовоспалительных лекарственных средств.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-73-20073) и госзаданий Уфимского института химии ФГБНУ "Уфимский федеральный научно-исследовательский центр" РАН № 122031400278-2 и 122031400274-4.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Grabovskiy S.A., Murinov Yu.I., Kabal'nova N.N. // Curr. Org. Chem. 2012. V. 16. P. 2389–2393. https://doi.org/10.2174/138527212803520056
- Мышкин В.А., Ибатуллина Р.Б., Савлуков А.И., Бакиров А.Б., Сергеева С.А. // Антиоксидантные эффекты производных пиримидина и бензимидазола при острых отравлениях. Уфа: ООО ПКП "ДАР", 2003.
- 3. Мышкин В.А., Бакиров А.Б. // Экспериментальная коррекция химических поражений печени произ-

водными пиримидина. Уфа: ООО ПКП "ДАР", 2002.

- Камилов Ф.Х., Лазарева Д.Н., Плечев В.В. // Пиримидины и их применение в медицине. Уфа: Изд. БГМИ, 1992.
- 5. Лазарева Д.Н., Алехин Е.К., Плечев В.В., Тимербулатов В.М., Плечева Д.В. // Иммурег. Уфа: Изд-во БГМУ, НПО Башбиомед, 2004.
- Кривоногов В.П., Толстиков Г.А., Муринов Ю.И., Куковинец А.Г., Шакирова А.М., Сорокина Г.А., Селезнев Л.Г., Витвицкая А.С., Бриль А.С., Казаков В.П., Караваев А.Д., Зарудий Ф.С., Лазарева Д.Н., Комиссаров В.Д., Ахунов И.Р. // Патент RU2000298C1, опубл. 07.09.1993.
- Isobe Y., Tobe M., Inoue Y., Isobe M., Tsuchiya M., Hayashi H. // Bioorg. Med. Chem. 2003. V. 11. P. 4933– 4940. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2003.09.012
- 8. *Curtis-Prior P.* // The Eicosanoids. John Wiley & Sons.
- Chichester, 2004.
- Dennis E.A. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 13057– 13060.
- Samy R.P., Gopalakrishnakone P., Chow V.T.K. // Bioinformation. 2012. V. 8. P. 4857. https://doi.org/10.6026/97320630008048
- Flower R.J., Blackwell G.J. // Nature. 1979. V. 278. P. 456–459. https://doi.org/10.1038/278456a0
- Henderson W.R., Oslund R.C., Bollinger J.G., Ye X., Tien Y.T., Xue J., Gelb M.H. // J. Biol. Chem. 2011. V. 286. P. 28049–28055. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.235812
- Berg O.G., Gelb M.H., Tsai M.D., Jain M.K. // Chem. Rev. 2001. V. 101. P. 2613–2654. https://doi.org/10.1021/cr990139w
- Farooqui A.A., Ong W.-Y., Horrocks L.A. // Pharm. Rev. 2006. V. 58. P. 591–620. https://doi.org/10.1124/pr.58.3.7
- Ong W.Y., Farooqui T., Kokotos G., Farooqui A.A. // ACS Chem. Neurosci. 2015. V. 6. P. 81431. https://doi.org/10.1007/s12035-020-02093-z
- 16. *Sapolsky R.M.* // J. Neurosci. 1986. V. 6. P. 2240–2244. https://doi.org/10.1523/jneurosci.06-08-02240.1986
- Mruwat R., Cohen Y., Yedgar S. // Imunnotherapy. 2013. V. 5. P. 315–317. https://doi.org/10.2217/imt.13.18
- Zarghi A., Arfaei S. // Iran. J. Pharm. Res. 2011. V. 10. P. 655–683.
- Marnett L.J. // Cancer Prev. Res. (Phyla). 2009. V. 2. P. 288–290. https://doi.org/10.1158/1940-6207.capr-09-0033
- Smith W.L., DeWitt D.L., Garavito R.M. // Annu. Rev. Biochem. 2000. V. 69. P. 145–182. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.145
- Greenhough A., Smartt H.J.M., Moore A.E., Roberts R.R., Williams A.C., Kaidi C.P.A. // Carcinogenesis. 2009. V. 30. P. 377–386. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.01.016

- Charlier C., Michaux C. // Eur. J. Med. Chem. 2003.
 V. 38. P. 645–659. https://doi.org/10.1016/s0223-5234(03)00115-6
- 23. Vane J.R., Bakhle Y.S., Botting R.M. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1998. V. 38. P. 97–120. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.38.1.97
- 24. Cha Y.I., DuBois R.N. // Annu. Rev. Med. 2007. V. 58. P. 239–252. https://doi.org/10.1146/annurev.med.57.121304.131253
- Khairullina V.R., Gerchikov A.Ja., Taipov I.A., Boegel H., Zarudii F.S. // Pharm. Chem. J. 2011. V. 45. P. 539546. https://doi.org/10.1007/s11094-011-0675-y
- Khairullina V.R., Taipov I.A., Gerchikov A.Ja., Zarudii F.S. // Pharm. Chem. J. 2012. V. 46. P. 553–564. https://doi.org/10.1007/s11094-012-0846-5
- 27. Хайруллина В.Р., Герчиков А.Я., Зарудий Ф.С. // Вестник Башкирского университета. 2014. № 19. С. 417422.
- Sliwoski G., Kothiwale S., Meiler J., Lowe E.W. // Pharmacol. Rev. 2014. V. 66. P. 334–395. https://doi.org/10.1124/pr.112.007336
- Jansen J.M., Amaro R.E., Cornell W., Tseng Y.Ja., Walters W.P. // Future Med. Chem. 2014. V. 4. P. 1893– 1896. https://doi.org/10.4155/fmc.12.137
- Khayrullina V.R., Gerchikov A.Ya., Lagunin A.A., Zarudii F.S. // Biochemistry (Mosc.). 2015. V. 80. P. 74–86. https://doi.org/10.1134/s0006297915010095
- Gerchikov A. Ya., Vasil'ev M.N., Khayrullina V.R., Tsypysheva I.P., Zarudii F.S. // Pharm. Chem. J. 2015. V. 49. P. 582–586. https://doi.org/10.1007/s11094-015-1333-6
- Khayrullina V.R., Taipov I.A., Gerchikov A.Ya., Vasil'ev M.N., Zarudii F.S., Boegel H. // Pharm. Chem. J. 2014. V. 48. P. 317–322. https://doi.org/10.1007/s11094-014-1102-y
- 33. Кривоногов В.П., Толстиков Г.А., Муринов Ю.И., Зарудий Ф.С., Лазарева Д.Н., Исмагилова А.Ф., Волкова С.С., Сахаутдинова Г.М., Афзалетдинова Н.Г., Хисамутдинов Р.А., Спирихин Л.В., Кривоногова И.М. // Хим.-фарм. журнал. 1993. Т. 27. С. 41–44.
- *Тринус* Ф.П., *Мохорт Н.А., Клебанов Б.М.* // Нестероидные противовоспалительные средства. Киев: Здоров'я, 1975.
- 35. Wang J., Wolf R.M., Caldwell J.M., Kollman P.A., Case D.A. // J. Comp. Chem. 2004. V. 25. P. 1157– 1174. https://doi.org/10.1002/jcc.20035
- 36. Dannhardt G., Kiefer W. // Eur. J. Med. Chem. 2001. V. 36. P. 109–126. https://doi.org/10.1016/s0223-5234(01)01197-7
- Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. 2-изд., перераб. и доп. М.: ОАО Изд-во "Медицина", 2005.

578

Synthesis and Investigation of Anti-Inflammatory Activity of New Pyrimidine Derivatives – Inhibitors of Cyclooxygenase Isoforms

Y. Z. Khazimullina^{*, #}, A. R. Gimadieva^{*}, V. R. Khairullina^{**}, L. F. Zainullina^{***}, Y. V. Vakhitova^{***}, and A. G. Mustafin^{*, **}

[#]*Phone:* +7 (987) 476-49-00; e-mail: yulialion91@mail.ru

*Ufa Institute of Chemistry—Separate Structural Subdivision of the Federal State Budgetary Scientific Institution of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, prosp. Oktyabrya 71, Ufa, 450054 Russia **Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Bashkir State University, ul. Zaki Validi 32, Ufa, 450076 Russia

***Institute of Biochemistry and Genetics—Separate Structural Subdivision of the Federal State Budgetary Scientific Institution of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, prosp. Oktyabrya 71, Ufa, 450054 Russia

The molecular docking method was used to simulate the complexation of 17 uracil derivatives with cyclic and acyclic sulfur- and oxygen-containing substituents in the pyrimidine cycle, with active centers of cyclooxygenase isoforms (COX). From the set of tested compounds, 2 hit compounds were identified, which are conjugates of 5-hydroxy-1,3,6-trimethyluracil with *N*-phthalyl-L-amino acids, which can be effective inhibitors of cyclooxygenase isoforms with increased selectivity of action against the enzyme cyclooxygenase-2, induced during inflammatory processes in the body. The synthesis of these compounds by the chlorohydride method was carried out, the individuality of the substances obtained by nuclear magnetic resonance was proved and their biological tests were carried out in vivo on models of inflammation caused by carrageenan, lidocaine, egg white and formalin. It was found that conjugates of 5-hydroxy-1,3,6-trimethyluracil with *N*-phthalylalanine and *N*-phthalylmethionine have pronounced anti-inflammatory activity and are comparable to Orthophene in terms of the effectiveness of anti-inflammatory action. The evaluation of the isoenzyme-specific inhibition of enzymes-isoforms of NOX, which revealed the pronounced anti-inflammatory activity of the compounds obtained.

Keywords: 5-hydroxy-1,3,6-trimethyluracil, natural amino acids, molecular docking, anti-inflammatory activity, isoforms of cyclooxygenase (COX-1/COX-2), steric complementarity, affinity

УДК 577.113.4

НОВЫЙ ПОДХОД К СИНТЕЗУ ФОТОБЛОКИРОВАННЫХ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК ДЛЯ АКТИВИРУЕМОЙ СВЕТОМ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

© 2022 г. Е. А. Ахметова*, Д. В. Ким*, А. С. Доме*, М. И. Мещанинова*, Д. С. Новопашина*, **,#

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Россия, 630090 Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8 **Новосибирский государственный университет, Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2 Поступила в редакцию 09.12.2021 г. После доработки 20.12.2021 г. Принята к публикации 28.12.2021 г.

Фоторегулируемые системы – интересный и перспективный инструмент воздействия на экспрессию генов. В данной работе предложен подход к синтезу фоторегулируемых малых интерферирующих РНК (siPHK) для активируемой светом РНК-интерференции. siPHK временно блокируют путем введения на 5'-концы цепей siPHK объемных лигандов через фоторасщепляемый линкер. Введение осуществляют путем активации концевой гидроксильной группы дисукцинимидилкарбонатом с последующим взаимодействием с аминосодержащим лигандом. В качестве функциональных лигандов использованы аминопроизводное холестерина и трилейцин. Продемонстрировано эффективное отщепление группировки, введенной через фоторащепляемый линкер, путем облучения УФ-светом. С использованием предложенного подхода получены siPHK, содержащие остатки холестерина на 5'-конце антисенс- и/или сенс-цепи и направленные на мРНК EGFP (усиленного зеленого флуоресцентного белка). Продемонстрирована возможность фотоактивируемого ингибирования экспрессии гена *EGFP* в клетках HEK293FT, стабильно экспрессирующих этот белок.

Ключевые слова: фоторасщепляемый линкер, фотоактивируемые siPHK, холестериновые конъюгаты, зеленый флуоресцентный белок

DOI: 10.31857/S0132342322050037

ВВЕДЕНИЕ

Неинвазивная регуляция путем облучения светом определенной длины волны позволяет эффективно управлять активностью различных молекулярно-биологических систем *in vitro* и *in vivo*. Введение светочувствительных молекул в состав олигонуклеотидов или белков позволяет изменять их активность в клетках с высоким пространственно-временным разрешением.

Для временного блокирования функций олигонуклеотидов, в том числе малых интерферирующих РНК (siPHK), используют функциональные группировки, введенные посредством фоторасщепляемого линкера в состав олигонуклеотида. Для синтеза таких конструкций чаще всего используют твердофазный фосфитамидный метод с последовательным присоединением фосфитамида фоторасщепляемого линкера и фосфитамида функциональной группировки на 5'-конец. Такие конъюгаты могут выступать в качестве фотоблокированных олигонуклеотидных конструкций, которые могут быть активированы в определенный момент времени. siPHK, содержащие лиганды, введенные посредством фоторасщепляемого линкера, широко применяются в фотоконтролируемой PHK-интерференции [1–4].

Цель данного исследования — разработка нового подхода к синтезу фоторегулируемых siPHK, содержащих введенные через фоторасщепляемый линкер функциональные группировки, для активируемой светом PHK-интерференции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе предложен новый подход к синтезу конъюгатов олигонуклеотидов, заключа-

Сокращения: NMP – *N*-метилпирролидинон; ДСК – *N*,*N*-дисукцинимидилкарбонат; DIPEA – *N*,*N*-диизопропилэтиламин; ESI – ионизация распылением в электрическом поле; EGFP – усиленный зеленый флуоресцентный белок (enhanced green fluorescent protein); siPHK – малые интерферирующие PHK.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (343) 363-51-29; эл. почта: danov@niboch.nsc.ru).

ФОТОБЛОКИРОВАННЫЕ МАЛЫЕ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ РНК



Рис. 1. Схема синтеза конъюгатов олигорибонуклеотидов с холестерином и трилейцином. Ваsе – азотистое основание, Oligo – олигонуклеотид.

ющийся во введении через фоторасщепляемый линкер функциональных группировок на 5'-конец полимерсвязанного олигорибонуклеотида путем активации концевой гидроксильной группы N, N-дисукцинимидилкарбонатом с последующим взаимодействием с аминопроизводным. В качестве функциональных лигандов использовали холестерин и трилейцин. Проверку работоспособности метода проводили на антисенс-цепи siPHK к мPHK гена MDR1, последовательность которой была взята из работы Кругловой с соавт. [5]. Данная РНК содержала несколько замен пиримидиновых рибонуклеотидов на 2'-О-метилрибонуклеотиды для повышения стабильности siPHK к нуклеазам. На первом этапе твердофазным амидофосфитным методом получали полимерсвязанный олигорибонуклеотид RNA1 с использованием на последней стадии специально полученного фотолабильного синтона на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола [6]. Затем на твердой фазе присоединяли остатки холестерина или трилейцина. Для этого использовали недавно разработанный нами метод активации свободной гидроксильной группы олигонуклеотида N,N-дисукцинимидилкарбонатом с последующей реакцией с аминопроизводными [7] (рис. 1).

Аминопроизводное холестерина получали взаимодействием холестерилхлорформиата с гексаметилендиамином в хлористом метилене в присутствии триэтиламина [7]. Структуры полученных конъюгатов олигорибонуклеотида RNA1 представлены в табл. 1.

Полученные конъюгаты деблокировали в стандартных условиях. По данным аналитического гель-электрофореза в денатурирующем 15%-ном ПААГ, степень превращения олигинуклеотида в конъюгаты можно оценить как 50–60%, подвижность конъюгатов в геле была значительно ниже, чем подвижность контрольных немодифицированных олигорибонуклеотидов, а также

Таблица 1. Фотолабильные конъ	югаты олигорибонуклеотидов
-------------------------------	----------------------------

Шифр	Структура олигорибонуклеотида
RNA	5'-GGCUU ^m GAC ^m AAGUU ^m GU ^m AU ^m AU ^m GG-3'
RNA1	5'-PL-GGCUU ^m GAC ^m AAGUU ^m GU ^m AU ^m AU ^m GG-3'
RNA1-Chol	5'-Chol-PL-GGCUU ^m GAC ^m AAGUU ^m GU ^m AU ^m AU ^m GG-3'
RNA1-Leu ₃	5'-(Leu) ₃ - <i>PL</i> -GGCUU ^m GAC ^m AAGUU ^m GU ^m AU ^m AU ^m GG-3'

Примечание: N – рибонуклеотид, N^m – 2'-*О*-метилрибонуклеотид, *PL* – фоторасщепляемый линкер на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола, Chol – аминопроизводное холестерина, (Leu)₃ – трилейцин.



RNA1 5'-GGCUU^mGAC^mAAGUU^mGU^mAU^mAU^mGG-3'

Рис. 2. Отщепление функциональной группы от олигорибонуклеотида под действием УФ-света. R – аминопроизводное холестерина или трилейцин, Base – азотистое основание.

5'-модифицированных олигонуклеотидов, содержащих фотоактивируемую группу.

Конъюгаты выделяли методом гель-электрофореза в 12%-ном ПААГ. Были получены конъюгаты олигорибонуклеотида RNA1 с холестерином и трилейцином, введенными с использованием фоторасщепляемого линкера, а также контрольный немодифицированный олигорибонуклеотид и его аналог, несущий на 5'-конце фотоотщепляемую группу.

Для исследования способности расщепляться под воздействием ультрафиолетового излучения растворы олигорибонуклеотидов облучали в течение 30 мин ($\lambda = 365$ нм), полученные реакционные смеси анализировали методами офВЭЖХ и гель-электрофореза в 15%-ном ПААГ.

Результаты исследования кинетики расщепления конъюгатов олигорибонуклеотида RNA1 (RNA1-Chol и RNA1-Leu₃) получали путем анализа аликвот раствора олигонуклеотида, облученных определенное время, в 15%-ном ПААГ с окрашиванием геля после электрофореза бромистым этидием (рис. 2).

Реакция проходит по описанному ранее [8] механизму с высвобождением немодифицированного олигорибонуклеотида. При отщеплении функциональной липофильной группы, холестерина или трилейцина, подвижность продукта в геле увеличивается и соответствует контрольному олигорибонуклеотиду RNA1. При исследовании кинетики отщепления функциональных группировок от олигорибонуклеотида (рис. 3) была выявлена более высокая эффективность отщепления трилейцина по сравнению с холестерином. Времена полуреакции для конъюгата с трилейцином и конъюгата с холестерином составили 0.8 и 1.5 мин соответственно.

Таким образом, нами была продемонстрирована возможность отщепления функциональных



Рис. 3. Кинетические кривые отщепления холестерина и трилейцина при облучении конъюгатов RNA1-Leu₃ и RNA1-Chol.

Шифр	Тип цепей	Последовательности siPHK
siRNA1	AS/S	5'-GGCAAGCUGACCCUGAAGUdTdT-3' 3'-dTdTCCGUUCGACUGGGACUUCA-5'
siRNA2	AS-Chol/S-Chol	5'-Chol-GGCAAGCUGACCCUGAAGUdTdT-3' 3'-dTdTCCGUUCGACUGGGACUUCA-Chol-5'
siRNA3	AS-PL-Chol/S-PL-Chol	5'-Chol- <i>PL</i> -GGCAAGCUGACCCUGAAGUdTdT-3' 3'-dTdTCCGUUCGACUGGGACUUCA- <i>PL</i> -Chol-5'
siRNA4	AS/S-Chol	5'-GGCAAGCUGACCCUGAAGUdTdT-3' 3'-dTdTCCGUUCGACUGGGACUUCA-Chol-5'
siRNA5	AS-Chol/S	5'-Chol-GGCAAGCUGACCCUGAAGUdTdT-3' 3'-dTdTCCGUUCGACUGGGACUUCA-5'
siRNA6	AS/S-PL-Chol	5'-GGCAAGCUGACCCUGAAGUdTdT-3' 3'-dTdTCCGUUCGACUGGGACUUCA- <i>PL</i> -Chol-5'
siRNA7	AS-PL-Chol/S	5'-Chol- <i>PL</i> -GGCAAGCUGACCCUGAAGUdTdT-3' 3'-dTdTCCGUUCGACUGGGACUUCA-5'

Таблица 2. Последовательности siPHK и их конъюгатов с холестерином для подавления экспрессии гена *EGFP* в клетках линии HEK293FT

Примечание: *PL* – фоторасщепляемый линкер на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола; Chol – остаток холестерина, введенный через диаминогексановый линкер.

групп, присоединенных через фотолабильный линкер, что подтверждает перспективность использования выбранного нами 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиольного линкера для создания фоточувствительных siPHK.

На следующем этапе работы нами были синтезированы siPHK, подавляющие экспрессию гена *EGFP* (enhanced green fluorescent protein). Последовательность siPHK была выбрана на основании результатов публикации Zhang et al. [9].

Для клеточных экспериментов нами была получена линия клеток HEK293FT, стабильно экспрессирующая белок EGFP. Предварительно мы показали, что синтезированная контрольная немодифицированная siPHK способна подавлять экспрессию гена *EGFP* в созданной линии клеток HEK293FT на 65% (данные не приведены).

Затем нами были получены антисенс- и сенсцепи siPHK, содержащие остатки холестерина на 5'-конце, введенные напрямую или через фоторасщепляемый линкер (табл. 2). Введение остатков холестерина напрямую не позволяет удалить остаток холестерина путем УФ-облучения, в отличие от конъюгатов, в которых холестерин введен через фоторасщепляемый линкер. Собраны дуплексы siPHK, содержащие различные сочетания 5'-модифицированных цепей.

Проведено исследование подавления экспрессии гена *EGFP* созданными siPHK в клетках HEK293FT, стабильно экспрессирующих этот репортерный белок. После трансфекции siPHK в клетки липофектамином 3000 регистрировали экспрессию гена *EGFP* по флуоресценции белка по отношению к флуоресценции белка в необработанных клетках (рис. 4*a*).

Во всех случаях, когда в составе конструкции холестерин был присоединен к 5'-концу антисенс-цепи как напрямую, так и через фоторасщепляемый линкер, не регистрировали уменьшения флуоресценции EGFP в клетках. что согласуется с литературными данными об ингибировании процесса интерференции при введении группировок в это положение siPHK [10, 11]. Максимальную эффективность подавления экспрессии продемонстрировали немодифицированная контрольная siRNA1, siRNA4 (AS/S-Chol), содержащая холестерин на 5'-конце сенс-цепи, и siRNA6 (AS/S-PL-Chol), содержащая холестерин, введенный на 5'-конец сенс-цепи через фоторасщепляемый линкер. Значительно меньшую интерферирующую активность проявили siPHK, содержащие модифицированную холестерином антисенсцепь, а именно siRNA2 и siRNA3, содержащие два остатка холестерина, введенные напрямую или через фоторасщепляемый линкер по 5'-концам цепей PHK (AS-Chol/S-Chol и AS-PL-Chol/S-PL-Chol соответственно), а также siRNA5 и siRNA7, содержащие один остаток холестерина, введенный напрямую или через фоторасщепляемый линкер на 5'-конец антисенс-цепи (AS-Chol/S и AS-PL-Chol/S cootBettctBetho).

Затем провели аналогичный эксперимент, но с дополнительным УФ-облучением клеток после транфекции в течение 5 мин. Результаты исследования ингибирования экспрессии гена *EGFP* холестериновыми конъюгатами siPHK в клетках с облучением и без него приведены на рис. 4*б*.



Рис. 4. Относительные уровни экспрессии гена *EGFP* в клетках линии HEK293FT после трансфекции 7.5 пмоль siPHK в течение 24 ч с использованием липофектамина 3000 и последующей инкубации в течение 48 ч. За 100% принята флуоресценция необработанных клеток. (*a*) – Сравнительное исследование уровня экспрессии гена *EGFP* для всех полученных в работе siPHK. Контроль – клетки, не трансфицированные siPHK; (*б*) – сравнительное исследование относительных уровней экспрессии гена *EGFP* с УФ-облучением в течение 5 мин и без него. Все эксперименты выполнены в трех повторах.

В этом эксперименте показано, что УФ-облучение вызывает увеличение степени ингибирования экспрессии гена *EGFP* в клетках при использовании siPHK с остатками холестерина (siRNA3, siRNA6, siRNA7), введенными через фоторасщепляемый линкер. Наибольшую разницу в ингибировании экспрессии гена *EGFP* до и после облучения продемонстрировали siRNA3 и siRNA7, содержащие холестерин на 5'-конце антисенс-цепи.

Таким образом, продемонстрирована возможность использования созданных фотоактивируемых siPHK с остатками холестерина на 5'-конце антисенс-цепи, введенными через фоторасщепляемый линкер, для включения системы PHKинтерференции путем облучения УФ-светом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и оборудование. В работе использовали следующие реактивы: перхлорат натрия, дисукцинимидилкарботат, холестерилхлорформиат, *N*-метилимидазол (Acros Organics, США); 5-этилтио-1*H*-тетразол (Biosset, Россия); полимеры с присоединенным первым нуклеозидным звеном: 5'-О-(4,4'-диметокситритил)тимидин-СРС, 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-2'-О-третбутилдиметилсилил-N2-ацетилгуанозин-СРG, 5'-O-(4,4'-диметокситритил)-2'-О-третбутилдиметил-5'-О-(4,4'-диметокситрисилил-уридин-СРG; тил)-*N*-ацетилзащищенные 2'-*О*-метилрибо-, 5'-О-(4,4'-диметокситритил), 2'-О-третбутилдиметилсилил-*N*-ацетилзащищенные, 5'-0-(4,4'диметокситритил), 2'-О-триизопропилсилилоксиметил-*N*-ацетилзащищенные рибонуклеозид3'-фосфитамиды (ChemGenes, США); краситель Stains-all, персульфат аммония, дихлоруксусная кислота, акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, 2,6-лутидин, бромистый этидий (Fluka, Швейцария); мочевина, 40%-ный водный раствор метиламина (Merck, Германия); молекулярные сита Trap-PacTM Molecular Sieve Bag 3 Å (Millipore, США); ксиленцианол FF, бромфеноловый синий, N,N,N',N'-этилендиаминтетрауксусная кислота (Serva, Германия); трилейцин, триэтиламин, *N*-метилпирролидон, триэтиламинтригидрофторид, гексаметилендиамин, этокситриметилсилан, N,N-диизопропилэтиламин (DIPEA) (Sigma-Aldrich, США); N, N-дисукцинимидилкарбонат (ДСК) (Acros Organics, США); хлористый метилен, формамид (Реахим, Россия); ацетонитрил (Криохром, Россия); другие реактивы и растворители отечественного и зарубежного производства.

Синтез 1-(2-циано-*N*,*N*-диизопропилфосфитамид)-2-*O*-4,4'-диметокситритил-1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола проведен по методике Ахметовой с соавт. [6]. Холестерил-6-аминогексилкарбамат получали, как описано в работе Meschaninova et al. [7].

Все водные растворы, используемые в работе, были приготовлены с использованием деионизованной воды, полученной с помощью прибора Millipore Simplicity System (Millipore, США). Концентрирование растворов олигонуклеотидов производили на вакуумном концентраторе Speed-Vac Concentrator SCV 100 H (Savant, США).

Осаждение олигонуклеотидов из растворов проводили центрифугированием на центрифугах

MiniSpin Plus (Еррепdorf, Германия). Перемешивание растворов осуществляли с помощью Thermomixer Comfort (Еррепdorf, Германия). Оптическую плотность растворов олигонуклеотидов измеряли на спектрофотометре NanoDrop 1000 (ThermoScientific, США).

Фосфитамидный синтез олигонуклеотидов. Олигорибонуклеотиды и смешанные олиго(рибо-/2'-О-метилрибо)нуклеотиды были синтезированы твердофазным фосфитамидным методом на автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе ASM-800 (Биоссет, Россия) в масштабе 0.4 мкмоль с использованием протоколов, оптимизированных для данного прибора. Синтез проводили в реакторах на 50 мкл согласно разработанному протоколу операций. Использовали полимеры с присоединенным первым нуклеозидным звеном на полимерном носителе СРG.

Деблокирование и отделение олигорибонуклеотидов от полимерного носителя. Деблокировали и отделяли от полимерного носителя полученные олигорибонуклеотиды 40%-ным раствором метиламина в течение 15 мин при 65°С и постоянном перемешивании. Охлаждали в течение 10 мин при –20°С. Промывали раствором ацетонитрил–этанол–вода (1:1:1). Растворы объединяли и упаривали досуха.

Для удаления защитных групп 2'-ОТВDMS к сухому остатку сразу после упаривания добавляли 200 мкл свежеприготовленного раствора NMP : $Et_3N : Et_3N \cdot 3HF (1.5 : 0.75 : 1, v/v/v)$ и выдерживали при 65°С и перемешивании в течение 1.5 ч. Добавляли 300 мкл этокситриметилсилана и перемешивали на термомиксере в течение 10 мин при 25°С. К полученной смеси добавляли 1 мл серного эфира, перемешивали, центрифугировали, раствор отбирали, осадок промывали серным эфиром, после чего высушивали на воздухе.

Осаждение олигонуклеотидов. Олигонуклеотиды осаждали из водных растворов в виде натриевых солей десятикратным объемом 2%-ного раствора перхлората натрия в ацетоне. Супернатант после центрифугирования отбирали, осадок промывали ацетоном и высушивали досуха на воздухе.

Аналитический гель-электрофорез в ПААГ. Анализ реакционных смесей, а также выделенных олигонуклеотидов и их конъюгатов проводили методом гель-электрофореза в 15%-ном ПААГ (акриламид : N,N-метиленбисакриламид, 29 : 1) в денатурирующих условиях (8 М мочевина, 50 мМ Tris-H₃BO₃, pH 8.3, 0.1 М Na₂ЭДТА). Для нанесения на гель использовали 5 мкл раствора 8 М мочевины с содержанием 0.025% ксиленцианолового FF. Для визуализации олигонуклеотидов и их конъюгатов использовали раствор красителя Stains-all, приготовленный из 50 мг красителя Stains-all и 100 мл смеси вода—формамид (1:1). После окрашивания гели сушили на приборе Gel Dryer 583 (Віо-Rad, США). При необходимости количественной оценки использовали окрашивание геля бромистым этидием с последующей визуализацией на приборе Quantum Vilber Lourmat (Vilber Lourmat, Франция) ($\lambda = 312$ нм).

Препаративный гель-электрофорез. Деблокированные олигонуклеотиды и их конъюгаты выделяли с помощью препаративного гель-электрофореза в денатурирующем 15%- или 12%-ном ПААГ в вышеуказанных условиях. Олигорибонуклеотиды визуализировали в геле при наложении геля на пластину DC-Alufolien Kieselgel 60 F254 (Merck, Германия) в свете УФ-лампы ($\lambda = 254$ нм), при этом для предотвращения активации реакции фоторасщепления под воздействием УФ-излучения закрывали стеклом основную часть геля, содержащую продукт, оставляя доступной для УФ-облучения только небольшую его часть, достаточную для визуализации.

Элюция олигонуклеотидов из геля. Измельченный гель помещали в пробирку типа Eppendorf на 1.5 мл с 1 мл 0.3 М раствора перхлората натрия или в пробирку на 15 мл с 6–7 мл того же раствора. Выдерживали 16 ч при перемешивании на термомиксере Thermomixer Comfort (Eppendorf, Германия) при 25°C.

Супернатант отбирали и проводили обессоливание на картридже Tet-Pak C18 (Millipore, США), промывая 0.3 М NaClO₄, затем 50%-ным водным раствором ацетонитрила. Фракции, содержащие продукт, упаривали до 100–150 мкл и осаждали олигонуклеотиды в виде натриевых солей, как описано выше.

Синтез фоточувствительных и фотостабильных конъюгатов олигорибонуклеотидов с функциональными группами на 5'-конце (RNA1-Chol, RNA1-(Leu)₃, AS-Chol, S-Chol, AS-PL-Chol, S-PL-Chol). автоматическом ЛНК/РНК-синтезаторе Ha ASM-800 (Биоссет, Россия) стандартным твердофазным методом синтеза получали 21-звенный полностью защищенный олигорибонуклеотид RNA1. Удаляли 5'-диметокситритильную защитную группу. Включение фоторасщепляемого линкера в цепь олигонуклеотида проводили с использованием 0.25 M раствора 1-(2-циано-N,Nдиизопропилфосфитамид)-2-О-4,4'-диметокситритил-1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола. Время конденсации в присутствии этилтио-1*H*-тетразола составляло 30 мин.

Для получения конъюгатов на первом этапе проводили активацию свободной гидроксильной группы полимерсвязанного олигорибонуклеотида дисукцинимилкарбонатом (ДСК). Для этого раствор 10 мг ДСК в 270 мкл абсолютного ацетонитрила и 30 мкл DIPEA добавляли к полимерному носителю. Реакцию проводили в течение 1 ч при 37°С и перемешивании. Затем раствор над полимером отбирали и добавляли свежеприготовленный раствор 7 мг ДСК в 270 мкл абсолютного ацетонитрила и 30 мкл DIPEA. Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин при 37°С, раствор над полимером отбирали. Последнюю процедуру повторяли дважды.

Для присоединения холестерил-6-аминогексилкарбамата или трилейцина раствор 11 мг Chol-СО-NH-(CH₂)₆-NH₂ в 225 мкл абсолютного тетрагидрофурана и 25 мкл DIPEA или, соответственно, раствор 10 мг трилейцина в 225 мкл абсолютного ацетонитрила и 25 мкл DIPEA добавляли к полимеру с присоединенным олигорибонуклеотидом, несущим активированную ДСК гидроксильную группу. Реакцию проводили в течение 1 ч при 37°С и перемешивании. Затем в реакционную смесь добавляли еше одну поршию аминопроизводного (холестерина или трилейцина), а именно раствор 5 мг Chol-CO-NH-(CH2)6-NH2 в 135 мкл абсолютного тетрагидрофурана и 15 мкл DIPEA, или, соответственно, раствор 5 мг трилейцина в 135 мкл абсолютного ацетонитрила и 15 мкл DIPEA. Реакционную смесь оставляли перемешиваться в течение 16 ч при 37°С. По окончании реакции раствор над полимерным носителем отбирали, полимер промывали дважды по 150 мкл ТНГ или 150 мкл AcN, затем дважды по 150 мкл ацетона и высушивали на воздухе. Полученные конъюгаты олигорибонуклеотидов деблокировали и выделяли препаративным гель-электрофорезом.

Исследование кинетики отщепления группировок, присоединенных к олигорибонуклеотидам через фотолабильный линкер, под воздействием УФоблучения. Пробы, содержащие 0.1 о.е. конъюгата олигорибонуклеотида с фотолабильным линкером, облучали в течение определенного времени (1, 3, 5, 10, 15 и 30 мин) при длине волны 365 нм с использованием трансиллюминатора с УФ-лампой (Vilber Lourmat, США). После облучения пробы анализировали аналитическим гель-электрофорезом в 15%-ном денатурирующем ПААГ с окрашиванием бромистым этидием и визуализацией с использованием системы гель-документации Quantum (Vilber Lourmat, Франция). Для получения количественных характеристик изображения переводили в цифровую форму в программном пакете Quantity One (Bio-Rad, США).

Расчет кинетических параметров расщепления фоточувствительных коньюгатов олигорибонуклеотидов. Данные, полученные по результатам расщепления коньюгатов олигорибонуклеотидов, обрабатывали в программе Microsoft Excel. Долю продукта реакции рассчитывали как отношение интенсивности полосы, соответствующей продукту реакции, к суммарной интенсивности полос, соответствующих исходному конъюгату и продуктам реакции. Полученные данные описывали уравнением для реакции псевдопервого порядка в программном пакете GraphPad Prism 5.0.4.533 (GraphPad Software, CШA):

$$f_a = Pl(1 - e^{k_{obs}t})$$

где f_a — доля продукта реакции, Pl — доля продукта при переходе реакции в стационарную фазу (предельная степень расщепления), k_{obs} — константа реакции псевдопервого порядка, t — время реакции.

Трансфекция клеток-продуцентов лентивирусных частиц третьего поколения (HEK293FT) кальций-фосфатным методом. За день до трансфекции 4×10^{6} клеток линии HEK293FT (Invitrogen. США) высевали на чашку Петри диаметром 10 см. В 1.5-мл пробирке типа Eppendorf смешивали 1 мл 0.25 мМ раствора CaCl₂, по 4 мкг упаковочных плазмид pLP1 (содержит кодирующие последовательности генов gag и pol), pLP2 (содержит последовательность, кодирующую белок Rev), pLP/VSVG (содержит последовательность, кодирующую гликопротеин G вируса везикулярного стоматита) и целевой плазмиды pLVX-CMV-Fluc-Р2А-EGFP-PGK-Puro (содержит последовательность гена EGFP), инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Полученный раствор смешивали с 1 мл буфера HBS (280 мМ NaCl, 100 мМ HEPES, 1.5 мМ Na₂HPO₄; pH 7.12) и по каплям приливали к клеткам. Через 6-8 ч после трансфекции заменяли среду на свежую. Продуцентов инкубировали в течение 48 ч. Затем собирали среду, содержащую вирусные частицы, пропускали через фильтр 0.45 мм, разбивали весь объем на аликвоты по 1 мл, замораживали и хранили при -70°С.

Получение трансгенной линии HEK293FT, стабильно экспрессирующей белок EGFP. Клетки HEK293FT высевали в лунки 6-луночного планшета по 500 тыс. клеток на лунку. По достижении 70%-ной конфлюентности среду убирали, приливали по каплям по 2 мл среды, содержащей вирусные частицы. Через 48 ч после трансдукции производили отбор EGFP-положительной популяции клеток на приборе S3e Cell Sorter (Bio-Rad, США).

Исследование подавления экспрессии гена *EGFP* созданными siPHK в клетках HEK293FT методом проточной цитофлуориметрии. Для трансфекции siPHK клетки, стабильно экспрессирующие EGFP, высевали в 48-луночный планшет в количестве 45 тыс. клеток на одну лунку. На следующий день готовили два раствора. Первый раствор содержал среду Opti-MEM (Invitrogen, CШA; 12.5 мкл) и siPHK (7.5 пмоль). Второй раствор

содержал среду Opti-MEM (12.5 мкл) и 0.75 мкл липофектамина 3000 (Thermo Fisher Scientific, США). Растворы смешивали в соотношении 1:1 для получения конечной смеси. Полученную смесь оставляли на 10 мин при комнатной температуре. Перед проведением трансфекции у клеток, выросших в планшете, меняли старую среду для культивирования на Opti-MEM (175 мкл), после этого к клеткам добавляли конечную реакционную смесь, содержащую липофектамин 3000 и siPHK. Клетки оставляли на 24 ч в СО₂-инкубаторе (Binder, Германия), затем производили замену культуральной среды на свежую полную среду DMEM (0.5 мл) и оставляли в CO₂-инкубаторе еще на 48 ч. По окончании периода инкубации клетки собирали с помощью трипсина и фиксировали в 1%-ном растворе формальдегида. Для исследования активации siPHK клетки через 24 ч после начала трансфекции облучали УФ-светом с длиной волны 365 нм в течение 5 мин. Эффективность ингибирования экспрессии гена EGFP определяли методом проточной цитофлуориметрии с использованием прибора Novocyte (ACEA Biosciences, CIIIA).

Статистический анализ данных. Для получения статистически достоверных результатов эксперименты повторяли минимум трехкратно, результаты измерений представляли в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (SD).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании разработан новый подход к получению фотоактивируемых siPHK для фотоконтролируемой PHK-интерференции в эукариотических клетках. Созданные конъюгаты siPHK с холестерином, введенным через фоторасщепляемый линкер на 5'-конец обеих цепей или только в антисенс-цепи, способны активировать систему PHK-интерференции в этих клетках после облучения УФ-светом.

Разработанный подход может быть использован при создании других фотоактивируемых siPHK для контролируемой светом регуляции экспрессии различных генов в эукариотических клетках.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.х.н. А.Г. Веньяминовой (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН) за ценные рекомендации при написании статьи.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-04-00838) и базового бюджетного финансирования в рамках госзадания Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (2021– 2023 гг.) № 121031300042-1.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания проведенных кемлибо из авторов данной статьи экспериментов с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nguyen Q.N., Chavli R.V., Marques J.T., Conrad P.G., Wang D., He W., Belisle B.E., Zhang A., Pastor L.M., Witney F.R., Morris M., Heitz F., Divita G., Williams B.R.G., Mcmaster G.K. // Biochim. Biophys. Acta. 2006. V. 1758. P. 394–403. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.01.003
- Yang J., Chen C., Tang X. // Bioconj. Chem. 2018. V. 29. P. 1010–1015. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00080
- Ji Y., Yang J., Wu L., Yu L., Tang X. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2016. V. 128. P. 2192–2196. https://doi.org/10.1002/anie.201510921
- Ando H., Kobayashi M., Tsubokawa T., Uyemura K., Furuta T., Okamoto H. // Dev. Biol. 2005. V. 287. P. 456–468. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.09.023
- Круглова Н.С., Мещанинова М.И., Веньяминова А.Г., Зенкова М.А., Власов В.В., Черноловская Е.Л. // Мол. биология. 2010. Т. 44. С. 284–293. [Kruglova N.S., Meschaninova M.I., Venyaminova A.G., Zenkova М.А., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. // Mol. Biol. 2010. V. 44. P. 254–261.] https://doi.org/10.1134/S002689331002010X
- Ахметова Е.А., Голышев В.М., Вохтанцев И.П., Веньяминова А.Г., Новопашина Д.С. // Биоорг. химия. 2021. Т. 47. С. 276–286. [Akhmetova E.A., Golyshev V.M., Vokhtantcev I.P., Venyaminova A.G., Novopashina D.S. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2021. V. 47. P. 496–504.] https://doi.org/10.1134/S1068162021020023
- Meschaninova M.I., Novopashina D.S., Semikolenova O.A., Silnikov V.N., Venyaminova A.G. // Molecules. 2019. V. 24. P. 4266.

https://doi.org/10.3390/molecules24234266

- Pelliccioli A.P., Wirz J. // Photochem. Photobiol. Sci. 2002. V. 1. P. 441–458. https://doi.org/10.1039/b200777k
- Zhang M., Bai C.-X., Zhang X., Chen J., Mao L., Gao L. // RNA Biol. 2004. V. 1. P. 74–77.
- Zhang J., Jing N., Fan X., Tang X. // Chemistry. 2020 V. 26. P. 14002–14010. https://doi.org/10.1002/chem.202003084
- Wang Q., Fan X., Jing N., Zhao H., Yu L., Tang X. // Chembiochem. 2021. V. 22. P. 1901–1907. https://doi.org/10.1002/cbic.202000763

АХМЕТОВА и др.

Photocaged Small Interfering RNA

E. A. Akhmetova*, D. V. Kim*, A. S. Dome*, M. I. Meschaninova*, and D. S. Novopashina*, **,

*Phone: +7 (343) 363-51-29; e-mail: danov@niboch.nsc.ru
 *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, prosp. Akad. Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia
 **Novosibirsk State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia

Photoregulated systems are interesting and prospective instruments for the influence on gene expression. In present work the approach for the synthesis of photoregulated siRNA for activatable by light irradiation RNA interference is proposed. siRNA temporary block by introduction of bulky group through of the photolabile linker. The attachment of ligand was carried out by the activation of 5'-terminal hydroxyl using disuccinimidyl carbonate with subsequent interaction with amino containing ligand. We used aminomodified cholesterol and trileucine as bulky ligands. Effective remove of ligands introduced through the photocleavable linker by UV-irradiation was demonstrated. Using the proposed approach siRNA bearing cholesterol residues at 5'-terminus of sense- and/or antisense-chains targeted to EGFP mRNA (enhanced green fluorescent protein) were synthesized. The possibility of photoinduced inhibition of *EGFP* gene expression into the cells HEK293FT stably expressed EGFP was shown.

Keywords: photocleavable linker, photoactivatable siRNA, cholesterol conjugates, green fluorescent protein



УДК 578.823.1

ДЕТЕКЦИЯ ВИРУСА БЛЮТАНГА С ПОМОЩЬЮ МИКРОСФЕР, КОНЪЮГИРОВАННЫХ С МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ К ГРУПП-СПЕЦИФИЧНОМУ БЕЛКУ (VP7), МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ВИРОМЕТРИИ

© 2022 г. Н. В. Руденко^{*, #}, А. П. Каратовская^{*}, А. В. Замятина^{*}, А. С. Малоголовкин^{**, ****}, В. А. Олейников^{***}, Ф. А. Бровко^{*}, А. Ю. Кольцов^{**}, О. Г. Лаптева^{**}, Д. В. Колбасов^{**}, А. О. Шепеляковская^{*}

*Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН, Россия, 142290 Пущино, просп. Науки, 6

**ФГБНУ "Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии",

Россия, 601125 Владимирская обл., пос. Вольгинский, ул. Академика Бакулова, стр. 1

***ФГБУН "Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова" РАН,

Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

****Научно-технологический университет "Сириус", Россия, 354340, Краснодарский край, федеральная территория "Сириус", пгт. Сириус, Олимпийский просп., 1

Поступила в редакцию 30.11.2021 г.

После доработки 15.12.2021 г.

Принята к публикации 18.12.2021 г.

Блютанг — инфекционное трансмиссивное вирусное заболевание экономически значимых сельскохозяйственных жвачных животных, для которого характерны как летальный исход, так и продолжительная виремия без клинических симптомов, что делает актуальной разработку высокочувствительных методов обнаружения вируса блютанга (BTV). На основе высокоаффинных моноклональных антител к VP7 (вирусному белку 7) были разработаны методы обнаружения вирусных частиц с помощью иммунофлуоресценции клеток Vero, инфицированных BTV, иммуноферментного сэндвичанализа и проточной вирометрии. Высокая аналитическая чувствительность ($10^{-0.25}$ TЦД₅₀/мл (тканевая цитопатогенная доза)) была продемонстрирована с помощью проточного флуориметрического анализа. Возможность быстрого и эффективного выявления вирусных частиц в биологических жидкостях животного методом проточной вирометрии была продемонстрирована с помощью проточного методом проточной вирометрии была продемонстрирована с помощью проточного флуориметрического анализа. Возможность быстрого и эффективного выявления вирусных частиц в биологических жидкостях животного методом проточной вирометрии была продемонстрирована в модельной системе при определении BTV в сыворотке крови крупного рогатого скота, аналитическая чувствительность определения при этом составляла $10^{0.75}$ TЦД₅₀/мл.

Ключевые слова: вирус блютанга (BTV), вирусный белок 7 (VP7), иммуноферментный анализ, иммунофлуоресценция, моноклональные антитела, проточная вирометрия DOI: 10.31857/S0132342322040170

введение

Блютанг, или катаральная лихорадка овец, это инфекция домашних и диких жвачных животных, переносимая насекомыми. Блютанг поражает преимущественно овец, при этом широко распространено скрытое заражение крупного рогатого скота. Вирус блютанга (BTV) принадлежит к роду *Orbivirus*, семейству Reoviridae. BTV имеет сегментированный геном из двухцепочечной PHK, упакованный в покрытую оболочкой частицу размером 80 нм. Поверхностный гликопротеин VP2 демонстрирует высокую гетерогенность у различных штаммов BTV и определяет серотипную специфичность. Существует 29 различных типов (серотипов) BTV, которые могут инфицировать домашних овец, коз и крупный рогатый скот, а также диких животных, таких как буйволы, олени, антилопы и верблюды [1, 2].

Сокращения: BTV – вирус блютанга; FBS – эмбриональная бычья сыворотка; FITC – изотиоцианат флуоресцеина; mAb – моноклональные антитела; MIF – медиана интенсивности флуоресценции; MOI – множественность инфекции; PE – фикоэритрин; SA-PE – стрептавидин, меченный фикоэритрином; Sulfo-SMCC – сульфосукцинимидил 4-*N*-малеимидометилциклогексан-1-карбоксилат; VP7 – вирусный белок 7; PHИФ – реакция непрямой иммунофлуоресценции; TЦД – тканевая цитопатогенная доза.

[#]Автор для связи: (тел.: +7 (926) 592-11-89; эл. почта: nrudkova@ mail.ru).

Бессимптомное течение инфекции у крупного рогатого скота приводит к неконтролируемой передаче вируса и чрезвычайно затрудняет эпидемиологическую оценку заболеваемости. Несмотря на прогресс в исследованиях вакцины против BTV, болезнь по-прежнему представляет серьезную угрозу для животноводства во всем мире [3, 4].

Простые, надежные, быстрые и чувствительные диагностические тесты имеют решающее значение для контроля перемещений животных, карантинов и расследования вспышек заболевания. Существующие методы диагностики условно можно разделить на две группы. К первой группе относятся методы прямого обнаружения вирусов (инфицирование куриного эмбриона или клеточной линии) с последующей иммунологической и генетической характеристикой (ПЦР и/или секвенирование). Эти методы предоставляют исчерпывающую информацию о вирусе, но чрезвычайно трудоемки и требуют много времени [2, 5–10].

Выявление специфических антител к BTV у инфицированных, выздоровевших и вакцинированных животных – еще одно важное направление диагностики (иммуноферментный анализ, иммунофлуоресцентный тест). Например, описан иммуноанализ с использованием микросфер, конъюгированных с двумя поверхностными вирусными белками, для одновременного определения групп- и серотип-специфических антител в сыворотке крови инфицированных животных [11]. Показано, что антитела к белкам ВТV могут быть обнаружены в сыворотках крови овец через 7–14 лет после инфицирования и сохраняются в течение длительного времени [12]. Серологические анализы подтверждают предыдущий контакт животных с вирусом, а не наличие инфекционного вируса.

Формат сэндвич-ИФА широко используется из-за его высокой чувствительности и специфичности для обнаружения аналитов в многокомпонентных смесях, таких как биологические жидкости [13]. Проточный цитометр – широко используемый прибор в клинической лабораторной практике. Быстрое многомерное исследование отдельных живых микрообъектов сделало проточную цитометрию бесценным инструментом как для качественного, так и для количественного анализа [14, 15]. Проточная вирометрия обеспечивает быстрое, чувствительное и количественное обнаружение вирусных аналитов, что побудило нас разработать анализы на основе проточной вирометрии для обнаружения BTV.

Успешному обнаружению вирусов способствует использование микрочастиц, конъюгированных с антителами для улавливания вирусных частиц. В нескольких исследованиях микрочастицы, конъюгированные с вирус-специфическими антителами, использовались для идентификации и дифференциации вирусов гриппа A и В, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) и вируса Денге [16—19].

В работе Руденко с соавт. [20] описаны получение и характеристика высокоаффинных моноклональных антител (mAb) к поверхностным эпитопам VP7 BTV. VP7 – относительно консервативный белок, ответственный за групповую специфичность [1] и иммуногенные свойства вируса и количественно преобладающий в структуре вириона [21–23]. При получении mAb для детекции BVT был использован рекомбинантный белок VP7_а, соответствующий фрагменту белка VP7, экспонированному на поверхности вирусной частицы и включающему 114–257 а.о. [24]. mAb к VP7 способны связываться с поверхностными эпитопами 24 серотипов BTV.

Цель данного исследования — разработка быстрого и чувствительного метода детекции вируса блютанга в биологических жидкостях животных методом проточной вирометрии с использованием моноклональных антител [20] к поверхностным эпитопам вирусной частицы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обнаружение вируса блютанга в инфицированных клетках с помощью реакции непрямой иммунофлуоресценции. Для идентификации BTV в инфицированных клетках использовали панель специ-Способность фических mAb [20]. mAb взаимодействовать с поверхностными эпитопами вирусных частиц была подтверждена иммуноферментным анализом по взаимодействию с рекомбинантным белком, состоящим из участка аминокислотной последовательности VP7, экспонированного на поверхности вирусной частицы (114-257 а.о. в последовательности исходного белка), и фрагмента тиоредоксина. Этот анализ и получение рекомбинантного VP7 описаны нами ранее [20]. Все полученные mAb были протестированы на их способность обнаруживать BTV в инфицированных клеточных линиях в реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ). mAb эффективно окрашивали инфицированные клетки. На рис. 1 показано сравнение данных между взаимодействием антител с вирусными частицами в инфицированных клетках и данными ИФА о взаимодействии mAb с рекомбинантным белком, содержащим фрагменты VP7 и тиоредоксина.

Антитела к VP7 реагировали с инфицированными клеточными линиями до концентрации



Рис. 1. Сравнение антиген-связывающей активности mAb к VP7 вируса блютанга [20]. Гистограмма показывает зависимость степени связывания mAb от концентрации: ИФА – связывание с рекомбинантным белком, состоящим из фрагментов VP7 и тиоредоксина; РНИФ – идентификация BTV-1 в инфицированных клетках Vero.

0.1 мкг/мл в РНИФ. Визуализацию проводили с использованием вторичных антител, меченных FITC. На рис. 2 в качестве примера представлена микрофотография иммунофлуоресцентного окрашивания антителом Bt-33 (как одним из наиболее эффективных в этой реакции) клеток Vero, инфицированных BTV серотипа 1, демонстрирующая эффективное выявление вирусных частиц, в сравнении с интактными клетками. Амплификацию вируса проводили в течение четырех суток. Даже незначительного количества вирусных частиц, выделенных из зараженного материала, достаточно для эффективного выявления антителами в РНИФ.

Сэндвич-ИФА. Тест-системы для выявления ВТV были разработаны в формате сэндвич-ИФА, как описано ранее [26]. Для подбора детектирующих пар антител к ВТV проводили биотинилирование всех mAb имеющейся панели с помощью *N*-гидроксисукцинимидного эфира биотина. Биотинилированные антитела использовали в качестве детектирующих антител, а иммобилизованные на планшетах для ИФА немеченые антитела – для захвата вирусных частиц.

Были проверены все возможные сочетания mAb против вирусных частиц для обнаружения детектирующих пар антител с максимальным соотношением сигнал/фон, т.е. отношением оптической плотности в лунках микропланшета с антигеном и без него. В качестве аналита использовали инактивированный препарат BTV серотипа 1, экстрагированный фреоном. Полученный таким образом BTV представляет собой цельные вирусные частицы [27], это дало основание предполагать, что разработанный метод будет направлен на выявление интактных вирусов. В результате были выбраны следующие пары mAb, эффективно выявляющие инактивированный BTV: Bt-3 (захват) + + Bt-9 (детекция), Bt-3 (3) + Bt-28 (д), Bt-8 (3) + + Bt-9 (α), Bt-8 (3) + Bt-28 (α), Bt-(3 + 8) (3) + Bt-9 (α), Bt-(3 + 8) (3) + Bt-28 (д). Соотношение сигнал/фон для этих детектирующих "пар" равнялось шести при концентрации аналита 100 нг/мл, ошибка измерения ±5%. Максимальную чувствительность демонстрировали пары антител Bt-3 (3) + + Bt-9bio (д) и Bt-3 (з) + Bt-28bio (д), которая составила 10^{3.94} ТЦД₅₀/мл и 3 нг/мл при использовании инактивированного препарата.

Конъюгирование флуоресцентных микросфер с mAb. Антитела захвата из детектирующих пар, разработанных для сэндвич-ИФА, конъюгировали с флуоресцентными микросферами с использованием Sulfo-SMCC. Контроль иммобилизации антител на флуоресцентных микросферах





Рис. 2. РНИФ культуры клеток Vero, инфицированных BTV-1 MOI 0.02, культивируемой в течение 96 ч после инфекции: (*a*) – неинфицированная культура клеток Vero; (δ) – детекция с mAb AlpA-2 [25]; (*в*) – детекция с Bt-33. Увеличение 40×.

проводили по взаимодействию с антителами против иммуноглобулинов мыши, меченных РЕ. Конъюгаты флуоресцентных микросфер с mAb демонстрировали 500-кратное увеличение медианы интенсивности флуоресценции (MIF) при 585/40 нм по сравнению с контрольными микрочастицами без антител.

Для обнаружения вирусных частиц использовали микросферы, конъюгированные с mAb захвата, и детектирующие антитела, меченные либо AlexaFluor 488, либо биотином. В случае использования биотинилированных антител иммунные комплексы детектировали стрептавидином, меченным PE (SA-PE).

Были протестированы все детектирующие пары mAb, отобранные в сэндвич-ИФА. Сравнили два способа мечения детектирующих антител с целью определения оптимального способа детекции вирусных частиц: прямое введение флуоресцентной метки (AlexaFluor 488) и опосредованное через высокоаффинную биотин-стрептавидиновую систему, позволяющую не только идентифицировать сигнал, но и амплифицировать его.

Иммунофлуориметрическое определение концентрации вируса блютанга с использованием микросфер. Определение вируса проводили, добавляя препарат BTV (в соответствующем разведении) к смеси функциональных микросфер с иммобилизованными mAb захвата и с мечеными детектирующими mAb. Процедура определения BTV была максимально оптимизирована, подобраны концентрации реагентов с учетом оптимальных диапазонов и линейности детекции аналитов. Концентрация AlexaFluor 488-меченных и биотинилированных антител составляла 5 мкг/мл. С целью оптимизации процедуры анализа были объединены этапы инкубирования сенсибилизированных микросфер в экспериментальной точке с аналитом и детектирующими мечеными антителами. В случае AlexaFluor 488-меченных антител анализ проводили в одну стадию, в случае биотинилированных антител – в две. В результате об-

m Ab us	Детектирую- щие mAb	Детектирующий реагент: mAb-AlexaFluor 488			Детектирующий реагент: mAb-биотин + SA-PE		
тар на микросферах захвата		фон*, MIF	аналитическая чувствительность, BTV		фон*, MIF	аналитическая чувствительность, BTV	
			ТЦД ₅₀ /мл	MIF		ТЦД ₅₀ /мл	MIF
Bt-3	Bt-9	4331	10 ^{1.75}	5607	1386	10 ^{0.75}	3295
Bt-3	Bt-28	2871	10 ^{1.75}	6604	939	$10^{-0.25}$	2284
Bt-8	Bt-9	2410	10 ^{1.75}	5603	1620	$10^{0.75}$	3207
Bt-8	Bt-28	2629	10 ^{1.75}	4699	1625	$10^{0.75}$	3188
Bt-3 + Bt-8	Bt-9	4178	10 ^{1.75}	5760	1902	$10^{0.75}$	3704
Bt-3 + Bt-8	Bt-28	2926	10 ^{1.75}	5859	1637	$10^{0.75}$	3848

Таблица 1. Измерение концентрации вируса блютанга серотипа 1 (ТЦД₅₀/мл) методом проточной вирометрии с использованием детектирующих пар mAb, отобранных в сэндвич-ИФА, и двух типов флуоресцентных меток

* Фон — фоновый сигнал, в качестве отрицательного контроля использовали буфер для разведения образцов.

щее время анализа удалось сократить на 60 мин без потери в чувствительности и специфичности.

Результаты определения BTV представлены в табл. 1. При использовании AlexaFluor 488 в качестве флуоресцентной метки минимальный предел определения (аналитическая чувствительность определения BTV) для всех исследуемых детектирующих пар составил 10^{1.75} ТЦД₅₀/мл. Повидимому, существенный вклад в чувствительность определения вносила неспецифическая флуоресценция, т.е. значение MIF в отсутствие вирусных частиц (отрицательный контроль). При использовании биотинилированных детектирующих антител и в качестве флуоресцентной метки SA-PE неспецифическая флуоресценция имела значения в среднем на 76% меньше, чем в случае с AlexaFluor 488. Минимальным пределом определения считали значение MIF, превышающее отрицательный контроль (фон) как минимум в 2 раза (табл. 1). Для большинства исследуемых детектирующих пар минимальный предел определения составил 10^{0.75} ТЦД₅₀/мл. Детектирующая пара Bt-3 (3) + Bt-28 (д) демонстрировала предел детекции вирусных частиц, равный 10^{-0.25} ТЦД₅₀/мл. На рис. 3 представлен калибровочный график определения вирусных частиц, а также показано определение BTV в сыворотке бычьей крови, в этом случае чувствительность составила 10^{0.75} ТЦД₅₀/мл.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на эффективность существующих методов диагностики BTV, большинство современных методов медленные или дорогостоящие, что не позволяет быстро реагировать при вспышках заболевания. Молекулярно-биологические методы, такие как ПЦР в реальном времени, несмотря на высокую скорость определения, требуют выделения генетического материала и сложного оборудования. ПЦР выявляет инфекцию, но не свидетельствует о фактической связи между инфекцией и клиническими признаками. Секвенирование геномов, в особенности для РНК-вирусов, несмотря на очевидные успехи и снижение стоимости, все еще остается дорогой и длительной процедурой, не позволяющей использовать его в качестве рутинного диагностического теста [28]. Развитие аналитических методов быстрого обнаружения и идентификации BTV с высокой чувствительностью и избирательностью попрежнему актуально.

Для разработки иммунохимических методов идентификации BTV была использована панель моноклональных антител [20] к VP7 — относительно консервативному белку, ответственному за групповую специфичность [10]. Этот фрагмент экспонирован на поверхности интактных вирионов и коровых частиц вируса BTV [24]. Антитела к VP7 узнают вирусные частицы всех серотипов, следовательно, разработанный тест пригоден для скрининга виремии, вызванной любым сероти-



Рис. 3. Калибровочный график определения BTV-1, полученный с помощью анализа на флуоресцентных микросферах с использованием детектирующей пары mAb Bt-3 (захват) + Bt-28 (детекция). На графиках представлены средние значения и стандартные отклонения, полученные в пяти повторах.

пом вируса блютанга. Использование антител с такой специфичностью позволило разработать высокочувствительный тест для идентификации вирусных частиц непосредственно в биологических жидкостях зараженного животного. В данной работе продемонстрирована возможность определения BTV в сыворотке крови с использованием цитофлуориметра BD Ассигі C6 (Becton Dickinson, США), позволившего значительно сократить время детекции. Проточные цитофлуориметры широко распространены в современных лабораториях.

Чувствительность определения вирусных частиц разработанным методом сопоставима с данными Martinelle et al. [29], которые методом ПЦР в реальном времени определяли содержание вирусов в тканях на пике виремии после некропсии вакцинированных и невакцинированных животных, искусственно зараженных патогенными штаммами вируса. При этом наименьшее число копий вирусных геномов было отмечено для серотипа BTV4 – после пересчета соответствует 10^{0.58} ТЦД₅₀/мл. Такое количество вирусов уже достаточно для детекции разработанным методом. Для других серотипов на пике виремии количество копий вирусных геномов существенно выше, а следовательно, разработанным методом они могут детектироваться и на более ранней стадии инфицирования. При этом важно отметить, что для передачи вирусов комарами необходимо, чтобы вирус преодолел порог 10³¹⁵⁵ ТЦД₅₀/мл. Следовательно, иммунофлуориметрическое определение концентрации вирусов с использованием микросфер, описанное в данной работе, имеет достаточную чувствительность и может применяться для выявления интактных вирусных частиц непосредственно в биологических жидкостях инфицированных животных.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Вирус блютанга и клетки. BTV-1 (Испанский пул 1,2 овечья кровь) с инфекционной активностью 10^{6.75} ТЦД₅₀/мл получен из Государственной коллекции микроорганизмов. вызывающих опасные, особо опасные, зооантропонозные и пограничные болезни (регистрационный номер CCU - 441429, http://ckp-rf.ru/ckp/441429/). Лизаты клеток Vero, зараженных BTV-1, очищали и концентрировали в соответствии с методикой Verwoerd et al. [27]. Для размножения вируса использовали клетки почек африканской зеленой мартышки (Vero) из коллекции ФГБНУ "Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии".

Размножение и титрование BTV-1. Культуру клеток Vero инфицировали BTV-1 MOI 0.02. Адсорбцию вируса проводили в течение 1 ч при 37 \pm \pm 0.5°C. Затем инфицированный монослой клеток отмывали от несвязавшегося вируса трехкратно средой Игла-MEM без сыворотки. Далее клетки инкубировали со средой Игла-MEM, содержа-

щей 2% FBS (SH30070.03; Defined Fetal Bovine Serum, HyClone, США) при 37 \pm 0.5°C в течение 4 суток. Цитопатический эффект контролировали ежедневно. Инфекционную активность BTV-1 определяли путем лимитирующего разведения вируса в клетках Vero. Инфекционную дозу для культуры ткани ТЦД₅₀/мл рассчитывали с использованием метода Рида и Мюнха в модификации Ашмарина [30].

Реакция непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ). Для определения способности ранее полученных антител [20] идентифицировать антигены BTV-1 в инфицированных клетках были подготовлены аналитические тест-планшеты для тестирования в РНИФ. Клетки Vero культивировали в лунках 96-луночных планшетов в течение 1-2 суток в ростовой среде Игла, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2.5 ед./мл амфотерицина В. Клетки в планшетах заражали BTV-1 MOI 0.02 в объеме 100 мкл среды Игла с указанными антибиотиками. Интактные и инфицированные клетки инкубировали при 37°С в атмосфере 95%-ной влажности и 5% CO₂ в течение 4 суток. Кондиционную среду из лунок удаляли, клеточный монослой дважды промывали PBS (3 мМ KCl, 1 мМ KH₂PO₄, 140 мМ NaCl, 9 мМ Na_2HPO_4), фиксировали 80%-ным (v/v) ацетоном, охлажденным до -20° С.

К клеткам добавляли серийные двукратные разведения антител и сывороток (нормальной, в качестве отрицательного контроля, и специфической, содержащей антитела к вирусу, – в качестве положительного контроля) в PBS, содержащем 1% FBS, и инкубировали в течение 1 ч при 37°С. После двух последующих промывок PBS антитела кролика против иммуноглобулинов мыши, коньюгированные с FITC, добавляли в рабочем разведении 1 : 1000 в соответствии с рекомендациями производителя (31555; Thermo Fisher Scientific, США). Иммунные комплексы в инфицированных клетках визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Eclipse 90i (Nicon, Япония).

Конъюгация антител с биотином. Биотинилирование антител проводили по стандартной методике [31].

Сэндвич-ИФА. Сэндвич-ИФА проводили, как описано ранее [26]. Немеченые mAb захвата иммобилизовали на полистирольных планшетах для ИФА (655001; Greinerbio-one, США), далее добавляли биотинилированные mAb детекции и инактивированный BTV-1 (100 нг/мл) [27], в контрольные лунки вносили только антитела детекции. Образовавшиеся иммунные комплексы выявляли конъюгатом пероксидазы хрена со стрептавидином (21126; Thermo Fisher Scientific, США), взаимодействующим с биотинилированными детектирующими антителами. Детекцию проводили после обработки *о*-фенилендиамином (P23938; Sigma-Aldrich, США) – растворимым хромогенным субстратом пероксидазы, измеряли оптическую плотность при 490 нм на микропланшетном фотометре iMark (Bio-Rad, США).

Конъюгация функциональных микросфер с mAb. Для ковалентного присоединения mAb использовали микросферы размером 7.5 мкм (558582, 558583, 558581; BD Biosciences, США), содержащие функциональные группы, взаимодействующие с Sulfo-SMCC (22322; Pierce, США). Функциональные микросферы конъюгировали с mAb Bt-3 и Bt-8 [20] в качестве антител захвата согласно инструкции производителя (558556; BD Biosciences, США).

Конъюгирование антител с AlexaFluor 488. mAb Bt-9 и Bt-28 конъюгировали с N-гидроксисукцинимидным эфиром AlexaFluor 488 (A20000; Thermo Fisher Scientific, США) в бикарбонатном буфере (0.1 M, pH 9.0) согласно методике Velázquez-López et al. [32].

Детекция вируса блютанга методом проточной цитофлуориметрии. В качестве самостоятельных систем для обнаружения BTV-1 были использованы функциональные микросферы: с иммобилизованными mAb Bt-3 (558582, BD Biosciences), с mAb Bt-8 (558583, BD Biosciences) и Bt-3 + Bt-8 (558581, BD Biosciences). Для детекции использовали mAb Bt-8, Bt-9, Bt-28, меченные биотином или AlexaFluor 488. Серийные десятикратные разведения BTV-1 (от концентрации вирусных частиц, равной $10^{6.75}$, до $10^{-2.25}$ TЦД₅₀/мл) готовили в буфере для разведения (PBS с 0.1% Tween 20 и 1% FBS).

В случае использования флуоресцентно меченых детектирующих антител реакционную смесь готовили путем одновременного смешивания всех компонентов в буфере для разведения. В ходе эксперимента в отдельные промаркированные пробирки добавляли по 1 мл заранее приготовленных растворов, содержащих вирусные частицы в десятикратно различающихся концентрациях. В качестве отрицательного контроля использовали 1 мл буфера для разведения без добавления вирусов. К каждой экспериментальной точке добавляли по 1 мкл суспензии микросфер, конъюгированных с антителами захвата, что соответствовало ~6 × 10³ частиц, и флуоресцентно меченых антител до конечной концентрации 10 мкг/мл. Полученные смеси инкубировали 4 ч при комнатной температуре в темноте, тщательно перемешивая содержимое пробирок. Определение BTV в бычьей сыворотке выполняли аналогичным образом с использованием FBS вместо буфера для разведения.

После связывания микросфер с вирусными частицами и детектирующими антителами реакционные смеси порциями переносили в лунки планшета MultiScreen HTS BV FilterPlate (MSBVN1210: Millipore, США), мембрана которого имела диаметр пор 1.2 мкм. Планшет помещали в устройство вакуумного фильтрования Bio-Dot® Microfiltration Apparatus (1706545; Bio-Rad, США) и присоединяли к водоструйному насосу для удаления жидкости с несвязавшимися компонентами смеси. Микросферы, собранные в лунках планшета, промывали буфером для разведения, трижды наполняя этим буфером лунки и удаляя его путем фильтрования. При использовании детектирующих антител, модифицированных биотином, антитела добавляли до конечной концентрации 5 мкг/мл. Пробы инкубировали и отмывали так же, как описано выше, после чего микросферы суспендировали в 100 мкл буфера для разведения с добавлением конъюгата SA-PE в концентрации 1 мкг/мл (SA-5207; Vector Laboratories, США) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте. Далее микросферы промывали, как описано выше, после чего планшет отсоединяли от фильтровальной системы, содержимое экспериментальных лунок суспендировали в 100 мкл буфера для разведения и переносили в пробирки для дальнейшего анализа методом проточной цитофлуориметрии. Анализ проводили на приборе BD Accuri C6 (BD Biosciences, США), имеющем лазеры с длинами волн для возбуждения флуорофоров 488 и 640 нм. Детекцию флуоресцентного сигнала AlexaFluor 488 осуществляли при использовании стандартного оптического фильтра FL-1: 533/30 нм, фикоэритрина (PE) – FL-2: 585/40 нм. Образцы подавали в анализатор при скорости потока 14 мкл/мин. Пул микросфер визуализировали на двумерной гистограмме, созданной на основе измерения прямого и бокового рассеяния. После этого строили графики зависимости содержания вирусных частиц в растворе от среднего значения интенсивности флуоресценции (MFI) при 533/30 нм в случае AlexaFluor 488 и 585/40 нм в случае фикоэритрина. Буфер для разведения без добавления аналита использовали в качестве отрицательного контроля. Согласно вышеописанной методике с использованием детектирующей пары Bt-3, в качестве антитела захвата, конъюгированного с функциональными микросферами (558582, BD), и Bt-28, в качестве детектирующего антитела, были получены данные для калибровочного графика (рис. 3).

Проанализировано 10 экспериментальных точек с разведениями с шагом "десять" как в буфере для разведения, так и в сыворотке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан эффективный тест непрямой иммунофлуоресценции на основе моноклональных антител к VP7 вируса блютанга. РНИФ может быть успешно использована для скрининга BTVинфицированных клеток в вирусной диагностике и фундаментальных исследованиях. Разработан тест на основе флуоресцентных микросфер для количественного определения BTV методом проточной цитометрии с использованием охарактеризованных mAb к VP7 BTV. Детектирующая пара mAb – конъюгированные с флуоресцентными микросферами Bt-3 (антитела захвата) + биотинилированные Bt-28 (антитела детекции) — выявляла вирусные частицы BTV вплоть до концентрации 10^{-0.25} ТЦД₅₀/мл, в сыворотке бычьей крови чувствительность определения составила 10^{0.75} ТЦД₅₀/мл.

В работе продемонстрировано, что mAb к VP7 ВTV могут быть использованы в диагностических методах: сэндвич-ИФА, РНИФ и проточной вирометрии. Показано, что проточный вирометрический анализ BTV на основе флуоресцентных микросфер чувствителен, не требует выделения вируса и позволяет обнаруживать его непосредственно в биологических жидкостях, что дает преимущество для диагностики BTV и быстрого скрининга поголовья сельскохозяйственных животных.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в соответствии с государственным заданием РАН АААА-А19-119050790041-1, тема 0101-2019-0038.

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

 Mertens P.P.C., Maan S., Samuel A., Attoui H. // In: Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses / Eds. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J.,

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 48 № 5 2022

Desselberger U., Ball L.A. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. P. 466–483.

- Maan S., Maan N.S., Belaganahalli M.N., Potgieter A.C., Kumar V., Batra K., Wright I.M., Kirkland P.D., Mertens P.P.C. // PLoS One. 2016. V. 11. P. e0163014. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163014
- Mertens P.P.C., Diprose J., Maan S., Singh K.P., Attoui H., Samuel A.R. // Vet. Ital. 2004. V. 40. P. 426–437.
- Mellor P.S., Carpenter S., Harrup L., Baylis M., Mertens P.P. // Prev. Vet. Med. 2008. V. 87. P. 4–20. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.06.002
- Blacksell S.D., Lunt R.A. // J. Virol. Methods. 1993. V. 44. P. 241–250. https://doi.org/10.1016/0166-0934(93)90059-z
- 6. *Hamblin C.* // Vet. Ital. 2004. V. 40. P. 538–545.
- Clavijo A., Heckert R.A., Dulac G.C., Afshar A. // J. Virol. Methods. 2000. V. 87. P. 13–23. https://doi.org/10.1016/s0166-0934(00)00150-6
- Nunamaker R.A., Ellis J.A., Wigington J.G., Maclachlan N.J. // Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol. 1992. V. 101. P. 471–476. https://doi.org/10.1016/0300-9629(92)90496-d
- Zientara S., Sailleau C., Bréard E., Viarouge C., Doceul V., Vitour D. // Vet. Ital. 2015. V. 51. P. 393–399. https://doi.org/10.12834/VetIt.512.3148.2
- Wilson W.C., Ma H.C., Venter E.H., van Djik A.A., Seal B.S., Mecham J.O. // Virus Res. 2000. V. 67. P. 141–151. https://doi.org/10.1016/s0168-1702(00)00138-6
- 11. Breard E., Garnier A., Despres P., Boisseau S.B., Comtet L.,
- Viarouge C., Bakkali-Kassimi L., Pourquier P., Hudelet P., Vitour D., Rossi S., Belbis G., Sailleau C., Zientara S. // Transboundary and Emerging Diseases. 2017. V. 64. P. 1837–1847.

https://doi.org/10.1111/tbed.12578

- Stott J.L., Barber T.L., Osburn B.I. // Am. J. Vet. Res. 1985. V. 46. P. 1043–1049.
- Руденко Н.В., Каратовская А.П., Цфасман И.М., Бровко Ф.А., Васильева Н.В. // Биоорг. химия. 2017. Т. 43. С. 501–506. [Rudenko N.V., Karatovskaya A.P., Tsfasman I.M., Brovko F.A., Vasilyeva N.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2017. V. 43. P. 526–530.] https://doi.org/10.1134/S1068162017050119
- Reyes J.L.Z., Aguilar H.C. // Methods. 2018. V. 134– 135. P. 87–97.
- https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.12.011
- 15. *Lippé R.* // J. Virol. 2018. V. 92. P. e01765-17. https://doi.org/10.1128/JVI.01765-17
- Yan X., Zhong W., Tang A., Schielke E.G., Hang W., Nolan J.P. // Anal. Chem. 2005. V. 77. P. 7673–7678. https://doi.org/10.1021/ac0508797
- Arakelyan A., Fitzgerald W., Margolis L., Grivel J.-C. // J. Clin. Invest. 2013. V. 123. P. 3716–3727. https://doi.org/10.1172/JCI67042
- Arakelyan A., Fitzgerald W., King D.F., Rogers P., Cheeseman H.M., Grivel J.-C., Shattock R.J., Margolis L. // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 948. https://doi.org/10.1038/s41598-017-00935-w
- Zicari S., Arakelya A., Fitzgerald W., Zaitseva E., Chernomordik L.V., Margolis L., Grivel J.-C. // Virol. J. 2016. V. 488. P. 20–27. https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.10.021

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 48 № 5 2022

- Руденко Н.В., Каратовская А.П., Шепеляковская А.О., Замятина А.В., Бровко Ф.А., Стрижакова О.М., Лыска В.М., Мима К.А., Иматдинов А.Р., Иматдинов И.Р., Кольцов А.Ю., Малоголовкин Н.И., Колбасов Д.В. // Биоорг. химия. 2019. Т. 45. С. 1–10. [Rudenko N.V., Karatovskaya A.P., Shepelyakovskaya A.O., Zamyatina A.V., Brovko F.A., Koltsov A.Yu., Imatdinov I.R., Imatdinov A.R., Strijakova O.M., Mima K.A., Lyska V.M., Kolbasov D.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 505–513.] https://doi.org/10.1134/S1068162019060347
- Grimes J.M., Burroughs J.N., Gouet P., Diprose J.M., Malby R., Zientara S., Mertens P.P., Stuart D.I. // Nature. 1998. V. 395. P. 470–478. https://doi.org/10.1038/26694
- Hewat E.A., Booth T.F., Roy P.J. // Struct. Biol. 1992.
 V. 109. P. 61–69. https://doi.org/10.1016/1047-8477(92)90068-1
- Lewis S.A., Grubman M.J. // Virus Res. 1990. V. 16. P. 17–26. https://doi.org/10.1016/0168-1702(90)90040-i
- 24. Wang L.F., Hyatt A.D., Whiteley P.L., Andrew M., Li J.K.-K., Eaton B.T. // Arch. Virol. 1996. V. 141. P. 111–123. https://doi.org/10.1007/BF01718592
- Karatovskaya A.P., Rudenko N.V., Tsfasman I.M., Guseva K.A., Laman A.G., Boziev K.M., Brovko F.A., Vasilyeva N.V. // Proc. Biochem. 2016. V. 51. P. 1521–1526. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.06.009
- Руденко Н.В., Аббасова С.Г., Гришин Е.В. // Биоорг. химия. 2011. Т. 37. С. 354–360. [Rudenko N.V., Abbasova S.G., Grishin E.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2011. V. 37. P. 316–321.] https://doi.org/10.1134/S1068162011030162
- Verwoerd D.W., Els H.J., De Villiers E.M., Huismans H. // J. Virol. 1972. V. 10. P. 783–794. https://doi.org/10.1128/JVI.10.4.783-794.1972
- Rojas J.M., Rodríguez-Martín D., Martín V., Sevilla N. // Veterinary Medicine: Research and Reports. 2019. V. 10. P. 17–27. https://doi.org/10.2147/VMRR.S163804
- Martinelle L., Dal Pozzo F., Thys C., De Leeuw I., Van Campe W., De Clercq K., Thiry E., Saegerman C. // Vet. Res. 2018. V. 49. P. 63. https://doi.org/10.1186/s13567-018-0556-4
- Троценко Н.И. // Практикум по ветеринарной вирусологии / Под ред. Белоусовой Р.В., Троценко Н.И., Преображенской Е.А. Москва: Колос, 2013. С. 248.
- Hay F.C., Westwood O.M.R. // In: Practical Immunology, 4th ed. / Eds. Hay F.C., Westwood O.M.R., Nelson P.N. Oxford: Blackwell Science, 2002. P. 1–39, 133–134.
- Velázquez-López I., León-Cruz E., Pardo J.P., Sosa-Peinado A., González-Andrade M. // Anal. Biochem. 2016. V. 516. P. 13–22. https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.10.011

Detection of Bluetongue Virus by Microspheres Coupled with the Monoclonal Antibodies to Group-Specific VP7 by Flow Virometry

N. V. Rudenko^{*, #}, A. P. Karatovskaya^{*}, A. V. Zamyatina^{*}, A. S. Malogolovkin^{**, ****}, V. A. Oleinikov^{***}, F. A. Brovko^{*}, A. U. Koltzov^{**}, O. G. Lapteva^{**}, D. V. Kolbasov^{**}, and A. O. Shepelyakovskaya^{*}

[#]*Phone*: +7(926) 592-11-89; e-mail: nrudkova@mail.ru

*Pushchino Branch, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, prosp. Nauki 6, Pushchino, 142290 Russia

** Federal Research Center for Virology and Microbiology, ul. Acad. Bakoulova 1, pos. Volginsky, 601125 Russia

***Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences,

ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

****Sirius University of Science and Technology, Krasnodarskii Krai, federal Olympiskiy prosp. 1, territory "Sirius", Sirius, 354340 Russia

Bluetongue is a re-emerging transmissive infectious disease that threatens all countries with intensive livestock production. Bluetongue in cattle is often asymptomatic with a long-lasting viremic phase, which makes the virus diagnostics an important tool for disease control and eradication. Methods for detecting viral particles by immunofluorescence of infected cells bluetongue, sandwich enzyme immunoassay, and flow virometry have been developed on the basis of high-affinity monoclonal antibodies to the VP7 (viral protein 7). The lowest analytical sensitivity ($10^{-0.25}$ TCID₅₀/mL (tissue cytopathogenic dose)) was demonstrated with flow fluorimetry assay. The possibility of rapid and efficient detection of viral particles in animal biological fluids by flow virometry was demonstrated in a model system when determining BTV in the blood serum of cattle, the analytical sensitivity of the determination was $10^{0.75}$ TCID₅₀/mL.

Keywords: bluetongue virus (BTV), viral protein 7 (VP7), enzyme immunoassay, immunofluorescence, monoclonal antibodies, flow virometry



—— ПИСЬМА РЕДАКТОРУ —

УДК 577.2:577.113.4

БИОЧИП С АГАРОЗНЫМИ МИКРОЯЧЕЙКАМИ, СОДЕРЖАЩИМИ ТЕРМООТЩЕПЛЯЕМЫЕ ПРАЙМЕРЫ

© 2022 г. А. М. Золотов*, Р. А. Мифтахов*, А. Ю. Иконникова*, С. А. Лапа*, В. Е. Кузнецова*, В. А. Василисков*, В. Е. Шершов*, А. С. Заседателев*, Т. В. Наседкина*, А. В. Чудинов*,

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32

Поступила в редакцию 17.12.2021 г. После доработки 28.12.2021 г. Принята к публикации 30.12.2021 г.

Разработан способ иммобилизации коротких последовательностей ДНК в агарозных ячейках, закрепленных на поверхности полимерной подложки, с последующим частичным отщеплением ДНК от агарозы при нагревании с сохранением функциональных свойств. Эффективность метода была продемонстрирована на олигонуклеотидах, сохранивших после отщепления от агарозы способность участвовать в качестве праймеров в ПЦР-амплификации участка последовательности 7-го экзона гена *ABO* человека.

Ключевые слова: модификация агарозы, терморасщепляемые линкеры, иммобилизация олигонуклеотидов **DOI:** 10.31857/S0132342322040200

введение

Амплификация нуклеиновых кислот позволяет исследовать ультрамалые количества исходного генетического материала и широко используется в молекулярно-генетических исследованиях, а также в клинической диагностике. Сочетание ПЦР и параллельного множественного анализа продуктов ПЦР стало основным трендом современных высокопроизводительных молекулярнобиологических исследований, в том числе технологии биологических микрочипов (microarray) [1] и секвенирования нового поколения (NGS) [2]. В последнее время интенсивно развивается технология микроанализа ДНК, в которой ПЦР и регистрация результатов ПЦР совмешены в одном микроустройстве [3, 4]. Направление получило название "лаборатория на чипе" (Lab on Chip) [5]. Технология "лаборатории на чипе" рассматривается как одно из основных направлений в развитии мирового тренда – диагностики на месте оказания помощи (Point-of-care Diagnostics) [6]. При реализации данного направления используют разные методические и инструментальные подходы с применением различных полимерных материалов, с последующим направленным изменением свойств поверхности и свойств материалов в результате физического, химического или биологического воздействия. Такие материалы с программируемыми свойствами стали называть "умными" (smart) материалами [7]. Метод получения прочно связанных с полимерной подложкой агарозных ячеек с иммобилизованными олигонуклеотидами, которые способны отщепляться при нагревании и участвовать в амплификации в качестве праймеров, открывает новые возможности для разработки технологий микроанализа нуклеиновых кислот "лаборатория на чипе".

Цель данной работы — разработка метода получения кросс-сшитых агарозных ячеек, связанных ковалентными связями с полимерной подложкой и содержащих иммобилизованные термоотщепляемые от агарозы олигонуклеотиды, которые после термоотщепления могут участвовать в ПЦР в качестве праймеров.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе получали карбоксиметилированную агарозу в результате реакции агарозы с хлоруксусной кислотой в щелочных условиях, затем вводили фрагменты метакриловой кислоты с помощью реакции с ангидридом метакриловой кислоты по сохранившимся гидроксильным группам. Последующая обработка бромуксусной кислотой и триэтиламином приводила к образованию связанного с агарозой полигликолевого линкера с концевой карбоксильной группой по методу, описанному в работе Pinkus [8] (схема 1). Условия модификации агарозы оптимизировали

Сокращения: ПЭТ – полиэтилентерефталат; ЦОС – циклоолефиновый сополимер.

[#] Автор для связи (тел.: +7 (499) 135-98-00; эл. почта: chud@eimb.ru).

с контролем степени модификации агарозных звеньев углеводного полимера. Агароза после модификации сохраняет способность к термозависимому фазовому переходу плавления—гелеобразования, а добавление хаотропных реагентов позволяет регулировать температурные границы этих переходов, солюбилизировать агарозу и получать раствор при комнатной температуре.



Схема 1. Получение карбоксиметилагарозы (II), метакрилкарбоксиметилагарозы (III) и метакрилкарбоксиполигликольагарозы (IV).

Полимерную подложку изготавливали нанесением тонкого слоя раствора циклоолефинового сополимера (ЦОС) на пленочный полиэтилентерефталат (ПЭТ) центрифугированием (spin coating) с последующим высушиванием и "свариванием" при температуре >150°С. Слой ЦОС прочно держится на поверхности ПЭТ, не отслаивается в условиях термоциклической ПЦР.

Раствор солюбилизированной модифицированной агарозы с метиленбисакриламидом и фотоинициатором бензофеноном в виде матрицы микрокапель наносили иглой робота-манипулятора на поверхность полимерной подложки при комнатной температуре (диаметр иглы 100 мкм, шаг 300 мкм). При фотооблучении происходит кросс-сшивание агарозы с образованием плотных ячеек, связанных ковалентными связями с фотоактивной поверхностью подложки. Карбоксильные группы на полигликолевых линкерах при этом сохраняются. Связывание агарозных ячеек с поверхностью ПЭТ, не покрытого ЦОС, не происходит.

После активации карбоксильные группы связывали пептидной связью с красителем NH₂-Cy5, несущим первичную аминогруппу на гексаметиленовом линкере (схема 2), или парой олигонуклеотидов, несущих на 5'-конце первичную аминогруппу.

Подложку с агарозными ячейками использовали для изготовления неразборного пленочного чипа. Чип изготавливали сборкой, путем склеивания между собой слоев ПЭТ-пленки. Чип содержит внутреннюю герметичную камеру (высота 200 мкм, объем 25 мкл), в которой находятся агарозные ячейки (рис. 1). Ячейки наносили на подложку перед сборкой чипа. Подачу и удаление рабочих растворов производили через отверстия в крышке, и далее растворы по внутренним каналам поступали в камеру. Нагрев растворов в камере чипа осуществляли через подложку и крышку. Регистрацию флуоресцентных сигналов ячеек выполняли через крышку. ПЭТ не поглощает и не флуоресцирует в оптическом диапазоне флуоресценции красителя Су5 [9, 10]. При нагревании при 95°C в TE-буфере (рН 8.0) молекулы красителя, связанные с агарозными ячейками на терморасщепляемых линкерах, частично отщепляются (схема 2). За первые 5 мин степень отщепления составляет 42% (рис. 2 и 3). В контроле молекулы красителя, связанные с карбоксиметилированными агарозными ячейками, без специально получаемого полигликолевого линкера, в тех же условиях отщепляются меньше, степень отщепления составляет 11% (рис. 2 и 3). Олигонуклеотиды, связанные с агарозными ячейками, при нагревании также отщепляются и сохраняют специфические функции.



Схема 2. Кросс-сшивание и контроль метакрилкарбоксиполигликольагарозы (IV) по термоотщеплению красителя NH₂-Cy5.



Рис. 1. Схема конструкции пленочного чипа.



До прогрева

После прогрева

Рис. 2. Изображение чипа с агарозными ячейками с иммобилизованным красителем NH₂-Cy5 в свете флуоресценции красителя (возбуждение 650 нм, регистрация 716 нм), полученное на флуоресцентном анализаторе биочипов. (*T*-) – ячейки без термоотщепляемого линкера, (*T*+) – ячейки с термоотщепляемыми линкерами до прогрева и после прогрева в течение 5 мин при 95°C в TE-буфере (pH 8.0), по два ряда в четырех повторах.

Олигонуклеотиды, отщепившиеся от агарозных ячеек, использовали в качестве праймеров в реакции амплификации участка последовательности 7-го экзона гена *ABO* человека, который детерминирует серологический фенотип группы крови ABO. Все агарозные ячейки при этом сохранились на своих местах. Результаты ПЦР контролировали методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле с окрашиванием SYBR Green. На электрофореграмме фиксировался продукт ПЦР соответствующей длины — 124 п.н. (рис. 4), что свидетельствует о сохранении специфических функций олигонуклеотидов после процедуры их иммобилизации в агарозных ячейках чипа с последующим термическим отщеплением от агарозного геля. В данном случае агарозный гель



Рис 3. Средние значения флуоресцентных сигналов агарозных ячеек с иммобилизованным красителем NH₂-Cy5 в свете флуоресценции красителя. (T-) – ячейки без терморасщепляемого линкера, (T+) – ячей-ки с терморасщепляемыми линкерами до и после прогрева в течение 5 мин при 95°C в TE-буфере (pH 8.0).



Рис. 4. Электрофореграмма продуктов амплификации 7-го экзона гена АВО человека в 2%-ном агарозном геле, окрашенном SYBR Green. Длина целевого продукта – 124 п.н; 1 – Маркер длин фрагментов ДНК (pUC19/Msp I; Sileks, Россия); 2 – продукт ПЦР, полученный в камере чипа с ячейками, содержащими праймеры на терморасщепляемых линкерах; 3-продукты ПЦР, полученные в камере чипа с ячейками, которые не активировали; 4 – продукты ПЦР, полученные в камере чипа в присутствии праймеров в растворе (положительный контроль); 5 – продукты ПЦР, полученные в камере чипа с праймерами, которые термически не отщепляются; 6 – продукты ПЦР, полученные в камере чипа без добавления матрицы (отрицательный контроль); 7- продукты ПЦР, полученные в камере чипа без добавления ДНК-полимеразы (отрицательный контроль).

ячеек чипа выступает в роли материала с программируемыми свойствами, "умного" (smart) геля – при нагревании от агарозного геля отщепляются иммобилизованные ранее фрагменты ДНК и участвуют в ПЦР в качестве праймеров.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и оборудование. Использовали образцы бесцветной пленки кристаллического полиэтилентерефталата ПЭТ Э (ГОСТ 24234-80, плотность 1.39 г/см³, молекулярная масса 20000– 40000, размер 25 × 75 мм, толщина 200 мкм); циклоолефиновый сополимер СОС Тораз 5013L-10 (Ticona GmbH, Германия); агарозу 162-0102 (Віо-Rad, США), а также геномную ДНК человека (здорового донора) из коллекции Института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (Москва). В реакции амплификации использовали праймеры: прямой AB F1 NH2-GTC CGT GGA CGT GGA CAT G и обратный AB_R NH₂-CCG GCC СТС GTA GGT GAA, сконструированные с помощью сетевого ресурса Primer-Blast (www.ncbi. nlm.nih.gov/tools/primer-blast). Была использована последовательность 7-го экзона гена АВО человека (GenBank: NM 020469.3).

Флуоресцентные сигналы регистрировали на специализированном флуоресцентном анализаторе биочипов [11] разработки ИМБ РАН (Россия) при длине волны возбуждения, соответствующей Су5 (650 нм), и запирающем фильтре 716 нм.

(20 Карбоксиметилагароза. Агарозу MΓ. 65.8 мкм мономерных звеньев) в смеси с *i*-PrOH (300 мкл) и 4 М NaOH (100 мкл) суспендировали на встряхивателе Vortex Genie 2T (Scientific Industries, США) в течение 1 ч при комнатной температуре, добавляли раствор хлоруксусной кислоты (6.2 мг, 65.8 мкм) в *i*-PrOH (100 мкл), прогревали при 60°С 15 мин при перемешивании на термошейкере TS-100С (Biosan, Латвия). Охлаждали до комнатной температуры, нейтрализовали ледяной уксусной кислотой, промывали 0.1 М HCl, далее последовательно промывали 50, 75 и 87.5%ным раствором *i*-PrOH в воде и 100%-ным *i*-PrOH, сушили в вакууме.

Метакрилаткарбоксиметилагароза. К раствору полученной карбоксиметилагарозы в DMF (500 мкл) при 4°C и перемешивании добавляли DIPEA (1.39 мкл, 8 мкм) и метакриловый ангидрид (1.23 мкл, 8.2 мкм). Смесь перемешивали 3 ч при 4°C и дополнительно 3 ч при 25°C. Продукт осаждали ацетоном, промывали 96%-ным EtOH, сушили в вакууме.

Метакрилатполигликолькарбоксиметилагароза. К раствору полученной метакрилаткарбоксиметилагарозы в DMF (500 мкл) при перемешивании добавляли Et_3N (10 мкл), через 30 мин добавляли бромуксусную кислоту (15 мг, 108.6 мкм), Et_3N (5 мкл) и дополнительно перемешивали 1 ч при 25°С. Продукт осаждали и многократно промывали 50%-ным EtOH, промывали последовательно 50, 75 и 87.5%-ным раствором EtOH в воде и 96%-ным EtOH, высушивали в вакууме.

Матрица ячеек кросс-сшитой модифицированной агарозы. К полученной метакрилатполигликолькарбоксиметилагарозе добавляли раствор бензофенона (2.5 мг, 0.35 мкм) и N, N'-метиленбисакриламида (5 мг, 32.4 мкм) в ДМФА (250 мкл), перемешивали 20 мин, добавляли воду (250 мкл), перемешивали. Полученный раствор модифицированной агарозы использовали для капельного нанесения иглой робота-манипулятора (QArray, Genetix, Англия) на подготовленную полимерную подложку. Подложку с матрицей агарозных капель охлаждали при -18°C в течение 30 мин, раствор при этом переходит в состояние геля. Подложку с ячейками облучали УФ-светом с помощью осветителя люминесцентного ОИ-18А с кварцевой ртутной лампой сверхвысокого давления ДРК-120 в течение 12 мин, затем многократно промывали смесью диоксан/ДМФА (1:1).

Активация карбоксильных групп в агарозных ячейках. Над ячейками на подложке формировали разборную камеру объемом 25 мкл. В камеру вносили 0.1 М раствор активатора TSTU и 0.1 М раствор диизопропилэтиламина (DIPEA) в 25 мкл смеси диоксан/ДМФА (1 : 1), инкубировали 1 ч при комнатной температуре, раствор удаляли, промывали смесью диоксан/ДМФА (1 : 1).

Иммобилизация красителя и олигонуклеотидов. В камеру вносили 25 мкл раствора красителя NH_2 -Cy5 или пары олигонуклеотидов AB_F1 и AB_R , каждый в концентрации 1 мкМ в 0.1 М карбонатном буфере (pH 9.2), инкубировали при 4°C в течение ночи, удаляли раствор, многократно промывали 30%-ным ацетонитрилом в 0.1 М триэтиламмонийацетатном (TEAA) буфере (pH 7.0).

Отщепление красителя от агарозных ячеек. Подложку с агарозными ячейками, в которых иммобилизован краситель Су5, использовали для изготовления неразборного пленочного чипа. Через отверстие в крышке в камеру подавали ТЕ-буфер (pH 8.0), прогревали при 95°С. Флуоресцентные сигналы ячеек до и после прогрева регистрировали через крышку и слой жидкости при комнатной температуре на специализированном анализаторе биочипов [9] разработки ИМБ РАН (Россия) при длине волны возбуждения, соответствующей Су5 (650 нм), и запирающем фильтре 716 нм (рис. 2).

ПЦР с олигонуклеотидами, отщепившимися от агарозных ячеек. Для изготовления пленочного чипа использовали подложку с иммобилизованными в агарозных ячейках олигонуклеотидами. Камеру чипа через отверстия в крышке заполняли реакционной смесью (30 мкл), которая содержала 1.5 ед. Таq-полимеразы (Thermo Scientific, США) в буфере той же фирмы, dNTP в концентрации 400 мкМ каждого и геномную ДНК человека в количестве 10 нг в качестве матрицы.

Реакцию проводили на ДНК-амплификаторе ТGradient (Віотеtra, США) для *in situ* ПЦР при следующих условиях: 95° С – 3 мин (начальная денатурация); 36 циклов: 95° С – 20 с, 60° С – 30 с, 72° С – 40 с; далее 72° С – 5 мин (завершающая инкубация). Реакционную смесь через отверстия в крышке извлекали из чипа, упаривали в вакууме досуха, растворяли в минимальном объеме деионизированной H₂O и анализировали методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле с окрашиванием SYBR Green.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработаны методы изготовления полимерной подложки с фотоактивной поверхностью и введения в природный полимер, агарозу, химических групп, придающих агарозе новые дополнительные свойства, с сохранением способности к термозависимому фазовому переходу плавления-гелеобразования. Добавление хаотропных реагентов позволяет солюбилизировать агарозу и получать раствор при комнатной температуре. Модифицированная агароза прибрела способность при УФ-облучении образовывать термически стойкие ячейки. прочно связываться с подложкой, ковалентно связывать олигонуклеотиды, которые могут быть отшеплены от агарозы по команле, полаваемой путем нагрева. Молификация агарозы позволяет получить "умный" гель, который выполняет подаваемую с помошью нагрева команду и отщепляет присоединенные к гелю целевые фрагменты ДНК с сохранением их функциональных свойств — они могут использоваться в ПЦР в качестве праймеров.

Разработанные методы решают часть задач, необходимых для реализации технологии изготовления матрицы закрепленных на подложке агарозных ячеек — микрореакторов, предназначенных для проведения в каждой ячейке термоциклической ПЦР с общей анализируемой смесью ДНК по единому термоциклу, но с различными парами праймеров в каждой ячейке, с изоляцией ячеек от внешней среды, исключением массообмена между ячейками при термоциклировании и одновременным микроскопическим контролем результатов.

Найденные решения могут быть использованы при разработке технологии параллельного множественного микроанализа образцов ДНК для выявления соматических и инфекционных заболеваний человека.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-04-00680).

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

- Gryadunov D., Dementieva E., Mikhailovich V., Nasedkina T., Rubina A., Savvateeva E., Fesenko E., Chudinov A., Zimenkov D., Kolchinsky A., Zasedatelev A. // Expert Rev. Mol. Diagn. 2011. V. 11. P. 839–853. https://doi.org/10.1586/erm.11.73
- Mardis E.R. // Annu. Rev. Anal. Chem. 2013. V. 6. P. 287–303. https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-062012-092628
- Andreadis J.D., Chrisey L.A. // Nucleic Acids Res. 2000. V. 28. P. e5. https://doi.org/10.1093/nar/28.2.e5
- Wu Z., Bai Y., Cheng Z., Liu F., Wang P., Yang D., Li G., Jin Q., Mao H., Zhao J. // Biosens. Bioelectron. 2017. https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.05.021
- Ahrberg C.D., Manz A., Chung B.G. // Lab on Chip. 2016. V. 16. P. 3866–3884. https://doi.org/10.1039/c6lc00984k
- Primiceri E., Chiriacò M.C., Notarangelo F.M., Crocamo A., Ardissino D., Cereda M., Bramanti A.P., Bianchessi M.A., Giannelli G., Maruccio G. // Sensors. 2018. V. 18. P. 3607. https://doi.org/10.3390/s18113607
- English M.A., Soenksen L.R., Gayet R.V., de Puig H., Angenent-Mari N.M., Mao A.S., Nguyen P.Q., Collins J.J. // Science. 2019. V. 365. P. 780–785. https://doi.org/10.1126/science.aaw5122
- Pinkus A.G. // J. Polymer Sci.: Polymer Chem. Ed. 1984. V. 22. P. 1131–1140. https://doi.org/10.1002/pol.1984.170220513
- Мифтахов Р.А., Лапа С.А., Шершов В.Е., Заседателева О.А., Гусейнов Т.О., Спицын М.А., Кузнецова В.Е., Мамаев Д.Д., Лысов Ю.П., Барский В.Е., Тимофеев Э.Н., Заседателев А.С., Чудинов А.В. // Биофизика. 2018. Т. 63. С. 661–668. https://doi.org/10.1134/S000630291804004X
- Мифтахов Р.А., Лапа С.А., Кузнецова В.Е., Золотов А.М., Василисков В.А., Шершов В.Е., Суржиков С.А., Заседателев А.С., Чудинов А.В. // Биоорг. химия. 2021. Т. 47. С. 841–844. [Miftakhov R.A., Lapa S.A., Kuznetsova V.E., Zolotov A.M., Vasiliskov V.A., Shershov V.E., Surzhikov S.A., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2021. V. 47. P. 1345– 1347.]

https://doi.org/10.1134/S1068162021060182

 Lysov Yu., Barsky V., Urasov D., Urasov R., Cherepanov A., Mamaev D., Yegorov Ye., Chudinov A., Surzhikov S., Rubina A., Smoldovskaya O., Zasedatelev A. // Biomed. Opt. Express. 2017. V. 8. P. 114798. https://doi.org/10.1364/BOE.8.004798

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 48 № 5 2022

Biochip with Agarose Microcells Containing Thermally Separable Primers

A. M. Zolotov*, P. A. Miftakhov*, A. Y. Ikonnikova*, S. A. Lapa*, V. E. Kuznetsova*, V. A. Vasiliskov*, V. E. Shershov*, A. S. Zasedatelev*, T. V. Nasedkina*, and A. V. Chudinov^{*, #}

[#]*Phone:* +7(499) 135-98-00; e-mail: chud@eimb.ru

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

A method has been developed for the immobilization of short DNA sequences in agarose cells fixed on the surface of a polymer substrate, with their subsequent partial cleavage from agarose when heated while preserving functional properties. The effectiveness of the method was demonstrated on oligonucleotides, which, after cleavage from agarose, retained the ability to participate as primers in the PCR amplification of the sequence site 7 of the exon of the human *ABO* gene.

Keywords: modification of agarose, thermally cleavable linkers, immobilization of oligonucleotides



——— ПИСЬМА РЕДАКТОРУ ——

УДК 577.218

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ МИОЗИНА НА ЭКСПРЕССИЮ МЕХАНОЗАВИСИМЫХ ГЕНОВ В РАННЕМ РАЗВИТИИ ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ

© 2022 г. П. А. Филенко*, А. А. Чеченина*, А. Г. Зарайский*, Ф. М. Ерошкин*, #

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

> Поступила в редакцию 13.12.2021 г. После доработки 16.12.2021 г. Принята к публикации 24.12.2021 г.

Механические силы, возникающие в развивающихся зародышах, способны распространяться в эмбрионах на значительные расстояния и влиять на экспрессию генов. Изучение механозависимой транскрипции – актуальная задача современной биологии развития. Один из подходов к решению этой задачи – применение низкомолекулярных ингибиторов миозина. В настоящей работе мы изучили методом ОТ-ПЦР влияние четырех ингибиторов миозина – блеббистатина, *S*-нитроблеббистатина, ML-9 и и 2,3-бутандион монооксима – на экспрессию восьми механозависимых генов в ранних зародышах шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. При воздействии ингибиторов миозина наблюдалось изменение уровня экспрессии четырех механозависимых генов: *gsc, myh6, Xbra* и *xmc*. Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что механические силы могут играть роль в передне-задней разметке зародыша *X. laevis*, регулируя экспрессию соответствующих генов.

Ключевые слова: эмбриогенез, механические напряжения, механозависимая транскрипция, цитоскелет, Xenopus laevis

DOI: 10.31857/S0132342322040091

введение

Механические силы играют важную роль в эмбриогенезе, выступая связующим звеном между морфогенезом и клеточной дифференцировкой [1, 2]. В ходе эмбрионального развития они возникают при направленном перемещении клеток внутри зародыша [3–5]. Формируя градиенты, механические напряжения могут служить как своего рода морфогены, влияя на транскрипцию генов. Поиск и изучение механозависимых генов – важные задачи современной биологии развития.

Цель настоящего исследования — подтвердить механозависимый характер регуляции в целых ранних зародышах шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* тех генов, которые ранее были идентифицированы как механозависимые на модели эмбриональных эксплантатов *X. laevis*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами была разработана методика искусственного растяжения фрагментов эмбриональных тканей (эксплантатов) шпорцевой лягушки X. laevis и с помощью высокопроизводительного секвенирования проведено сравнение транскриптомов растянутых и контрольных эксплантатов (неопубликованные данные). Было обнаружено, что растяжение повышает экспрессию генов Xbra, cdx4, myh6 и xmc, которые в норме экспрессируются в задней части зародыша, испытывающей наибольшие механические напряжения, и понижает экспрессию генов *CD82*, *cebpa*, gsc и otx2a, которые в норме экспрессируются в головной части, где механические напряжения отсутствуют [6]. Известно, что данные гены ключевые регуляторы развития соответствующих отделов эмбриона [7–9]. Это подтверждает нашу гипотезу о роли градиента механических сил как регулятора передне-задней разметки зародыша [2]. Однако эксперименты на модели эмбриональных эксплантатов позволяют судить о роли механических натяжений в нормальном развитии лишь косвенно. Помочь ответить на этот вопрос могли бы эксперименты типа "loss-of-function",

Сокращения: БДМ – 2,3-бутандион монооксим; ОТ-ПЦР – обратная транскрипция, сопряженная с полимеразной цепной реакцией; ММК – модифицированный раствор Рингера (Mark's modified Ringer).

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (495) 336-86-11; эл. почта: xenopus.fe@gmail.com).



(a)

Рис. 1. Влияние *S*-нитроблеббистатина (*a*) и 2,3-бутандион монооксима (*б*) на экспрессию изучаемых генов в ранних зародышах шпорцевой лягушки *X. laevis.* Уровень экспрессии в контрольных (необработанных) зародышах принят за единицу. Звездочкой обозначено достоверное изменение уровня экспрессии соответствующих генов (*p* > 0.95). Оранжевые столбцы обозначают активируемые гены, синие – ингибируемые. Планки погрешности отображают стандартное отклонение.

т.е. с ослаблением определенной функции, в нашем случае — механических напряжений.

Поскольку возникновение и распространение механических сил опосредуется перестройкой цитоскелета и актин-миозиновыми сокращениями [10], один из способов сброса механических напряжений в зародыше — применение низкомолекулярных ингибиторов миозина. При этом логично ожидать, что экспрессия механоактивируемых генов будет падать при уменьшении напряжений в зародыше, а механоингибируемых — возрастать. Данный метод успешно применялся в работах по

Мишень	Праймер	Последовательность (5'-3')
ODC	ODC D	GCCAGTTCTAACAAAGAAACCCA
	ODC R	TCTACGATACGATCCAGCCCA
Xbra	Xbra D	TGCCTAAATAACCACAAACTTCTCC
	Xbra R	ATATAACATACTTTCTCTCCCCGT
cdx4	Cdx4 D	CCCAGTTTGTGGCTGTGTTC
	Cdx4 R	TGGCTGGCTGGTATAAGGAG
myh6	myh6 D	CAAACCCAGTTAGAGGCTGAGA
	myh6 R	GAGCGGTTGGCCTGACTT
хтс	Xmc D	GGATACCCTTTCCCCAACTGA
	Xmc R	TGGACAATTCTGCCTCCAGC
<i>CD82</i>	CD82 D	ATCTGCCCTATGTTGGAGGTG
	CD82 R	CTGTTCTGCCCCTACTGGTC
cebpa	cebpa D	GATCCTTCCAGTTCGGACCA
	cebpa R	GGTCGGGCCTCTGTGTACTT
gsc	Gsc D	TGGCAAGGAGGGTTCATCT
	Gsc R	ATTCCACTTTTGGGCATTTTCT
otx2a	Otx2a D	ATTTTACCCACACAGAACCCT
	Otx2a R	CTCCATCTTTTATCCACCTGCT

Таблица 1. Последовательности праймеров для ОТ-ПЦР в реальном времени

изучению механозависимых генов на зародышах Danio rerio [11] и Nematostella vectensis [12]. Для обработки зародышей X. laevis нами были использованы четыре ингибитора миозина: (—)-блеббистатин, S-нитроблеббистатин, ML-9 и 2,3-бутандион монооксим (БДМ). Данные ингибиторы различаются по механизму действия: (—)-блеббистатин и S-нитроблеббистатин блокируют активируемую актином ATPазу немышечных миозинов [13]; ML-9 блокирует киназу легкой цепи миозина [14]; БДМ ингибирует ATPазную активность моторных доменов миозина II скелетных мышц [15]. Влияние ингибиторов миозина на экспрессию генов оценивали с помощью количественной OT-ПЦР.

Проведенные эксперименты показали, что воздействие (-)-блеббистатином и ML-9 не влияет достоверно на экспрессию изучаемых генов (данные не приведены). что может объясняться особенностями выбранного модельного организма. Воздействие S-нитроблеббистатином увеличивает экспрессию gsc и уменьшает экспрессию *ту*h6 (рис. 1*a*). Воздействие БДМ увеличивает экспрессию Xbra и gsc и уменьшает экспрессию *хтс* (рис. 16). Из полученных результатов можно сделать несколько выводов. Во-первых, изменения экспрессии генов gsc, myh6 и xmc совпадают с ожидаемыми, что подтверждает их механозависимую природу. Во-вторых, несколько неожиданная активация экспрессии Xbra под действием БДМ, возможно, объясняется побочными эффектами БДМ [16]. В-третьих, различия в эффектах разных ингибиторов миозина указывают на различия в механизмах регуляции разных генов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для приготовления растворов блеббистатин (кат. № 203391; Sigma-Aldrich, США), S-нитроблеббистатин (кат. № 13891; Cayman Chemichal, США) и ML-9 (кат. № С1172; Sigma-Aldrich, США) разводили в DMSO до конечной концентрации 10 мМ. Эмбрионы X. laevis инкубировали до стадии ранней гаструлы в растворе 0.1× MMR (модифицированный раствор Рингера) по стандартной методике [9], затем в среду добавляли ингибиторы миозина в конечной концентрации 50 мкМ ((–)-блеббистатин, *S*-нитроблеббистатин и ML-9) и 25 мМ (БДМ (кат. № 31550; Sigma-Aldrich, США)). Чтобы избежать выпадения в осадок блеббистатина, раствор готовили по методике Swift et al. [17]: в темноте, с использованием предварительно нагретого до 42-43°С раствора 0.1× MMR. Раствор БДМ готовили непосредственно перед применением. После добавления ингибиторов эмбрионы инкубировали 6 ч при комнатной температуре в темноте. Затем из них выделяли тотальную РНК с использованием реагента ЕхtractRNA (кат. № ВС032; Евроген, Россия). Изменения в экспрессии генов количественно оценивали при помощи ОТ-ПЦР в реальном времени в присутствии интеркалирующего красителя SybrGreen по ранее опубликованной методике [18], последовательности праймеров приведены в табл. 1. Каждый эксперимент проводили в 6-12 повторностях, статистическую достоверность результатов оценивали по *t*-критерию Стьюдента (p > 0.95).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, методом ОТ-ПЦР нами изучено влияние влияние четырех ингибиторов миозина – блеббистатина, S-нитроблеббистатина, ML-9 и 2.3-бутандион монооксима – на экспрессию восьми механозависимых генов в ранних зародышах шпорцевой лягушки X. laevis. Эти гены ранее были идентифицированы нами как механозависимые на модели эмбриональных эксплантатов X. laevis. В настояшей работе показано, что при воздействии ингибиторов миозина изменялся уровень экспрессии четырех генов: gsc, myh6, Xbra и хтс. Важно отметить, что головные, механически ингибируемые гены (*CD82* и gsc) активируются при фармакологической релаксации, в то время так туловищные, механически активируемые гены (*mvh6* и *xmc*), наоборот, подавляются, что логично согласуется с прочими данными и подтверждает механозависимый характер регуляции этих генов в целых ранних зародышах X. laevis. Полученные результаты подкрепляют наше предположение о роли механических натяжений в передне-задней разметке зародыша [2].

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-04-00892).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Agarwal P., Zaidel-Bar R. // Curr. Opin. Cell Biol. 2021. V. 68. P. 1–9. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.08.007
- Eroshkin F.M., Zaraisky A.G. // Genesis. 2017. V. 55. P. 4. https://doi.org/10.1002/dvg.23026
- Moore S.W., Keller R.E., Koehl M.A. // Development. 1995. V. 121. P. 3131–3140. https://doi.org/10.1242/dev.121.10.3131
- Sutlive J., Xiu H., Chen Y., Gou K., Xiong F., Guo M., Chen Z. // Small. 2021. P. e2103466. https://doi.org/10.1002/smll.202103466

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 48 № 5 2022

- Бредов Д.В., Володяев И.В., Лучинская Н.Н. // Онтогенез. 2021. Т. 52. С. 317–328. [Bredov D.V., Volodyaev I.V., Luchinskaya N.N. // Russ. J. Develop. Biol. 2021. V. 52. P. 277–286.] https://doi.org/10.31857/S0475145021050025
- Ерошкин Ф.М., Кремнев С.В., Ермакова Г.В., Зарайский А.Г. // Онтогенез. 2018. Т. 49. С. 361–371. [Eroshkin F.M., Kremnev S.V., Ermakova G.V., Zaraisky A.G. // Russ. J. Develop. Biol. 2018. V. 49. Р. 362–369.] https://doi.org/10.1134/S1062360418060024
- Isaacs H.V., Andreazzoli M., Slack J.M. // Evol. Dev. 1999. V. 1. P. 143–152. https://doi.org/10.1046/j.1525-142x.1999.99020.x
- Latinkic B.V., Smith J.C. // Development. 1999. V. 126. P. 1769–1779. https://doi.org/10.1242/dev.126.8.1769
- Ерошкин Ф.М., Байрамов А.В., Ермакова Г.В., Зарайский А.Г., Мартынова Н.Ю. // Биоорг. химия. 2018. Т. 44. С. 303–315. [Eroshkin F.M., Bayramov A.V., Ermakova G.V., Zaraisky A.G., Martynova N.Y. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. P. 310–321.] https://doi.org/10.1134/S1068162018030032
- Discher D.E., Janmey P., Wang Y.L. // Science. 2005. V. 310(5751). P. 1139–1143. https://doi.org/10.1126/science.1116995
- Brunet T., Bouclet A., Ahmadi P., Mitrossilis D., Driquez D., BrunetA., Henry L, Serman F., Béalle G., Ménager C., Dumas-Bouchiat F., Givord D., Yanicostas C., Le-Roy D., Dempsey N.M., Plessis A., Farge E. // Nat. Comm. 2013. V. 4. P. 2821. https://doi.org/10.1038/ncomms3821
- Pukhlyakova E., Aman A.J., Elsayad K., Technau U. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2018. V. 115. P. 6231– 6236. https://doi.org/10.1073/pnas.1713682115
- Straight A.F., Cheung A., Limouze J., Chen I., Westwood N.J., Sellers J.R., Mitchison T.J. // Science. 2003. V. 299(5613). P. 1743–1747. https://doi.org/10.1126/science.1081412
- Saitoh M., Naka M., Hidaka H. // Biochem. Biophys. Res. Comm. 1986. V. 140. P. 280–287. https://doi.org/10.1016/0006-291x(86)91087-9
- Higuchi H., Takemori S. // J. Biochem. 1989. V. 105. P. 638–643. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122717
- Ostap E.M. // J. Muscle. Res. Cell Motil. 2002. V. 23. P. 305–308. https://doi.org/10.1023/a:1022047102064
- Swift L.M., Asfour H., Posnack N.G., Arutunyan A., Kay M.W., Sarvazyan N. // Pflugers Arch. 2012. V. 464. P. 503–512. https://doi.org/10.1007/s00424-012-1147-2
- Мартынова Н.Ю., Паршина Е.А., Ерошкин Ф.М., Зарайский А.Г. // Биоорг. химия. 2020. Т. 46. С. 396–403. [Martynova N.Y., Parshina E.A., Eroshkin F.M., Zaraisky A.G. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 530–536.] https://doi.org/10.31857/S013234232004020X

ФИЛЕНКО и др.

The Effect of Myosin Inhibitors on the Expression of Mechano-Dependent Genes in the Early Development of the Clawed Frog

P. A. Filenko*, A. A. Chechenina*, A. G. Zaraisky*, and F. M. Eroshkin*, #

[#]Phone: +7(495) 336-86-11; e-mail: xenopus.fe@gmail.com *Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

Mechanical forces arising in developing embryos are able to spread over considerable distances in embryos and affect gene expression. The study of mechano-dependent transcription is one of the topical issues of modern developmental biology. One of the approaches to solving this problem is the use of low molecular weight myosin inhibitors. In this paper, we studied by RT-PCR the effect of four myosin inhibitors – blebbi-statin, *S*-nitroblebbistatin, ML-9 and and 2,3-butanedione monooxime – on the expression of eight mechano-dependent genes in early embryos of the clawed frog. When exposed to myosin inhibitors, we observed a change in the expression level of four mechano-dependent genes, namely *gsc, myh6, Xbra*, and *xmc*. These results indicate that mechanical forces can play a role in the anterio-posterior patterning of the embryo by regulating the expression of the corresponding genes.

Keywords: embryogenesis, mechanical stresses, mechano-dependent transcription, cytoskeleton, Xenopus laevis



—— ПИСЬМА РЕДАКТОРУ —

УДК 547.782

СИНТЕЗ И ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОНФОРМАЦИОННО ЗАФИКСИРОВАННОГО ДИАРИЛМЕТЕНОВОГО АНАЛОГА ХРОМОФОРА БЕЛКА GFP

© 2022 г. Н. С. Балеева*, **, #, А. Ю. Смирнов*, **, М. С. Баранов*, **

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

**Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Поступила в редакцию 15.02.2022 г. После доработки 20.02.2022 г. Принята к публикации 23.02.2022 г.

Синтезировано новое конформационно зафиксированное производное хромофора белка GFP – (Z)-5-((2-(дифторборил)-4-(диметиламино)фенил)(4-(диметиламино)фенил)метилен)-2-пропил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он. Установлено, что присутствие незафиксированного арильного заместителя в структуре приводит к снижению яркости флуоресценции и не влияет на положениямаксимумов поглощения и испускания. Перспективным направлением дальнейших исследованийпредставляется замена этого заместителя на различные электронно-акцепторные группы, такие как $нитрильная или CF₃-группа, способные к более эффективному сопряжению с <math>\pi$ -системой молекулы.

Ключевые слова: имидазолоны, хромофоры, флуоресценция DOI: 10.31857/S0132342322050074

введение

Исследования последних десятилетий показывают, что флуоресцентные метки имеют высокую практическую значимость для визуализации и изучения биологических процессов [1]. К синтетическим флуорофорам относятся разные бензилиден-имидазолоны – производные хромофора флуоресцентного белка GFP (Green Fluorescent Protein) [2]. Этот класс веществ представлен большим количеством соединений, имеющих разное химическое строение и, как следствие, характеризующихся разными свойствами. В литературе описан ряд хорошо проработанных методов химического синтеза этих соединений [3].

Важные свойства флуорофоров – способность поглощать и испускать свет в дальнекрасной области спектра и высокий квантовый выход флуоресценции. Хорошо известно, что хромофор GFP и прочие бензилиден-имидазолоны слабо флуоресцируют из-за подвижности бензилиденового фрагмента молекулы [4]. Однако было показано, что этот фрагмент можно жестко зафиксировать, например, с помощью дифторборильного мостика (например, соединение (**Ia**) на рис. 1) или других методов фиксации. Такие модификации позволили многократно увеличить квантовый выход флуоресценции [5–7]. "Красные" бензилиденимидазолоны можно получить путем увеличения сопряженной π -системы (введение стирольных или арилацетиленовых заместителей) [8–11] или расширением ароматической системы за счет аннелирования бензилиденового фрагмента [12–14].

Ранее нами была синтезирована пара аннелированных производных (рис. 1, соединения (Ib) и (Іс)) [12, 15]. Было установлено, что увеличение ароматической системы привело к батохромному сдвигу максимумов абсорбции на 54-65 нм и эмиссии на 50-77 нм относительно немодифицированного производного (Іа). Однако также оказалось, что флуоресценция сохраняется лишь для соединения (Ic), в то время как квантовый выход флуоресценции производного (Ib) не превышает 0.2% (рис. 1). Мы установили, что данное поведение вызвано наличием ковалентной связи между двумя фенильными заместителями в производном (Іb), благодаря которой происходит возникновение дополнительной свободной молекулярной орбитали, флуоресценция из которой невоз-

Сокращения: GFP – зеленый флуоресцирующий белок (Green Fluorescent Protein).

[#]Автор для связи: (тел.: +7 (926) 704-13-72; эл. почта: nsbaleeva@gmail.com).



Рис. 1. Ранее синтезированные дифторборильные производные (I), (II) и их оптические свойства в ацетонитриле.

можна. Вероятно, что удаление этой связи может решить данную проблему и привести к усилению флуоресценции.

Цель настоящей работы — синтез соответствующего диарилметилен-имидазолона, в котором арильные заместители не связаны между собой ковалентной связью, и изучение оптических свойств этого соединения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве модельного нами было выбрано соединение (II) (рис. 1) [16]. Это соединение и его ближайшие аналоги выступают субстратами для флуороген-активирующих белков на основе липокалина и могут применяться в генетически кодируемом мечении [17, 18].

Бензилиден-имидазолон (V) был синтезирован с помощью реакции конденсации кетона (III) и насыщенного имидазолона (IV) в пиридине (схема 1). Конформационно зафиксированное производное (VI) было получено при воздействии трибромида бора на бензилиден-имидазолон (V) в дихлорэтане в присутствии молекулярных сит (схема 1).



Схема 1. Схема синтеза соединений (V) и (VI).

Изучение оптических свойств показало, что новое производное (VI), как и модельное соединение (II), поглощает свет в области 450-480 нм и флуоресцирует в области 530-555 нм (рис. 2, табл. 1). Вероятно, что отсутствие существенной разницы вызвано неполным сопряжением второго арильного заместителя с π -системой молекулы.

Подвижность второго арильного заместителя в структуре соединения (VI) оказала также негативное влияние и на интенсивность флуоресценции. Было установлено, что квантовый выход флуоресценции этого вещества в ацетонитриле не пре-

вышает 0.5%, в то время как квантовый выход соединения (II) составляет 48% (рис. 1).

Полученные результаты говорят о том, что перспективным направлением для дальнейших исследований может быть введение иных групп, более способных к эффективному сопряжению с π -системой молекулы, например, введение не второго арильного заместителя, как в случае соединения (VI), а различных электронно-акцепторных групп, таких как нитрильная или CF₃-группа.


Рис. 2. (*a*) — Нормализованные спектры абсорбции и эмиссии соединения (**VI**) в разных растворителях; (*б*) — нормализованные спектры абсорбции и эмиссии соединений (**VI**) и (**II**) в ацетонитриле.

Растворитель	Соединение	Максимум поглощения, нм	Максимум эмиссии, нм
Этанол	(VI)	449	528
	(II)	496	555
Ацетонитрил	(VI)	478	558
	(II)	485	552
Этилацетат	(VI)	477	541
	(II)	484	538
Диоксан	(VI)	484	540
	(II)	489	532

Таблица 1. Оптические свойства соединений (VI) и (II) в разных растворителях

Примечание: данные для соединения (II) взяты из статьи Baranov et al. [16].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование. Спектры ЯМР (δ , м.д.; *J*, Гц) регистрировали на спектрометре Avance III NMR (700 МГц; Bruker, США) при 303 К в DMSO-*d*₆ (внутренний стандарт – Me₄Si), спектры поглощения – на спектрофотометре Cary 100 Bio (Variап, США), спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США). Температуры плавления определяли на приборе SMP 30 (Stuart Scientific, Великобритания) и не исправляли. Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на приборе micrOTOF II (Bruker, Германия), ионизация электрораспылением.

Синтез 5-(бис(4-(диметиламино)фенил)метилен)-2-пропил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-она (V). В колбу Шленка помещали 4,4'-бис(диметиламино)бензофенон (2.5 г, 9 ммоль), 2-пропил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он (2.3 г, 18 ммоль) и молекулярные сита (1.2 г, 3 Å). Колбу вакуумировали, заполняли аргоном и добавляли 10 мл пиридина. Полученную смесь перемешивали при 120°С в течение 50 ч. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и упаривали. Полученный продукт очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент — хлороформ и этанол, 50 : 1).

Оранжевый порошок (409 мг, 15%); т. пл. 206– 209°С. ¹Н-ЯМР: 10.85 (с, 1Н), 7.31 (д, J_2 9.0, 2Н), 7.03 (д, J_2 8.8, 2Н), 6.68 – 6.63 (м, 4Н), 2.97 (с, 6Н), 2.96 (с, 6Н), 2.37 (т, J_2 7.5, 2Н), 1.64 (секст, J_2 7.4, 2Н), 0.94 (т, J_2 7.4, 3Н). ¹³С-ЯМР: 169.8, 159.3, 150.5, 150.4, 145.1, 134.0, 133.5, 132.4, 127.2, 125.2, 110.8, 110.6, 39.8, 39.7, 31.2, 19.2, 13.6. HRMS (ESI), m/z: найдено M 391.2466; рассчитано для $C_{24}H_{31}N_4O^+$, $[M + H]^+$ 391.2492.

Синтез (Z)-5-((2-(дифторборил)-4-(диметиламино)фенил)(4-(диметиламино)фенил)метилен)-2-пропил-3,5-дигидро-4*Н*-имидазол-4-она **(VI)**. Продукт первой стадии (V) (0.2 г, 0.5 ммоль) смешивали с молекулярными ситами (2 г, 3 Å и 2 г, 4 Å) и трибромидом бора (5 ммоль) в 50 мл дихлорэтана. Полученную смесь кипятили в атмосфере аргона в течение 6 ч. Затем смесь охлаждали и отфильтровывали. Молекулярные сита промывали холодным этанолом (2 × 10 мл) и хлороформом (50 мл). К полученному раствору добавляли раствор НГ (40%, 5 мл) и перемешивали 30 мин. Смесь разбавляли EtOAc (100 мл), промывали насыщенным раствором K₂CO₃ (2 × 50 мл), водой (2 × 50 мл) и насыщенным раствором NaCl (2 × 50 мл). Органические вытяжки высушивали над безводным Na₂SO₄ и упаривали. Полученный продукт очищали методом флеш-хроматографии (элюент – хлороформ и этанол, 20:1).

Красный порошок (22 мг, 10%); т. пл. ~250°С с разложением. ¹Н-ЯМР: 12.58 (с, 1Н), 7.09 (д, J_2 8.6, 2Н), 6.94–6.90 (м, 2Н), 6.78 (д, J_2 8.6, 2Н), 6.59 (дд, J_2 9.1, 2.9, 1Н), 3.03 (с, 6Н), 3.00–2.93 (м, 8Н), 1.78 (секст, J_2 7.5, 2Н), 0.98 (т, J_2 7.3, 3Н). ¹³С-ЯМР: 163.0, 162.7, 151.7, 150.2, 145.6, 132.2, 130.3, 123.7, 120.6, 119.0, 113.7, 111.3, 110.8, 110.8, 39.9, 39.8, 28.5, 19.9, 13.5. HRMS (ESI), m/z: найдено M 439.2480; рассчитано для $C_{24}H_{30}BF_2N_4O^+$, $[M + H]^+$ 439.2475.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе синтезировано новое производное хромофора белка GFP – (Z)-5-((2-(дифторборил)-4-(диметиламино)фенил)(4-(диметиламино)фенил)метилен)-3-метил-2-пропил-3,5дигидро-4*H*-имидзол-4-он. Изучены оптические свойства этого соединения и установлено. что отсутствие жесткой фиксации второго арильного заместителя и вызванное этим неполное сопряжение с π -системой молекулы приводит к резкому снижению интенсивности флуоресценции нового соединения. Вероятно, что эффективной модификацией, направленной на увеличение квантового выхода флуоресценции подобных соединений, будет замена незафиксированного арильного заместителя на различные электронно-акцепторные группы, такие как нитрильная или CF₃-группа, способные к более эффективному сопряжению с π-системой молекулы.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-73-10105).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Sahoo H.* // RSC Adv. 2012. V. 2. P. 7017–7029. https://doi.org/10.1039/C2RA20389H
- Walker C.L., Lukyanov K.A., Yampolsky I.V., Mishin A.S., Bommarius A.S., Duraj-Thatte A.M., Azizi B., Tolbert L.M., Solntsev K.M. // Curr. Opin. Chem. Biol. 2015. V. 27. P. 64–74. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.06.002
 - $\frac{M_{\rm constraint}}{M_{\rm constraint}} = \frac{M_{\rm constraint}}{M_{\rm constraint}} = \frac{M_$
- 3. Baleeva N.S., Baranov M.S. // Chem. Heterocycl. Compd. 2016. V. 52. P. 444–446. https://doi.org/10.1007/s10593-016-1909-4
- Svendsen A., Kiefer H.V., Pedersen H.B., Bochenkova A.V., Andersen L.H. // J. Am. Chem. Soc. 2017. V. 139. P. 8766–8771. https://doi.org/10.1021/jacs.7b04987
- Baranov M.S., Lukyanov K.A., Borissova A.O., Shamir J., Kosenkov D., Slipchenko L.V., Tolbert L.M., Yampolsky I.V., Solntsev K.M. // J. Am. Chem. Soc. 2012. V. 134. P. 6025–6032. https://doi.org/10.1021/ja3010144
- Zaitseva SO., Farkhutdinova D.A., Baleeva N.S., Smirnov A.Y., Zagudaylova M.B., Shakhov A.M., Astafiev A.A., Baranov M.S., Bochenkova A.V. // RSC Adv. 2019. V. 9. P. 38730–38734. https://doi.org/10.1039/c9ra08808c
- Baldridge A., Solntsev K.M., Song C., Tanioka N., Kowalik J., Hardcastle K., Tolbert L.M. // Chem. Commun. 2010. V. 46. P. 5686–5688. https://doi.org/10.1039/B927313A
- Shen B., Qian Yi. // Dyes Pigm. 2019. V. 166. P. 350– 356. https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.03.034
- Baleeva N.S., Myannik K.A., Yampolsky I.V., Baranov M.S. // Eur. J. Org. Chem. 2015. V. 26. P. 5716–5721. https://doi.org/10.1002/ejoc.201500721
- Feng G., Luo C., Yi H., Yuan L., Lin B., Luo X., Hu X., Wang H., Lei C., Nie Z., Yao S. // Nucl. Acids Res. 2017. V. 45 P. 10380–10392. https://doi.org/10.1093/nar/gkx803
- Балеева Н.С., Баранов М.С. // Биоорг. химия. 2017. Т. 43. С. 581–584. [Baleeva N.S., Baranov M.S. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2017. V. 43. P. 612–615.] https://doi.org/10.1134/S106816201705003X
- Baleeva N.S., Khavroshechkina A.V., Zaitseva E.R., Myasnyanko I.N., Zagudaylova M.B., Baranov M.S. // Tetrahedron Lett. 2019. V. 60. P. 150963. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2019.150963
- Huang G., Zhang G., Wu Y., Liao Q., Fu H., Zhang D. // Asian J. Org. Chem. 2012. V. 1. P. 352–358. https://doi.org/10.1002/ajoc.201200086

- 14. *Muselli M., Baudequin C., Perrio C., Hoarau C., Bischoff L. //* Chem. Eur. J. 2016. V. 22. P. 5520–5524. https://doi.org/10.1002/chem.201600602
- Sinenko G.D., Farkhutdinova D.A., Myasnyanko I.N., Baleeva N.S., Baranov M.S., Bochenkova A.V. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 13645. https://doi.org/10.3390/ijms222413645
- 16. Baranov M.S., Solntsev K.M., Baleeva N.S., Mishin A.S., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A., Yampolsky I.V. //

Chem. Eur. J. 2014. V. 20. P. 13234–13241. https://doi.org/10.1002/chem.201403678

- Bozhanova N.G., Baranov M.S., Baleeva N.S., Gavrikov A.S., Mishin A.S. // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. P. 3778. https://doi.org/10.3390/ijms19123778
- Muslinkina L., Gavrikov A.S., Bozhanova N.G., Mishin A.S., Baranov M.S., Meiler J., Pletneva N.V., Pletnev V.Z., Pletnev S. // ACS Chem. Biol. 2020. V. 15. P. 2456– 2465.

https://doi.org/10.1021/acschembio.0c00440

Synthesis and Optical Properties of the Conformationally Locked Diarylmethene Derivative of the GFP Chromophore

N. S. Baleeva*, **, #, A. Yu. Smirnov*, **, and M. S. Baranov*, **

[#]*Phone:* +7 (926) 704-13-72; e-mail: nsbaleeva@gmail.com

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

**Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovitianova 1, Moscow, 117997 Russia

We report novel derivative of the conformationally locked of the green fluorescent protein chromophore – (Z)-5-((2-(difluoroboryl)-4-(dimethylamino)phenyl)(4-(dimethylamino)phenyl)methylene)-2-propyl-3,5-dihydro-4*H*-imidazol-4-on. The presence of an additional aryl substituent in the structure causes a decrease in the fluorescence intensity and does not lead to absorption and emission spectra shift. The promising direction of research is the replacement of this substituent with the electron-withdrawing groups greater conjugation of π -system of the molecule for example the nitrile group or CF₃-group.

Keywords: imidazolones, chromophores, fluorescence

EDN: RROZRA

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2022, том 48, № 5, с. 616–620



——— ПИСЬМА РЕДАКТОРУ ——

УДК 547.789.3

ГАЛОГЕНСОДЕРЖАЩИЕ 4-ГИДРОКСИБЕНЗИЛИДЕН-РОДАНИНЫ КАК ФЛУОРОГЕНЫ ДЛЯ БЕЛКА FAST

© 2022 г. А. И. Соколов^{*, **}, Н. С. Балеева^{*, **, #}, М. С. Баранов^{*, **}

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

**Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова,

Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1 Поступила в редакцию 21.03.2022 г. После доработки 26.03.2022 г. Принята к публикации 02.04.2022 г.

Синтезирован ряд (Z)-5-(4-гидроксибензилиден)-2-тиоксотиазолидин-4-онов, содержащих атомы галогенов в разных положениях бензилиденового фрагмента. Все новые соединения проявляют флуорогенные свойства и образуют флуоресцентные комплексы с белком FAST. Показано, что производные, содержащие атомы галогенов в третьем положении 4-гидроксибензилидена, могут быть использованы в качестве лигандов флуороген-активирующего белка FAST во флуоресцентной микроскопии.

Ключевые слова: роданины, флуорогены, флуороген-активирующие белки, флуоресценция **DOI:** 10.31857/S0132342322050244

введение

Среди генетически кодируемых флуоресцентных меток большую популярность приобретают флуороген-активирующие белки [1, 2]. Такие белки применяют в паре с флуорогенами – небольшими органическими соединениями. Взаимодействие эти двух компонентов приводит к образованию комплекса с яркой флуоресценцией, в то время как по отдельности белок и его лиганд не флуоресцируют. Благодаря такому принципу работы эти белки имеют ряд преимуществ в сравнении с прочими флуоресцентными метками. Применение самомодифицирующихся белков обязательно включает отмывку ярко флуоресцирующего несвязанного флуорофора [3, 4], в то время как при использовании флуороген-активирующих белков стадию отмывки можно исключить, поскольку в свободном виде флуороген не дает фонового сигнала. Другому типу генетически-кодируемых меток – флуоресцентным белкам – для созревания хромофора необходимы дополнительное время и присутствие кислорода [5], тогда как у флуороген-активирующих белков хромофор может быть добавлен в любой момент. Еще одно преимущество флуороген-активирующих белков — их малый размер. В то время как молекулярная масса флуоресцентных белков составляет 26—30 кДа [6], наиболее известный флуороген-активирующий белок FAST имеет массу всего 14 кДа [7], а недавно нами был предложен белок nanoFAST массой всего 10.8 кДа — на данный момент это самая маленькая генетически кодируемая метка [8].

В качестве флуорогенов белка FAST используются различные арилиден-имидазолоны или арилиден-роданины [9-11]. При рассмотрении структур роданиновых лигандов можно увидеть, что введение различных групп в бензилиденовом фрагменте молекулы зачастую не приводит к потере флуорогенных свойств (рис. 1) [9]. Однако такие модификации влияют на флуоресцентные свойства комплекса, в частности происходит батохромное смещение максимумов поглощения и испускания при введении более электронно-донорных заместителей. Поскольку важным свойством флуоресцентных меток. применяемых во флуоресцентной микроскопии, выступает цветовое разнообразие, мы решили ввести другие заместители, изостерические относительно уже существующих флуорогенов, однако обладающие иными электронно-донорными или акцепторными эффектами, и исследовать влияние этих замен на флуорогенные свойства.

¹ Сокращения: HBR – 4-гидроксибензилиден-роданин; HMBR – 4-гидрокси-3-метилбензилиден-роданин; HBR-2,5-DM – 4-гидрокси-2,5-диметилбензилиден-роданин; HBR-3,5-DM – 4-гидрокси-3,5-диметилбензилиденроданин; HBR-3,-OM – 4-гидрокси-3-метоксибензилиденроданин; HBR-3,5-DOM – 4-гидрокси-3,5-диметоксибензилиден-роданин.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (926) 704-13-72; эл. почта: nsbaleeva@gmail.com).



Увеличение батохромного смещения максимумов абсорбции и эмиссии

Максимум абсорбции 467–518 нм Коэффициент экстинкции 39000–50000 М⁻¹ см⁻¹ Максимум эмиссии 527–600 нм Квантовый выход флуоресценции 9–49%



Целью настоящей работы стало создание ряда 4-гидроксибензилиден-роданинов, содержащих разные галогеновые заместители в разных положениях бензилиденового фрагмента, и изучение флуорогенных свойств новых соединений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4-Гидроксибензилиден-роданины (III) были синтезированы путем конденсации насыщенного

роданина (I) с разными галогенсодержащими альдегидами (II). Реакцию проводили в уксусной кислоте в присутствии ацетата натрия при нагревании (схема 1). Изучение оптических свойств полученных производных показало, что все они характеризуются абсорбцией с максимумами в области 380—390 нм. Также было установлено, что эти соединения слабо флуоресцируют (квантовый выход не выше 0.5%) с максимумом ~440—450 нм.



Схема 1. Схема синтеза соединений (III).

Дальнейшие исследования показали, что все полученные соединения проявляют флуорогенные свойства — при смешивании с белком FAST происходит резкое усиление флуоресценции. Наиболее яркое разгорание (в 30—70 раз) было зафиксировано для соединений, имеющих галогеновый заместитель в третьем положении ароматического фрагмента (соединения (**IIIc**-e)), и для дизамещенных аналогов (соединения (**IIIc**-e)), и для дизамещенных аналогов (соединения (**IIIf**-h)). Также мы установили, что новые производные (**III**) хорошо связываются с белком FAST. Значение K_d варьировало от 0.03 до 0.30 мкМ (для известных роданиновых лигандов белка FAST значение K_d составляет 0.01–0.97 мкМ [7, 9]). Для более подробного изучения мы отобрали наиболее перспективных кандидатов на роль новых флуорогенов белка FAST — соединения, которые имеют $K_d < 0.20$ мкМ и при этом разгораются в присутствии белка более чем в 60 раз. В результате была выбрана пара производных, содержащих атомы хлора и брома в третьем положении ароматического кольца (соединения (IIIс) и (IIId) соответственно). Установлено, что при взаимодействии с белком FAST эти соединения образуют флуоресцентные комплексы с максимумом абсорбции ~470 нм и максимумом эмиссии ~530 нм (рис. 2). Оба комплекса характеризуются схожей яркостью: квантовым выходом 11% и коэффициентом экстинкции ~45000 M⁻¹ см⁻¹ (табл. 1).



Рис. 2. Нормализованные спектры абсорбции (зеленые кривые) и эмиссии (красные кривые) комплексов FAST-(**IIIc**) (*a*) и FAST-(**IIId**) (δ) в фосфатном буфере.

Мы сравнили полученные результаты с данными, известными для других роданиновых флуорогенов, и установили, что комплекс FAST-HBR (4-гидроксибензилиден-роданин без заместителей в фенольном кольце) проявляет наиболее схожие свойства [7]. Он поглощает и испускает свет с максимумами 467 и 527 нм соответственно, но с заметно меньшей интенсивностью, чем комплексы FAST-(IIIc) и FAST-(IIId) (табл. 1). Прочие же известные роданиновые комплексы белка FAST характеризуются более длинноволновыми максимумами абсорбции и эмиссии (минимальная разница составляет 15 нм) [9]. Таким образом, модификация роданиновых флуорогенов белка FAST введением атомов брома и хлора в третье положение фенольной группы позволила увеличить цветовую палитру генетически кодируемых флуоресцентных меток на основе белка FAST.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование. Спектры ЯМР (δ , м.д.; *J*, Ги) регистрировали на спектрометре Avance III NMR (700 МГц; Bruker, США) при 303 К в DMSO-*d*₆ (внутренний стандарт – Me₄Si), спектры поглощения – на спектрофотометре Cary 100 Bio (Variап, США), спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США). Температуры плавления определяли на приборе SMP 30 (Stuart Scientific, Великобритания) и не исправляли. Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на приборе micrOTOF II (Bruker, Германия), ионизация электрораспылением.

Белок FAST. Препарат белка FAST получен согласно методике, описанной ранее [9].

(Z)-5-(4-гидроксибензилиден)-2-тиок-Синтез сотиазолидин-4-онов (III). В пробирку с завинчиваюшейся крышкой помешали соответствующий ароматический альдегид (2 ммоль), 2-тиоксотиазолидин-4-он (320 мг, 2.4 ммоль), безводный ацетат натрия (492 мг, 6 ммоль) и 5 мл ледяной уксусной кислоты. Полученную смесь перемешивали при 110°С в течение 2-5 ч. За прохождением реакции следили по ТСХ (элюент – хлороформ и этанол, 50:1). После окончания реакции реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и выливали в 100 мл дистиллированной воды. Полученный раствор подкисляли соляной кислотой (водный раствор, 5%) до рН 2.0. Выпавший осадок отфильтровывали и промывали дистиллированной водой (2 × 30 мл). Полученный продукт перекристаллизовывали из смеси CH₂Cl₂/MeOH (*v*/*v*, 10 : 1) с добавлением *н*-гексана.

(*Z*)-5-(2-Хлор-4-гидроксибензилиден)-2-тиоксотиазолидин-4-он (IIIа). Оранжевый порошок (433 мг, 80%); т. пл. 267–269°С. ¹Н-ЯМР: 6.95 (дд, *J*₂ 8.6, 2.3, 1Н), 7.02 (д, *J*₂ 2.3, 1Н), 7.40 (д, *J*₂ 8.6, 1Н), 7.73 (с, 1Н), 10.83 (с, 1Н), 13.82 (уш. с., 1Н). ¹³С-ЯМР: 115.8, 117.2, 121.3, 124.4, 126.6, 130.9, 136.6, 160.7, 169.3, 195.4. HRMS (ESI), *m/z*: найдено *M*, 269.9455; рассчитано для C₁₀H₅CINO₂S⁻₂, [*M* – H]⁻ 269.9456.

(Z)-5-(2-Бром-4-гидроксибензилиден)-2-тиоксотиазолидин-4-он (IIIb). Оранжевый порошок (120 мг, 19%); т. пл. 234–236°С. ¹Н-ЯМР: 6.98 (дд,

Комплекс	Максимум поглощения, нм	Максимум эмиссии, нм	<i>K</i> _d , мкМ	Коэффициент экстинкции, М ⁻¹ см ⁻¹	Квантовый выход флуоресценции, %
FAST-HBR	467	527	0.62	44000	9
FAST-(IIIc)	469	527	0.14	46 500	11
FAST-(IIId)	470	530	0.13	45 500	11

Таблица 1. Оптические свойства комплексов белка FAST в фосфатном буфере

Примечание: данные для комплекса FAST-HBR взяты из статьи Plamont et al. [7].

 J_2 8.7, 2.5, 1H), 7.19 (д, J_2 2.6, 1H), 7.38 (д, J_2 8.6, 1H), 7.71 (с, 1H), 10.80 (с, 1H), 13.80 (уш. с., 1H). ¹³С-ЯМР: 116.2, 120.4, 122.9, 124.6, 127.5, 129.4, 130.9, 160.6, 169.3, 195.4. HRMS (ESI), *m/z*: найдено *M*, 313.8957; рассчитано для C₁₀H₅BrNO₂S₂⁻, $[M - H]^-$ 313.8951.

(*Z*)-5-(3-Хлор-4-гидроксибензилиден)-2-тиоксотиазолидин-4-он (IIIс). Оранжевый порошок (158 мг, 29%); т. пл. 265–266°С. ¹Н-ЯМР: 7.12 (д, *J*₂ 8.6, 1H), 7.39 (дд, *J*₂ 8.6, 2.3, 1H), 7.55 (с, 1H), 7.65 (д, *J*₂ 2.3, 1H), 11.16 (с, 1H), 13.74 (уш. с., 1H). ¹³С-ЯМР: 117.4, 120.8, 122.8, 125.2, 130.3, 130.8, 132.9, 155.6, 169.3, 195.2. HRMS (ESI), *m/z*: найдено *M*, 269.9455; рассчитано для C₁₀H₅CINO₂S₂⁻, [*M* – H]⁻ 269.9456.

(*Z*)-5-(3-Бром-4-гидроксибензилиден)-2-тиоксотиазолидин-4-он (IIId). Желтый порошок (417 мг, 66%); т. пл. 263–265°С. ¹Н-ЯМР: 7.10 (д, *J*₂ 8.4, 1H), 7.42 (дд, *J*₂ 8.5, 2.3, 1H), 7.54 (с, 1H), 7.78 (д, *J*₂ 2.2, 1H), 11.22 (с, 1H), 13.73 (уш. с., 1H). ¹³С-ЯМР: 110.3, 117.1, 122.7, 125.6, 130.7, 130.9, 136.0, 156.6, 169.3, 195.2. HRMS (ESI), *m/z*: найдено *M*, 313.8957; рассчитано для C₁₀H₃BrNO₂S₂⁻, [*M* – H]⁻ 313.8951.

(*Z*)-5-(3-Фтор-4-гидроксибензилиден)-2-тиоксотиазолидин-4-он (IIIе). Оранжевый порошок (65 мг, 13%); т. пл. 261–263°С. ¹Н-ЯМР: 7.11 (т, *J*₂ 8.7, 1Н), 7.27 (дд, *J*₂ 8.4, 2.2, 1Н), 7.45 (дд, *J*₂ 12.2, 2.3, 1Н), 7.56 (с, 1Н), 10.85 (с, 1Н), 13.74 (уш. с., 1Н). ¹³С-ЯМР: 118.6, 122.8, 124.6 (д, *J*₂ 6.6), 127.6, 131.1, 132.9 (д, *J*₂ 3.7), 147.9 (д, *J*₂ 11.7), 151.0 (д, *J*₂ 243.2), 169.4, 195.3. HRMS (ESI), *m/z*: найдено *M*, 253.9753; рассчитано для C₁₀H₅FNO₂S⁻₂, [*M*−H]⁻ 253.9751.

(*Z*)-5-(3,5-Дихлор-4-гидроксибензилиден)-2тиоксотиазолидин-4-он (IIIf). Желтый порошок (202 мг, 33%); т. пл. 268–269°С. ¹Н-ЯМР: 7.53 (с, 1Н), 7.57 (с, 2Н), 11.21 (уш. с., 1Н), 13.69 (уш. с., 1Н). ¹³С-ЯМР: 122.8, 124.7, 125.8, 129.1, 130.3, 151.0, 169.0, 194.7. HRMS (ESI), *m/z*: найдено *M*, 303.9072; рассчитано для C₁₀H₄Cl₂NO₂S⁻₂, [*M* – H]⁻ 303.9066.

(*Z*)-5-(3,5-Дибром-4-гидроксибензилиден)-2тиоксотиазолидин-4-он (IIIg). Оранжевый порошок (120 мг, 19%); т. пл. 310–321°С с разложением. ¹Н-ЯМР: 7.54 (с, 1Н), 7.75 (с, 2Н), 10.95 (уш. с., 1Н), 13.77 (уш. с., 1Н). ¹³С-ЯМР: 112.4, 124.8, 127.4, 129.0, 134.1, 152.9, 169.1, 194.8. HRMS (ESI), *m/z*: найдено *M*, 393.8041; рассчитано для C₁₀H₅Br₂NO₂S₂⁻, [*M* – H]⁻ 393.8035.

(Z)-5-(3,5-Дифтор-4-гидроксибензилиден)-2тиоксотиазолидин-4-он (IIIh). Желтый порошок (390 мг, 71%); т. пл. 272–273°С. ¹Н-ЯМР: 7.27 (д, J_2 8.5, 2H), 7.51 (с, 1H), 11.23 (уш. с., 1H), 13.78 (уш. с., 1H). ¹³С-ЯМР: 114.1 (дд, J_2 17.3, 5.3), 123.3 (т, J_2 9.2), 124.6, 129.9, 136.5 (т, J_2 16.4), 152.2 (дд, J_2 243.7, 7.8), 169.2, 195.0. HRMS (ESI), m/z: найдено M, 271.9654; рассчитано для $C_{10}H_4F_2NO_2S_2^-$,

дено *M*, 2/1.9654; рассчитано для $C_{10}H_4F_2NO_2S_2$, $[M-H]^-$ 271.9657.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезирован ряд галогенсодержащих (Z)-5-(4-гидроксибензилиден)-2-тиоксотиазолидин-4онов. Установлено, что все новые соединения обладают флуорогенными свойствами и способны образовывать флуоресцентные комплексы с белком FAST. Показано, что 3-хлор- и 3-бром-4-гидроксибензилиден-роданины не уступают по эффективности известным роданиновым флуорогенам, расширяют цветовую палитру флуорогенов белка FAST и могут применяться во флуоресцентной микроскопии.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-73-10105).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Gallo E.* // Bioconjug. Chem. 2020. V. 31. P. 16–27. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00710
- Dou J., Vorobieva A.A., Sheffler W., Doyle L.A., Park H., Bick M.J., Mao B., Foight G.W., Lee M.Y., Gagnon L.A., Carter L., Sankaran B., Ovchinnikov S., Marcos E., Huang P.-S., Vaughan J.C., Stoddard B.L. // Nature. 2018. V. 561. P. 485. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0509-0
- Los G.V., Encell L.P., McDougall M.G., Hartzell D.D., Karassina N., Zimprich C., Wood M.G., Learish R., Friedman Ohana R., Urh M., Simpson D., Mendez J., Zimmerman K., Otto P., Vidugiris G., Zhu J., Darzins A., Klaubert D.H., Bulleit R.F., Wood K.V. // ACS Chem. Biol. 2008. V. 3. P. 373–382. https://doi.org/10.1021/cb800025k
- Gronemeyer T., Chidley C., Juillerat A., Heinis C., Johnsson K. // Protein Eng. Des. Sel. 2006. V. 7. P. 309–316. https://doi.org/10.1093/protein/gzl014

- Balleza E., Kim J.M., Cluzel P. // Nat. Methods. 2018. V. 15. P. 47–51. https://doi.org/10.1038/nmeth.4509
- Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // Physiol. Rev. 2010. V. 90. P. 1103–1163. https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2009
- 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., Vriz 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
- 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., Bara-

nov M.S. // Chem. Sci. 2021. V. 12. P. 6719–6725. https://doi.org/10.1039/d1sc01454d

- 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
- 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. A Eur. J. 2019. V. 25. P. 9592–9596. https://doi.org/10.1002/chem.201901151
- 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. A Eur. J. 2021. V. 27. P. 3986–3990. https://doi.org/10.1002/chem.202004760

Halogen-Containing 4-Hydroxybenzylidene-Rhodanines as Fast Protein Fluorogens

A. I. Sokolov^{*, **}, N. S. Baleeva^{*, **, #}, and M. S. Baranov^{*, **}

[#]*Phone:* +7(926) 704-13-72; *e-mail: nsbaleeva@gmail.com*

*Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia **Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovitianova 1, Moscow, 117997 Russia

We report a series of (Z)-5-(4-hydroxybenzyliden)-2-thioxothiazolidin-4-ones containing a halogens at the various position of benzylidene moiety. The new compounds exhibit fluorogenic properties and form fluorescent complexes with FAST. We showed that 3-halogen-4-hydroxybenzyliden-rhodanines can be used as ligands for the fluorogen-activating protein FAST in the fluorescent microscopy.

Keywords: rhodanines, fluorogens, fluorescence-activating proteins, fluorescence



ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ ЖУРНАЛА "БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ" 2022—2023

DOI: 10.31857/S013234232205027X

ТЕМАТИКА ПУБЛИКАЦИЙ

Журнал "Биоорганическая химия" (Russian Journal of Bioorganic Chemistry) публикует статьи, посвященные структурным, структурно-функциональным и синтетическим исследованиям биологически значимых высокомолекулярных соединений (белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов и смешанных биополимеров любых типов).

Предметом публикации для журнала являются также проблемы изучения химических основ деятельности высокоорганизованных частей клетки (клеточных мембран, рецепторных комплексов и др.), целых клеток или органов, проблемы нейрои иммунохимии, биотехнологии, фундаментальные основы разработки диагностикумов на инфекционные и наследственные заболевания.

Большое внимание журнал уделяет также новым достижениям в области низкомолекулярных биорегуляторов. Рассматриваются исследования природных веществ (пептидов, пептидных и стероидных гормонов, липидов, витаминов, антибиотиков, простагландинов, алкалоидов и других соединений, выделяемых из микроорганизмов, грибов, высших растений или животных), их синтетических аналогов, а также синтетических биологически активных веществ (например, лекарств и пестицидов). Предметом публикации также могут быть химические аспекты экологических проблем, методы анализа природных токсикантов и ксенобиотиков и проблемы защиты окружающей среды от этих веществ.

Журнал предназначен для ученых, медицинских работников, преподавателей и студентов университетов, а также исследователей в промышленных, медицинских, сельскохозяйственных лабораториях и лабораториях экологического контроля.

ВИДЫ ПУБЛИКАЦИЙ

Основным типом публикаций являются статьи, содержащие результаты оригинальных экспериментальных и теоретических исследований. Представляемые работы должны отражать новые и ранее не публиковавшиеся данные.

Максимальный объем экспериментальной статьи вместе с таблицами и списком литературы

не должен превышать **24** стандартных машинописных страниц (шрифт Times New Roman, размер шрифта 12, междустрочный интервал 1.5), и 8 рисунков.

Журнал публикует также **обзорные** и **мини-обзорные** статьи о важнейших достижениях в области биоорганической химии.

Максимальный объем обзорных статей вместе с таблицами и списком литературы должен составлять не более 35 машинописных страниц и 15 рисунков. Обзорные статьи большего объема должны быть разбиты на несколько частей и могут быть опубликованы в двух или более номерах журнала.

Максимальный объем мини-обзорных статей — 10–15 печатных страниц и 5–8 рисунков.

Авторам, планирующим опубликовать обзорную статью, необходимо вначале представить в редакцию журнала ее аннотацию, содержащую обоснование актуальности предлагаемой темы, краткие данные о содержании и структуре обзора, его объеме, числе иллюстраций и ссылок на цитируемую литературу, временной охват цитирования, с целью предварительной оценки редколлегией целесообразности его публикации. Полный текст одобренной редколлегией обзорной статьи принимается далее к рассмотрению.

Под рубрикой "Письма редактору" в журнале помещаются краткие сообщения, содержащие новые, важные результаты, требующие срочной публикации. Объем статьи для рубрики "Письма редактору" не должен превышать 8–10 машинописных страниц и 2–3 рисунков.

Журнал практикует выпуск тематических номеров (спецвыпусков), посвященных важным проблемам физико-химической биологии и событиям ее истории, а также номеров, формируемых по материалам докладов и сообщений с важнейших конгрессов, симпозиумов и конференций. Решения о специальных и симпозиальных выпусках принимаются редколлегией по предварительным заявкам, представляемым в редакцию **не позднее чем за 6 месяцев** до предполагаемого события. Редколлегия назначает ответственных редакторов каждого тематического номера. Статьи, предлагаемые участниками конференции с одобрения оргкомитета и ответственных редакторов выпуска, рассматриваются и принимаются к печати по канонам обычных статей.

МЕЖДУНАРОДНЫЙ РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ ЖУРНАЛА

Межлунаролный релакционный совет журнала "Биоорганическая химия" (Russian Journal of Bioorganic Chemistry) представляет собой консультативный совещательный орган, возглавляемый главным редактором журнала. В состав Международного редакционного совета входят как российские, так и зарубежные ученые по соответствующим областям знаний. Члены Международного редакционного совета журнала обеспечивают высокий научный уровень, продвижение журнала как в российском, так и в международном научном сообшестве: определяют редакционную политику, тематическую направленность журнала, проблематику и его перспективы; принимают решения по спорным вопросам относительно поступающих материалов.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ ЖУРНАЛА

Редакционная коллегия журнала "Биоорганическая химия" (Russian Journal of Bioorganic Chemistry) представляет собой постоянно действующий рабочий орган, возглавляемый главным редактором журнала. В состав Редакционной коллегии входят как российские, так и зарубежные ученые по соответствующим областям знаний. Члены Редакционной коллегии журнала непосредственно осуществляют научное сопровождение выпусков журнала, устанавливают требования как к содержанию, так и к оформлению публикаций, визируют поступающие рукописи.

ПОЛИТИКА РЕЦЕНЗИРОВАНИЯ

В журнале "Биоорганическая химия" все статьи рецензируются, используется двусторонняя "слепая" форма рецензирования группой внештатных рецензентов (не менее 2 рецензентов на каждую рукопись). В число рецензентов входит 83 внутренних и внешних эксперта (из них внешних — 85.64%). Количество отклоненных рукописей в 2021 году составило 71%.

Окончательное решение о публикации рукописи принимает главный редактор.

Любой приглашенный рецензент, если он чувствует отсутствие необходимой квалификации или не может провести рецензирование рукописи из-за конфликта интересов, должен своевременно сообщить об этом редактору и отклонить предложение о проведении рецензирования.

Рецензенты должны формулировать свои утверждения в ясной форме, аргументированно и логично, так, чтобы авторы могли использовать их для улучшения рукописи. Необходимо полно-

стью исключить критику, направленную на личность авторов. Рецензенты должны указать в своей рецензии (a) любые работы, которые имеют отношения к рукописи, но не были процитированы авторами; (δ) все, что сообщалось в более ранних публикациях, но не было подобающим образом процитировано или указано в работе; (s) любое значимое сходство или пересечение с другими (опубликованными или неопубликованными) рукописями, о которых известно рецензенту.

ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ЭТИКА

Журнал "Биоорганическая химия" максимально поддерживает принципы добропорядочности и этики в опубликованном контенте.

У журнала есть **политика конфликтов интересов**, и публикуемые работы соответствуют международным, национальным и/или институциональным стандартам работы с людьми и животными, а также при необходимости используют практику информированного согласия.

Журнал "Биоорганическая химия" является членом Committee on Publication Ethics (COPE) и соглашается с его принципами в отношении того, как бороться со случаями ненадлежащего поведения, тем самым обязуясь расследовать утверждения о ненадлежащем поведении в целях обеспечения этичности исследований.

При проверке представленных рукописей используется программное обеспечение для обнаружения плагиата. Если будет выявлен плагиат, журнал будет следовать принципам и рекомендациям СОРЕ в отношении плагиата. Любые отклонения от приведенных здесь правил могут привести к отклонению рукописи и/или более внимательному рассмотрению рукописей, присланных авторами в будущем.

Издатель и/или редакторы не несут юридической ответственности при возникновении материальных претензий со стороны третьих лиц в связи с присланными рукописями.

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ В РЕДАКЦИЮ ЖУРНАЛА

Рукописи статей, включая иллюстративный материал (таблицы, схемы, рисунки), принимаются в редакцию в электронной форме через авторский портал Pleiades Publishing Ltd.: https://publish.sciencejournals.ru.

Авторы могут подать рукопись по электронной почте: <u>ribc@ibch.ru</u> (в копии письма необходимо указать адрес заведующего редакцией журнала: <u>korolenkoibch@yandex.ru</u>).

Рукопись представляется в формате DOC/DOCX единым файлом (<u>недопустима</u> разбивка статьи на несколько файлов, содержащих отдельно текст и иллюстративный материал).

По желанию авторов иллюстративный материал высокого разрешения (схемы, рисунки, фотографии) может быть предоставлен дополнительно (в архиве). Издатель (через редакцию журнала) может запросить у авторов иллюстративный материал высокого разрешения (если при подготовке оригинал-макета сотрудники издательства сочтут качество предоставленного иллюстративного материала неудовлетворительным).

Основные требования к рукописям

Направление рукописи в журнал предполагает, что:

1) представленная работа не публиковалась ранее;

2) она не находится на рассмотрении для публикации в другом издании;

3) данная рукопись не была отклонена в этом журнале;

4) публикация была одобрена всеми соавторами;

5) публикация была одобрена (явно или неявно) всеми необходимыми инстанциями в организациях, где была выполнена эта работа.

ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

При оформлении текста экспериментальных, обзорных, мини-обзорных рукописей и "Писем редактору" (кратких сообщений) необходимо **строго** придерживаться следующего установленного порядка разделов рукописи:

1. Индекс УДК (дается курсивным начертанием). Авторы могут воспользоваться ссылкой на онлайн-справочник: https://www.triumph.ru/html/serv/udk.html;

2. ЗАГЛАВИЕ (дается прописными буквами);

3. Инициалы и фамилии авторов с пометками, позволяющими понять, в каких научных учреждениях (институтах) они работают (необходимо использовать надстрочные символы *, **, ***);

4. Полные официальные названия учреждений и почтовые адреса, включая почтовый индекс и город, для всех авторов рукописи;

5. Аннотация объемом около 250 слов машинописного текста с изложением основных результатов работы и выводов.

В аннотации не рекомендуется использовать формулы, изготавливаемые в графическом формате. Аннотация представляет собой автономную часть рукописи, поэтому все вводимые в нее сокращения и условные обозначения обязательно должны быть расшифрованы (до или после сокращений в самом тексте аннотации).

В Аннотации не следует использовать номера соединений, аббревиатуры — нужно приводить полные или краткие названия соединений;

6. Ключевые слова (не более семи);

 Список сокращений и контакты автора для переписки (даются в сноске на первой странице); 8. Раздел ВВЕДЕНИЕ (обязательный раздел для всех рукописей);

9. Раздел РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ (обязательный раздел для экспериментальных работ и "Писем редактору");

10. Раздел ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ (обязательный раздел для экспериментальных работ и "Писем редактору").

В начале раздела должны быть приведены данные об использованных реагентах, о применяемых приборах, их происхождении, описание типовых методов и методик и т.п. Для методик, опубликованных ранее, достаточно указать ссылку на соответствующую работу.

11. Раздел ЗАКЛЮЧЕНИЕ (обязательный раздел для всех рукописей). Включает в себя краткое изложение результатов работы и выводы (желательно также отразить в заключении практическую значимость проведенных исследований и перспективы дальнейшего использования полученных результатов).

12. Раздел БЛАГОДАРНОСТИ (приводится при необходимости) включает сообщения о полезных обсуждениях и дискуссиях, благодарности коллегам, рецензентам и сотрудникам редакции (в особых случаях); сообщения о предоставлении материалов, данных, компьютерного обеспечения, приборов во временное пользование; информация о проведении исследований в центрах коллективного пользования; помощь в технической подготовке текста, а также все прочее, что расценивается авторами как полезная помощь;

13. Раздел ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА (приводится при необходимости) включает в себя информацию о грантах и любой другой финансовой поддержке исследований. В данном разделе названия институтов и спонсирующих организаций следует указывать **полностью**, не сокращая;

14. Раздел СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ является обязательным разделом, который должен содержать информацию о работе с людьми и/или животными (рекомендации по оформлению данного раздела представлены на сайте издателя: https://www.pleiades.online/ru/authors/guidlines/ethics-statements/). Если исследования с участием людей и животных не проводились, авторы должны это указать (используется стандартная формулировка: "Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований"). Этот раздел должен присутствовать во ВСЕХ статьях (независимо от того, были ли вовлечены животные и люди в эксперименты в какой-либо конкретной статье);

15. Раздел КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ является обязательным разделом и должен присутствовать во ВСЕХ рукописях. Раздел должен содержать стандартную формулировку: "Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов" или сведения об имеющемся конфликте интересов;

16. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ оформляется виде отдельного раздела рукописи с указанием фамилий и инициалов всех авторов (курсивным шрифтом, et al. не допускается), сокращенных названий журналов и выходных данных публикации (год выпуска, номер тома, номера страниц через длинное тире). В конце ссылки обязательно указывается doi (при наличии), точка после doi не ставится. В журнале принята последовательная нумерационная система цитирования, т.е. в порядке упоминания в тексте указывается порялковый номер процитированного источника (арабской цифрой в квадратных скобках), соответствующий номеру в списке литературы. При цитировании статьи, опубликованной в журнале "Биоорганическая химия", в списке литературы следует привести под тем же номером в квадратных скобках выходные данные английской версии статьи.

Ниже приведены образцы оформления ссылок на статьи в журналах, книги, патенты, диссертации.

- Михалева И.И., Иванов В.Т., Войтенков В.Б., Вечканов Е.М., Бондаренко Т.И. // Биоорг. химия. 2013. Т. 39. С. 277–284. [Mikhaleva I.I., Ivanov V.T., Voitenkov V.B., Vechkanov E.M., Bondarenko T.I. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2013. V. 39. P. 245–251.] https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)93924-9
- 2. *Нероев В.В., Киселева О.А., Бессмертный А.М. //* Рос. офтальмологич. журнал. 2013. Т. 6. № 3. С. 4–7.
- 3. *Casu B., Naggi A., Torri G.* // Carbohydr. Res. 2015. V. 403. P. 60–68.

https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.06.023

- 4. *Хираока М. //* Краун-соединения. Свойства и применение / Ред. Эммануэль Н.М. Москва: Мир, 1986. С. 258–260.
- 5. 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.
- Lund E., Henrichsen J. // Methods in Microbiology / Eds. Bergan T., Norris J.R. London: Academic Press, 1978. P. 241–262.
- Alberts B., Johnson A., Lewis Ju., Raff M., Roberts K., Walter P. // In Molecular Biology of the Cells, 4th ed. New York: Garland Science, 2002. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26871
- Свердлов Е.Д., Алексеенко И.В., Безбородова О.А., Виноградова Т.В., Кашкин К.Н., Копанцев Е.П., Монастырская Г.С., Немцова Е.Р., Успенская Н.Я., Чернов И.П., Якубовская Р.И. // Патент RU 2551784 C1, 2015.
- 9. *Knopf J., Seehra J., Kumar R.* // Patent US 8343933 B2, 2010.
- Шарапова Н.Е. // Получение и характеристика рекомбинантных доментов белка LigA как компонентов потенциальной субъединичной противолептоспирозной вакцины. Дис. канд. биол. наук, НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва, 2009.
- 11. Латашко В.М., Бадовская Л.А., Пономаренко Р.И., Сокирко В.П. // Тез. докл. 6-й Международной

конференции "Регуляторы роста и развития растений в биотехнологиях", Москва, 2001. С. 255.

17. RESUME — английская версия пунктов 2—6 (названия организаций, в которых работают авторы, даются на английском языке, а адреса организаций — с помощью транслитерации);

18. Подписи к рисункам, схемам и заголовки таблиц (все вместе на отдельной странице);

19. Рисунки, схемы и химические формулы (просим использовать редактор ChemDraw).

В электронной версии журнала возможна бесплатная публикация цветных рисунков;

20. Таблицы;

21. ШАБЛОН ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЬИ 2021–2022

При написании статьи следует употреблять латинские названия животных, растений и микроорганизмов (род и вид — курсивным начертанием, таксоны более высокого уровня — прямым); при первом упоминании в аннотации и в тексте род должен называться полностью.

Названия ферментов необходимо давать в соответствии с классификацией IUB, приводя в скобках классификационный номер (КФ).

Названия химических соединений должны соответствовать номенклатуре, рекомендованной номенклатурным комитетом Международного союза теоретической и прикладной химии IUPAC и Международного союза биохимии IUB. Все сокращения названий химических соединений даются в журнале в латинской транскрипции.

Соединения нумеруются римскими полужирными цифрами в скобках (скобки нежирные): (I), (II) и т.д. Если соединений больше 30, их следует нумеровать арабскими полужирными цифрами в скобках (скобки нежирные): (1), (2) и т.д. С 2021 г. редакция журнала рекомендует авторам экспериментальных статей переносить данные элементного анализа в дополнительные материалы, размещаемые на сайте журнала.

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ РУКОПИСЕЙ И ПОДГОТОВКА ИХ К ПЕЧАТИ

Все статьи, поступающие в редакцию, проходят двухступенчатое двустороннее "слепое" рецензирование (Double-blind review) независимыми экспертами.

Для **первичного** рецензирования рецензенту, как правило, дается 14 календарных дней. Для **вторичного** рецензирования — 7 календарных дней.

Рукопись, направленная авторам на доработку после рецензирования, должна быть возвращена в исправленном чистовом виде в течение 7 календарных дней. К переработанной рукописи авторам необходимо приложить письмо с описанием сделанных исправлений и содержащее ответы на все замечания рецензента. Статьи, принятые к публикации, тщательно редактируются. Небольшие исправления стилистического, номенклатурного или формального характера вносятся редактором в статью без согласования с авторами. Более серьезные исправления обсуждаются с авторами, и статья направляется авторам на доработку. При доработке авторам следует внести в текст, таблицы и рисунки все необходимые с их точки зрения исправления, а свою позицию по неучтенным исправлениям изложить в ответном письме в редакцию.

Датой принятия в печать считается дата поступления версии, удовлетворяющей всем требованиям рецензентов и редакторов журнала.

Доработанные статьи, возвращенные в редакцию более чем через 2 месяца после направления из редакции, регистрируются как новые и получают новую дату поступления.

Очередность публикации устанавливается по дате принятия в печать. Работы, признанные редколлегией приоритетными и высокозначимыми, а также статьи, требующие скорейшей публикации по причинам, затрагивающим интересы авторов, публикуются вне очереди, если процесс подготовки рукописи не требует существенной доработки.

После согласования всех вопросов с авторами и предоставления авторских договоров рукопись **передается сотрудникам издательства** для осуществления набора и подготовки макета. Издатель рассылает авторам по электронной почте корректуру статьи в виде PDF-файла и инструкцию по работе с ней. На этапе корректуры авторы могут вносить лишь незначительные изменения. Замены рисунков, таблиц и крупные изменения текста не допускаются. Если же это необходимо, вопрос решается редколлегией, в крайнем случае, статья переносится в другой номер.

После опубликования статьи корреспондирующему автору, указанному в статье как "Автор для связи", издатели направляют электронные макеты русской и английской версии статьи в формате PDF.

ОТЧЕТНОСТЬ И СПРАВКИ О ПРИНЯТИИ СТАТЬИ В ПЕЧАТЬ

До выхода статьи в свет и ее появления в базах данных редакция журнала (по запросу автора) может выдать справку о принятии статьи в печать с указанием только года принятия, например: "...статья прошла все этапы работы и принята в печать в 2022 году".

Справка с указанием конкретного номера, в котором статья будет опубликована, может быть выдана авторам только после регистрации статьи в научной электронной библиотеке eLIBRARY.RU. Авторам **не рекомендуется** указывать в отчетах (не оповестив при этом редакцию журнала) конкретный номер, в котором планируется выход статьи, если она еще не вышла в свет (например, на этапе корректуры или при согласовании правки, даже если в макете статьи указан номер журнала).

Справка о принятии рукописи в печать выдается на официальном бланке редакции журнала за подписью заведующего редакцией. Письма и иные оповещения от редакции журнала не являются формой отчета о принятии рукописи в печать.

По независящим от редакции причинам уже подготовленная статья может попасть в "загон" и быть опубликована на один номер позже (при этом DOI статьи, полученный авторами при окончательной вычитке корректуры и оригиналмакета, закрепляется за статьей).

ЭТИЧЕСКАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ АВТОРОВ

Журнал "Биоорганическая химия" стремится поддерживать высокую репутацию научных исследований. Будучи членом Комитета по этике публикаций (СОРЕ), журнал будет следовать рекомендациям СОРЕ относительно того, как бороться с потенциальными нарушениями этических норм.

Авторы должны воздерживаться от искажения результатов исследований, так как они (искажения) могут нанести ущерб доверию к журналу, поставить под вопрос профессионализм авторов журнала, и тем самым дискредитировать научную деятельность в целом.

Поддержание высокой репутации научных исследований и их описания может быть достигнуто путем соблюдения правил добросовестной научной практики.

Рукопись не должна направляться на рассмотрение в более чем один журнал.

Рукопись не должна быть опубликована ранее (полностью или частично), если только новая работа не расширяет содержание предыдущей работы. Пожалуйста, в таких случаях четко укажите какие из материалов используются вами повторно, чтобы это не выглядело как самоплагиат (text recycling).

Никакие данные (включая изображения) не должны быть сфабрикованы или умышленно искажены с целью обоснования выводов, сделанных авторами.

Данные, полученные другими исследователями, а также текст или теории, авторами которых являются другие исследователи, не должны быть представлены в рукописи так, как если бы они были собственными данными, текстом или теориями авторов, приславших рукопись ("плагиат"). Должны быть даны надлежащие ссылки на другие работы, включая материал, который скопирован (почти дословно), обобщен и/или перефразирован. Кавычки используются для дословно скопированного текста. Для материалов, защищенных авторским правом, должно быть получено разрешение на их воспроизведение.

Авторам настоятельно рекомендуется обеспечить корректный список фамилий авторов и порядок их следования до направления рукописи в редакцию. Изменения в составе и/или в порядке следования фамилий авторов полностью исключены передачи рукописи на верстку.

Добавление и/или удаление фамилий авторов и/или изменение порядка в списке авторов на стадии доработки рукописи допустимо, но должно быть оправданным. В сопроводительном письме к доработанной рукописи необходимо объяснить причину изменений и роль добавленных и/или удаленных фамилий авторов при выполнении работы. Возможно, потребуются дополнительные документы для подтверждения изложенных объяснений.

Просьбы о добавлении или удалении фамилий авторов в результате авторских споров после принятия рукописи принимаются после официального подтверждения со стороны организации или независимого органа, и/или при наличии согласия между всеми авторами.

Если есть подозрение в нарушении норм этики, журнал проводит расследование в соответствии с рекомендациями СОРЕ. Если после расследования обвинения оказываются обоснованными, то обвиняемому автору предоставляется возможность оправдать себя. Если некорректное поведение было однозначно установлено, то Главный редактор может принять в числе прочего следующие меры:

 если статья все еще находится на рассмотрении, она может быть отклонена и возвращена автору;

2) если статья уже была опубликована онлайн, то, в зависимости от характера и серьезности нарушения, либо будет опубликован еггаtum к статье, либо, в случае серьезных нарушений, статья будет отозвана. Причина должна быть указана в erratum или в сообщении об отзыве (retraction note). Обратите внимание, что отзыв статьи означает, что версия статьи останется на платформе для распространения журнала с водяным знаком "OTO3BAHA", а объяснение причин отзыва дается в примечании к помеченной таким образом статье;

3) организация, в которой работает автор, может быть проинформирована о нарушении.

ΦΟΡΜΑ ΑΒΤΟΡСΚΟΓΟ ДΟΓΟΒΟΡΑ

Для возможности опубликования рукописи в журнале "Биоорганическая химия" авторам необходимо предоставить два договора (<u>лицензионный договор</u> для публикации в оригинальной (русской) версии журнала и <u>договор о передаче ав-</u> торского права (для публикации в английской версии журнала). Обязательно наличие данных и подписей всех авторов рукописи.

ПРАВА РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ ЖУРНАЛА

Редакционная коллегия журнала оставляет за собой право отклонить статью по следующим причинам:

1) несоответствие профилю журнала;

2) недостаточная значимость полученных результатов;

3) нечеткая формулировка целей и задач исследования;

4) несоответствие современному уровню исследований;

5) недостаточная обоснованность выводов литературным или экспериментальным материалом;

6) описанные результаты уже опубликованы достаточно полно авторами статьи или другими исследователями;

7) неудовлетворительные литературные качества статьи и/или ее оформление, несоответствие оформления статьи "Правилам для авторов";

8) в варианте, полученном редакцией после двукратной доработки авторами, не учтены (без соответствующего обоснования) все замечания рецензента;

9) представленный к публикации экспериментальный материал (полностью или частично) опубликован в иных изданиях (российских или зарубежных).

ПЕРЕЧЕНЬ СИМВОЛОВ/ОБОЗНАЧЕНИЙ, ПРИНЯТЫХ В ЖУРНАЛЕ "БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ"

Стандартные символы некоторых мономерных единиц и групп биополимеров

Ado, A ^{2*} , ^{3*}	аденозин
Ac	ацетил
Aet	аминоэтил
Ala, A	аланин
Ara	арабиноза
Arg, R	аргинин

Asn, N	аспарагин
Asp, D	аспарагиновая кислота
Asx, B	аспарагин или аспарагиновая кислота
Boc	<i>трет</i> -бутилоксикарбонил
Bzl	бензил
Bz	бензоил
Bu, Bu ⁱ , Bu ^s , Bu ^t	соответственно н-, изо-, втор-, трет-бутил
Cyd, C^{2*}	цитидин
Cbz, Z	бензилоксикарбонил
Cbz(Br), Z(Br)	пара-бромбензилоксикарбонил
Cm	карбоксиметил
Cys, C	цистеин
Dns	дансил (5-(диметиламино)нафталинсульфонил)
$dAdo, dA^{3*}$	дезоксиаденозин
dRib ³ *	2-дезоксирибоза
Ft	ЭПИТ
Fue	фукоза
Fru	фукоза фрунтора
Gal	фруктоза
Gle	
GICA."	
GlcN ^{3*}	люкозамин
GlcNAc ⁵ *	<i>N</i> -ацетилглюкозамин
Gln, Q	глутамин
Glu, E	глутаминовая кислота
Glx, Z	глутамин или глутаминовая кислота
Gly, G	глицин
Gro	глицерин
Guo, G ² *	гуанозин
Нсу	гомоцистеин
His, H	гистидин
Hse	гомосерин
Hyl	гидроксилизин
Нур	гидроксипролин
Ino, I ² *	ИНОЗИН
Ile, I	изолейцин
Leu, L	лейцин
Lys, K	лизин
Man	манноза
Me	метил
Met, M	метионин
MeOTr и (MeO) ₂ Tr	метокси- и диметокситритил
Nuc, N^{2*}	неизвестный нуклеозид
Neu	нейраминовая кислота
Neu5Ac	N-ацетилнейраминовая кислота
ONSu/OSu	сукцинимидоокси
Orn	орнитин
Ph	фенил
Phe, F	фенилаланин

628 ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ ЖУРНАЛА "БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ" 20	22-2023
--	---------

Pht-	фталил
Pht<	фталоил
Pr	пропил
Pro, P	пролин
Puo, R	пуриновый нуклеозид
Pyd, Y	пиримидиновый нуклеозид
Rib	рибоза
Ser, S	серин
Suc< , -Suc-	сукцинил
Thd, T ² *	рибозилтимин (не тимидин, который обозначается dT или dThd)
Thr, T	треонин
Trp, W	триптофан
Tos или Ts	тозил (<i>n</i> -толуолсульфонил)
Trt или Tr	тритил (трифенилметил)
Tyr, Y	тирозин
Urd, U^{2*}	уридин
ψ rd, ψ^{2*}	псевдоуридин (5-рибозилурацил)
Val, V	валин
Xaa	неопределенная аминокислота
Xyl	ксилоза
* Следует употреблять только в формулах,	структурах, таблицах и на рисунках.

²* Однобуквенный символ не должен использоваться для обозначения основания.

³* Аналогично для других нуклеозидов и сахаров.

⁴* Аналогично для других уроновых кислот.

 5* Аналогично для других 2-амино-2-дезокси
сахаров и их N-ацетил
производных.

\sim	2		~			v		<u>ר</u> י
()	танда	птныр	пппзнпирния	μρκομομιγ	тириальных	назеании унл	лиирских сор	Пинении
U	nunou	phillole	ooosna icnasi	пскоторыл	трибиционов	nusounna xas	in icenar coe	ounchun

AMP*	аденозин-5'-фосфат
ADP*	аденозин-5'-дифосфат
ATP*	аденозин-5'-трифосфат
BSA	бычий сывороточный альбумин
СМ-целлюлоза	карбоксиметилцеллюлоза
CoA (CoASH), CoASAc	коэнзим А, ацетилкоэнзим А
DCC	<i>N</i> , <i>N</i> -дициклогексилкарбодиимид
DMF	диметилформамид
DMSO	диметилсульфоксид
ДНК, кДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота, комплементарная ДНК
DEAE-целлюлоза	диэтиламиноэтилцеллюлоза
EDTA	этилендиаминтетрауксусная кислота
IFN	интерферон
IgA, IgG и т.д.	иммуноглобулин А, G и т.д.
IL	интерлейкин
P _i	неорганический фосфат
Р	остаток фосфорной кислоты в соединении
РНК	рибонуклеиновая кислота
SDS	додецилсульфат натрия
TCA	трихлоруксусная кислота
TEAB	бикарбонат триэтиламмония

TFA	трифторуксусная кислота
THF	тетрагидрофуран
Tris	трис(гидроксиметил)аминометан
* Для других нуклеозид-5'-моно-, нуклеозид-5'	-ди- и нуклеозид-5'-трифосфатов аналогично

	Сокращения для часто употребляемых слов и терминов
a.o.*	аминокислотный остаток
БХ	хроматография на бумаге
ВЭЖХ, офВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография, обращенно-фазовая ВЭЖХ
ГХ, ГЖХ	газовая (газожидкостная) хроматография
ед. акт.*	единица активности
ИК	инфракрасный
ИФА	иммуноферментный анализ
КД	круговой дихроизм
KCCB	константа спин-спинового взаимодействия
ME	международная единица
MC	масс-спектрометрия
м-, о-, п-	мета-, орто-, пара-
Н-	нормальный (изомер)
н.*	нормальный (раствор)
HT*	нуклеотид
OE**	оптическая единица
ΠΑΑΓ	полиакриламидный гель
ПЦР	полимеразная цепная реакция
п.н.*	пара нуклеотидов
PCA	рентгеноструктурный анализ
т.п.н.*	тысяча пар нуклеотидов
т. кип.*	температура кипения
т. пл.*	температура плавления
TCX	хроматография в тонком слое
УФ	ультрафиолетовый
ЭПР	электронный парамагнитный резонанс
ЯМР	ядерный магнитный резонанс
* Только в сочетании с п	ифрами.

** Безразмерная величина.

Символы для некоторых	физических и химических величин и единиц их измерения
Величина	Елиница измерения

Символ	Величина	Единица измерения
	Физическая х	ИМИЯ
т	масса	кг, г, мг, мкг (не µ) и т.д.
Μ	молекулярная масса	Да* (дальтон)
<i>M</i> _r	относительная молекулярная масса	безразмерная
n	количество вещества	моль, мкмоль, нмоль, пмоль и т.д.
c _B , [B]	концентрация вещества В	М (моль/дм ³), мМ и т.д.
S	коэффициент седиментации	S (сведберг, 10-13 с)

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ ЖУРНАЛА "БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ" 2022–2023 630

Термодинамика		
Т	термодинамическая температура	К ² * (кельвин)
t	температура по Цельсию	°C
Ε	энергия	Дж или кал (4.1868 Дж)
Р	давление	Па (паскаль), или бар (105 Па) или атм (101 325 Па), или мм рт. ст. (1 торр = 133.2 Па)
Ι	ионная сила	М, мМ и т.д.
	Свет, излуче	ние
Ι	интенсивность излучения	кд (кандела)
A	поглощение ³ * (-lg <i>I</i> / <i>I</i> о)	безразмерная
ε	молярный коэффициент поглощения4*	$M^{-1} c m^{-1}$
	радиоактивность (излучательная способность)	Бк (беккерель, с ⁻¹) или Ки (кюри, 3.7 × 10 ¹⁰ Бк)
	Химические и ферментат	гивные реакции
t	время	с (не сек), мин, ч (не час)
V	объем	дм ³ (л), см ³ (мл), мкл и т.д.
Κ	константа равновесия	моль/л
K _m	константа Михаэлиса	М, мМ и т.д.
K _s	субстратная константа	то же
K _i	ингибиторная константа	то же
k	константа скорости	c^{-1} или $M^{-1} c^{-1}$
k _{cat}	каталитическая константа	c ⁻¹
V	скорость превращения	моль с ⁻¹
V (или $V_{\rm max}$)	максимальная скорость	моль л $^{-1}$ с $^{-1}$
Н	коэффициент Хилла	безразмерный
* 1/12 массы ч ² * На °К	истого изотопа ¹² С.	

He °K.

³* Англ. "absorbance" – поглощательная способность; термин "оптическая плотность" употреблять не рекомендуется.

⁴* Термин "экстинкция" употреблять не рекомендуется.