

СОДЕРЖАНИЕ

Том 46, номер 3, 2020

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.

Молекулярные механизмы формирования рафтов биологических мембран
(Обзорная статья)

В. А. Радюхин, Л. А. Баратова 227

Липидом плазмы крови: возможности ранней диагностики преэклампсии

*Т. И. Торховская, Т. С. Захарова, Е. И. Короткевич, Н. К. Касум-заде,
Р. И. Шалина, С. С. Маркин* 239

Теоретические и прикладные аспекты эстеразной активности альбумина

Д. А. Белинская, Н. В. Гончаров 247

Трехдоменные антитела против фактора некроза опухоли: исследование биологической активности *in vitro*

Е. А. Василенко, Е. Н. Горшкова, И. В. Астраханцева, С. А. Недоспасов, В. В. Мохонов 261

Противовирусная активность воакамина из *Voacanga africana* Stapf по отношению к ВИЧ на основании данных ППР визуализации

*Н. Х. Li, R. Q. Liu, Н. М. Zhang, Z. X. Cao, L. X. Zhu, Y. Y. Li, W. J. Ding,
Y. H. Chen, and Y. Deng* 269

Эффект проскальзывания в реакции элонгации праймера при использовании модифицированных 2'-дезоксинуридинтрифосфатов

*В. А. Василисков, В. Е. Шершов, Р. А. Мифтахов, В. Е. Кузнецова, С. П. Радько,
А. В. Лисица, С. А. Лапа, С. А. Суржиков, Э. Н. Тимофеев,
А. С. Заседателев, А. В. Чудинов* 270

Производные 5-(перилен-3-илэтинил)урацила ингибируют репродукцию респираторных вирусов

*Ю. В. Николаева, Е. А. Улащик, Е. В. Чекерда, А. В. Галочкина, Н. А. Слесарчук,
А. А. Чистов, Т. Д. Никитин, В. А. Коршун, В. В. Шманай, А. В. Устинов, А. А. Штро* 273

С-терминальный домен гемолитического токсина II *Bacillus cereus* способен взаимодействовать с эритроцитами

*Н. В. Руденко, А. П. Каратовская, А. В. Замятина, А. В. Суинов,
Ж. И. Андреева-Ковалевская, А. С. Нагель, Ф. А. Бровко, А. С. Солонин* 280

Получение внеклеточной части рецептора ErbB2 для исследования иммунобиологических препаратов

*В. С. Рыбченко, Д. С. Балабашин, А. А. Панина, О. Н. Солопова, С. А. Якимов,
Т. К. Алиев, Д. А. Долгих, М. П. Кирпичников* 286

Влияние этанольных экстрактов *Silene roemerii*, *S. sendtneri* на первичные моноциты/макрофаги человека

Е. С. Филоненко, Л. Н. Зибарева 294

Синтез конъюгатов гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора с алендроновой кислотой и их свойства	
<i>T. I. Esina, E. A. Volosnikova, L. P. Lebedev, G. V. Kochneva, A. A. Grahdanцева</i>	302
Синтез производных флуоресцентного родаминового красителя на основе дигидрохинолина для анализа нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции в реальном времени	
<i>I. V. Matvienko, V. M. Байрамов, H. A. Парыгина, B. E. Курочкин, Я. И. Алексеев</i>	310
Клик-синтез, молекулярный докинг, цитотоксичность в отношении рака молочной железы (MDA-MB 231) и анти-вич-активность новых производных 1,4-дизамещенных-1,2,3-триазолтимина	
<i>Faeza Abdul Kareem Almashal, Hamsa Hussein Al-Hujaj, Ahmed Majeed Jassem and Najim Aboud Al-Masoudi</i>	322
Удобный синтез новых производных сальфонамида, халкона и пиразолина в качестве потенциальных антибактериальных агентов	
<i>A. P. S. Bonakdar, A. Sadeghi, H. R. Aghaei, K. Beheshtimaal, S. M. R. Nazifi, A. R. Massah</i>	323
Синтез ряда новых тиазольных производных пиразолина и оценка их противомикробной, противогрибковой и противоопухолевой активности	
<i>Safaa I. Elewa, Eman Mansour, Ibrahim F. Nassar, and Amal A. I. Mekawey</i>	324
Синтез и противоопухолевая активность функционализированных тиено[2,3- <i>d</i>]пиримидиновых соединений и их триазинил и тетразинил производных	
<i>Walaa I. El-Sofany, Dalia M. Othman, Asma M. Mahran, Mai Manawaty, and Wael A. El-Sayed</i>	325
Дизайн и синтез 1-замещенных 4-(4-нитрофенил)-[1,2,4]триазоло[4,3- <i>a</i>]хиназолин-5(4 <i>H</i>)-онов в качестве нового класса антигистаминных агентов	
<i>M. Gobinath, N. Subramanian, V. Alagarsamy, S. Nivedhitha, and Viswas Raja Solomon</i>	326
Синтез и биологическая оценка некоторых <i>N</i> -замещенных производных хиноксалина в качестве противоопухолевых агентов	
<i>Adil A. Gobouri</i>	327
Синтез и эффективность трансфекции с помощью бивалентных катионных липидов с аммониевой головой и различными гидрофобными хвостами	
<i>W. Radchatawedchakoon, N. Niyomtham, C. Thongbamrer, C. Posa, U. Sakee, W. Roobsoong, J. Sattabongkot, P. Opanasopit, and B. Yingyongnarongkul</i>	328
Дизайн, синтез, изучение молекулярного докинга и биологическая оценка производных изозазола пиразолина	
<i>T. Radhika, A. Vijay, B. V. Harinadha, and B. Madhavareddy</i>	329
Синтез и антимикробная активность некоторых новых производных кумарина и дикумарола	
<i>M. K. A. Regal, S. S. Shaban, and S. A. El-Metwally</i>	330

Письма редактору

Структурный профиль новых производных аденозина в качестве антиагрегантов на основании анализа 3D-QSAR с помощью алгоритмов CoMFA, CoMSIA и SOMFA	
<i>Shunlai Li, XueFeng Bao, Chenghu Lu, Chaorui Ren, Guocheng Liu, and Hongguang Du</i>	331
Синтез и оптические свойства нового ацетиленового аналога хромофора белка Kaede	
<i>Э. Р. Зайцева, А. Ю. Смирнов, А. С. Мишин, М. С. Баранов</i>	332



УДК 577.22

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ РАФТОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

© 2020 г. В. А. Радюхин*, #, Л. А. Баратова*

*Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, 1

Поступила в редакцию 01.10.2019 г.

После доработки 12.12.2019 г.

Принята к публикации 12.12.2019 г.

В обзоре суммируются и анализируются актуальные аспекты в исследовании механизмов формирования рафтов (плотов) модельных и биологических мембран, при этом делается акцент на дискриминации механизмов, определяющих формирование и поддержание рафтовых доменов как динамических структур в модельных и биологических мембранах и значении мембранных белков. Подробно рассматривается дискуссионный вопрос о роли специфических холестерин-распознающих аминокислотных консенсусных (CRAC) мотивов мембранных белков, а также роль на молекулярном уровне отдельных аминокислот в формировании рафтов и рафтовых биомембран в целом. Особое внимание уделяется структурной организации липидных мембран оболочечных вирусов с мембранами рафтовой природы как объектов, наглядно иллюстрирующих основные механизмы формирования и поддержания рафтов биологических мембран.

Ключевые слова: липидные мембраны, рафты, мембранные белки, холестерин-распознающие аминокислотные консенсусные (CRAC) мотивы, амфипатические элементы вторичной структуры белков

DOI: 10.31857/S0132342320030264

ВВЕДЕНИЕ

Биологические мембраны являются одним из важнейших структурных компонентов биологических систем, включая клетки, внутриклеточные органеллы, многие вирусы и др. Они представляют собой барьер, отделяющий внутреннюю среду любой биологической системы от внешнего окружения. Наличие такого уникального барьера является имманентным свойством высокоорганизованной живой системы, так как позволяет разделять и в то же время согласовывать множество биохимических реакций и процессов в ней. Принципиальной особенностью биологических мембран является то, что они состоят главным образом из липидов, в которых, как полагали, свободно движутся мембранные белки. Эта концепция “мозаичной модели” была выдвинута Сингером и Николсоном в 1972 г. [1]. Однако, по мере накопления новых данных возникла более сложная концепция существования в биомембранах динамичных упорядоченных микро- и нанодоменов, так называемых мембранных рафтов (плотов), обогащенных сфинголипидами и стеринами

соединениями, в первую очередь холестерином, а также мембранными белками.

В данном обзоре излагаются экспериментальные и концептуальные достижения последних лет в изучении и осмыслении феномена формирования липидных рафтов в биомембранах и критически рассматриваются проблемы, возникающие в этой области мембранологии.

ОБЩЕЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О РАФТАХ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Концепция липидных рафтов, являющихся результатом латеральной сегрегации отдельных компонентов в липидных мембранах, появилась в биофизике более 40 лет назад в качестве объяснения с позиций термодинамики факта сосуществования более одной липидной фазы в модельных гидратированных фосфолипидных бислоях. Эти факты изначально были использованы для объяснения механизмов особенностей формирования апикальной мембраны эпителиальных клеток [2], а также передачи сигналов, модулирующих клеточную активность посредством мембранных рецепторов, и трансмембранного переноса. Концепция постулировала наличие липидных рафтов в биологических мембранах как более упорядоченных и плотно упакованных структур в окружающем флюидном слое липидов [3, 4].

Сокращения: CRAC — холестерин-распознающий аминокислотный консенсус.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 939-54-08; факс: +7 (495) 939-31-81; эл. почта: varvic@belozersky.msu.ru).

Сумма новых знаний и экспериментальных наработок в этой области мембранологии, полученных в последнее время, позволяет считать, что рафтовые липидные домены являются одним из всеобщих принципов, организующих функционирование биологических мембран.

Позднее взгляд на биологическую мембрану был также дополнен независимым представлением о присущей мембране “дефектности” и, соответственно, анизотропии вследствие значительных различий в структуре, форме, заряде и размерах молекул множества липидов, входящих в ее состав. Несмотря на то, что межмолекулярные взаимодействия между этими молекулами не столь велики, синэргетический эффект общей массы липидов способен привести к формированию нано- и микродоменов различной плотности как в природных, так и в модельных мембранах. Примечательно, что в данной концепции делается акцент на значительном вкладе амфипатических альфа-спиралей мембран-активных белков в механизмы структурного переформатирования биомембран [5].

Общие представления о существовании различных фаз в липидных бислоях были получены при экспериментальных исследованиях упрощенных модельных мембран физическими методами. На фосфолипидных модельных смесях было обнаружено их важное свойство: при определенной температуре, зависящей от липидного состава системы, липиды подвергаются фазовому переходу из гелевой фазы (S_0) в жидко-неупорядоченную фазу (L_d). Латеральная подвижность липидов, которая сильно ограничена в фазе S_0 , при повышении температуры значительно увеличивается, остатки жирных кислот становятся неупорядоченными и не удерживаются более в плотно упакованной жесткой конформации.

Если мембрана содержит также холестерин, возможно появление и третьей фазы, жидко-упорядоченной (L_0). Считается, что эта фаза характеризуется высокой степенью упорядоченности ацильных остатков жирных кислот в липидах, что типично для фазы S_0 , но с повышенной латеральной подвижностью, характерной для фазы L_d . В мембранах, состоящих из смесей сфингомиелина, ненасыщенных фосфолипидов и холестерина в определенных соотношениях, фазы L_0 и L_d могут сосуществовать [6, 7]. Липиды рафтовых микродоменов отличаются высокой степенью упорядоченности ацильных остатков высших жирных кислот (жидкоупорядоченная фаза L_0). Холестерин, как установлено, повышает упорядоченность ацильных остатков жирных кислот молекул фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина в липидных бислоях, особенно в повышенных концентрациях порядка 45 мол. % [8].

По современным представлениям липидные рафты образуются спонтанно в природных мембранах. Они имеют размеры <10 нм и очень неустойчивы и динамичны. Большие по размеру и более устойчивые рафтовые домены (10–300 нм)

могут образовываться из нанодоменов только под влиянием межбелковых взаимодействий или при ассоциации белков. Липиды рафтовых микродоменов отличаются высокой степенью упорядоченности ацильных остатков высших жирных кислот (жидкоупорядоченная фаза L_0), а сами рафты функционируют как агенты для концентрирования мембранных и мембран-ассоциированных белков. Такие липид-белковые ансамбли рассматриваются в качестве своеобразных платформ, где разворачиваются различные биохимические процессы [9–11]. Предполагается, что именно активная концентрация белков в рафтах и способствует образованию межбелковых взаимодействий и активизации функций мембранных и мембран-ассоциированных белков.

Белки с трансмембранными (ТМ) доменами или другими якорными группами (прежде всего гликозилфосфатидилинозитола, GPI) концентрируются в рафтах, стабилизируя липиды в фазе L_0 , которая и придает рафтам в биомембране большую жесткость, плотность и толщину.

Кроме того, бислоидная липидная мембрана обладает транслатеральной асимметрией, и рафты могут существовать независимо друг от друга во внешнем и внутреннем листах биомембраны [12].

В последнее время с помощью разнообразных экспериментальных техник прямой визуализации (флуоресцентные методы), атомно-силовой микроскопии (АСМ), малоуглового рентгеновского рассеяния (SAXS) и др., а также компьютерного моделирования и методов липидомики с применением количественной масс-спектрометрии достаточно убедительно показано наличие в плоскости природных и модельных мембран упорядоченных доменов, обогащенных сфинголипидами и холестерином [13–16].

РОЛЬ ЛИПИД-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ФОРМИРОВАНИИ МЕМБРАННЫХ РАФТОВ

До настоящего времени остаются предметом дискуссий молекулярные основы формирования рафтов, поддержания их структуры в клеточных мембранах, а также роль в этом мембранных белков [6, 17]. Основным классическим биохимическим методом выделения рафтовых образований (структур) является холодовая солюбилизация неионными детергентами. Так, выделение GPI-заякоренных мембранных белков во фракции так называемых детергент-устойчивых (рафтовых) мембран [18, 19] исходно основывается на предположении, что такие мембранные домены, находясь в фазе L_0 , формируются/модулируются предпочтительными взаимодействиями белков с холестерином и сфинголипидами и устойчивы к солюбилизации при пониженной температуре неионными детергентами. В альтернативном подходе, при изучении поведения рафтовых маркеров в плазматических мембранах после обработки агентами, разрушающими цитоскелет, было по-

казано, что локализация GPI-заякоренных белков более зависима от структурной организации актинового кортекса клетки, чем от взаимодействия с холестерином в рафтах [20].

Наблюдение диффузии индивидуальных флуоресцентно меченых молекул сфинголипидов в мембране выявило, что удержание в рафтах сфинголипидов зависит не столько от холестерина, сколько от организации актина в цитоскелете; то есть, рафтовые структуры, вероятно, формируются в клеточной мембране преимущественно под влиянием белков, а не холестерина, как в модельных мембранах [21]. Приведенные данные хорошо согласуются с тем фактом, что мембрана клетки разделена на отсеки барьерами, образованными цитоскелетом, что ограничивает диффузию как мембранных белков, так и липидов [22].

На основании результатов, полученных методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии, также можно полагать, что диффузия мембранных белков зависит как от липидов, так и от цитоскелета [23]. Основательно подтверждают эту точку зрения замечательные результаты и недавнего исследования, в котором методом вторичной ионной масс-спектрометрии высокого разрешения (SIMS) на культуре фибробластов выявлено наличие кластеров сфинголипидных нанодоменов в плазматических мембранах размером ~200 нм, причем эти домены не были обогащены холестерином. Обращает особое внимание факт, что предварительная обработка препаратов метил-бета-циклодекстрином, экстрагирующим холестерин из мембран и разрушающим рафты, снижало содержание холестерина на 30%, но не уничтожало сфинголипидные рафты. Однако, разрушение актинового цитоскелета клеток латрункулином (latrunculin) приводило к их исчезновению [24, 25].

На основании других данных можно сделать вывод, что подвижность и устойчивость фазы Lo в мембране модулируется гибким перераспределением холестерина в мембране: методом SAXS на гидратированных мультиламеллярных везикулах в модельных смешанных липидных слоях с холестерином и фосфолипидами было продемонстрировано, что индуцируемое температурой плавление (т.е. разрушение) Lo доменов связано с диффузией холестерина в фазу Ld и контролируется разницей в толщине фаз Lo/Ld [26]. Принципиальный вопрос, как соотносится липидная фаза Lo модельных мембран с рафтовыми образованиями биологических мембран, разрешается до некоторой степени в ряде независимых исследований, в которых подчеркивается значение взаимосвязи длины остатков высших жирных кислот природных сфинголипидов с их функциональным вкладом в организацию биологической мембраны как динамичной биохимической системы. В модельных мембранах обычно используется минимальный набор сфинголипидов с относительно короткими жирными кислотами (C_{16}/C_{18}). В природной мембране, особенно рафтовой при-

роды, сфинголипиды характеризуются большим разнообразием за счет наличия в своей структуре высших жирных кислот с существенно большим числом звеньев — C_{24} и более [15, 27]. Такое разнообразие, как полагают, лежит в основе гибкого регулирования межмолекулярных взаимодействий в мембране как отдельных сфинголипидов между собой, так и с холестерином. При этом выявляется факт взаимозависимой транслатеральной асимметрии в распределении как холестерина, так и различных сфинголипидов между двумя липидными листами в биологической мембране. Комплексное исследование на модельных системах гигантских (GUV) и больших (LUV) везикул, симулирующих мембраны с рафтовым составом липидов, показывает, что в смеси сфингомиелины с остатками жирных кислот C_{24} и C_{16} проявляют различия при взаимодействии с холестерином в липидном бислое. C_{24} сфингомиелин, в отличие от C_{16} сфингомиелина, в присутствии холестерина имеет тенденцию к транслатеральным переходам в бислойной мембране благодаря большему несоответствию между усиленной гидрофобной частью молекул (т.е. увеличенной длиной жирнокислотного остатка) и размером полярной части сфингозинового основания, ведущему к образованию дефектов — гидрофобных полостей в липидном слое. Как результат, имеет место перераспределение холестерина во внутренний лист бислойной мембраны при преимущественной локализации C_{24} сфингомиелина во внешнем листе и размывании в нем фазы Lo. Примечательно, C_{24} сфингомиелин, в отличие от C_{16} сфингомиелина, при локализации во внешнем листе мембраны GUV полностью предотвращал образование микродоменов (фазы Lo) в нем в широком диапазоне температур (3–30°C) и концентраций холестерина (0–50%). Наблюдения на плазматических мембранах живых клеток HeLa также показали, что C_{24} сфингомиелин, присутствующий в природной мембране преимущественно во внешнем листе, ограничивает образование оптически разрешимых доменов. При этом предполагается, что наблюдаемые эффекты могут быть следствием перераспределения холестерина во внутренний лист мембраны [28].

При исследовании методами флуоресцентной спектроскопии и микроскопии модифицированной линии дрожжей также было показано, что около 80% стерина плазматической мембраны клеток сосредоточено во внутреннем листе, причем на асимметрию распределения стерина влияет транслатеральная асимметрия фосфолипидов и сфинголипидов [29]. Внутренний цитозольный лист в эритроцитах и в нуклеализированных клетках также обогащен холестерином [30]. Предпочтительная ко-локализация холестерина, сфинголипидов и фосфатидилсерина, которыми обогащен внутренний лист биомембраны была ранее продемонстрирована [31]. Полагают, что на молекулярном уровне одним из наиболее значимых эффектов холестерина является упорядочи-

вающее действие на ацильные остатки жирных кислот мембранных липидов. Холестерин представляет собой нейтральное соединение на основе холестереновой структуры с четырьмя жесткими конденсированными циклами, содержащими двойную связь, окси-группу и короткую алкильную цепь. В энергетически выгодном состоянии основная гидрофобная часть холестерина погружена вовнутрь углеводородного слоя из остатков жирных кислот липидов. В этом положении холестерин почти полностью пронизывает один лист бислоистой мембраны, внедряясь своей окси-группой в полярную пограничную область этого листа [32, 33]. Независимые исследования свидетельствуют, что холестерин способен образовывать стехиометрические комплексы с полярными липидами плазматических мембран [34]. В мультикомпонентных липидных смесях холестерин предпочтительно взаимодействует с насыщенными цепями жирных кислот сфинго- и фосфолипидов, которые сами по себе характеризуются высокой температурой фазового перехода из гелевой в жидко-кристаллическую фазу [35]. На гидратированных мультислойных везикулах было продемонстрировано сосуществование L_0 и L_d фаз в модельных смешанных липидных слоях с холестерином и фосфолипидами. L_0 домены оказались на $\sim 10 \text{ \AA}$ толще и латерально более плотными на $\sim 20 \text{ \AA}^2/\text{липид}$, чем L_d домены, и значительно более жесткими. Повышение концентрации холестерина в этой системе приводило к значительным изменениям в структуре фазы L_d , тогда как влияние на фазу L_0 было незначительным [26]. Очевидно, что постоянное перераспределение холестерина и сфинголипидов между двумя листами биомембран под влиянием физико-химических и стерических параметров самих липидов, а также и под направленным воздействием мембранных и мембран-ассоциированных белков и мембранных ферментов (флиппаз), является ключевым процессом в поддержании фазы L_0 в необходимом функциональном состоянии. В целом можно полагать, что холестерин и его аналоги, выступают в роли важнейших модуляторов структурной реорганизации биологической мембраны, гибко определяя ее базовые характеристики (жесткость, кривизна, проницаемость и др.) в процессе функционирования [36, 37].

На наш взгляд, значение роли холестерина как низкомолекулярного биорегулятора многих функций биологических мембран коррелирует с аналогичными функциями многих других родственных стероидных соединений на системном уровне, которые также регулируют и модулируют многие биохимические и физиологические процессы. Соответственно, перенос результатов, полученных на модельных мембранах и других искусственных системах, на живые биологические мембраны требует большой критичности и осторожности [13].

Таким образом, кратко упомянутые выше многочисленные экспериментальные подходы иссле-

дования липидных рафтов, как физико-химические, так и биохимические, часто дают не достаточно однозначные результаты, как полагают, вследствие высокой динамичности и малого размера рафтов в мембранах клеток. Однако можно привести ряд примеров изучения стабилизированных мембранных систем, обогащенных сфинголипидами, холестерином и мембран-активными белками. Рафтоподобные структуры на фиксированных мембранах эритроцитов [38] и на модельных мембранах [39] были прямо визуализированы методом АСМ высокого разрешения. Также неинвазивным химическим методом оказалось возможным специфически окрасить FITC-меченым гликоль-хитозаном рафтовые домены как модельных, так и природных мембран за счет, как полагают, электростатических и/или гидрофобных взаимодействий этого полимерного агента с рафтами [40]. Природными мембранами, в которых липиды организованы во множество рафтовых нанокластеров, стабилизированных взаимодействиями с мембран-активными белками и, очевидно, не представляющими собой динамические образования, являются также липидные оболочки вирионов IFV, вируса болезни Ньюкасла (NDV) и некоторых других оболочечных вирусов [41–43].

Структурная организация вирионов оболочечных вирусов, как и вирусов в целом, представляет собой яркий пример прекрасно аранжированных межмолекулярных взаимодействий белков, липидов и нуклеиновых кислот в составе надмолекулярных комплексов. При этом вирусы являются более простыми объектами, чем клетки и посему более пригодны для детализированных структурных исследований. Так, установлено, что мембрана вирионов ряда оболочечных вирусов существенно отличается по липидному составу от мембраны клетки, из которой они почкуются: она в значительной степени обогащена холестерином и сфинголипидами. Рафтовая природа оболочек ряда вирусов, включая вирус гриппа (IFV) и вирус иммунодефицита человека (HIV), была доказана методом масс-спектрометрии [26, 43]. При этом особенно важным является выявление большого количества сфинголипидов с необычной структурой и отличающихся наличием очень длинных ацильных остатков насыщенных высших жирных кислот в них (например, для вируса гриппа с количеством углеродных звеньев до C_{40} – C_{42} и выше [15]). В настоящее время существует представление, что интегральные мембранные белки многих оболочечных вирусов, находятся в тесной взаимосвязи с микродоменами рафтовой природы в клеточных мембранах. Это предположение подтверждается, в частности, на наблюдаемом группировании белков IFV в составе детергентоустойчивых мембран (рафтов). Структура вирусной оболочки поддерживается тесными взаимодействиями между трансмембранными (ТМ) доменами поверхностных гликопротеидов вирионов и слоем периферического мембранного мат-

риксного (M1) белка, ассоциированным в составе рафтовой мембраны [44].

Большинство интегральных мембранных белков пронизывают мембрану в виде ТМ сегментов, состоящих из пептидных спиралей, часто плотно упакованных в пучки [45, 46], и возможно являются наиболее важным фактором, определяющим толщину мембран [47]. В свою очередь, липидные бислоиные мембраны, в которую эти спирали внедрены, высоко анизотропны, и их физико-химические характеристики, как латеральные, так и транс-латеральные, сильно изменяются даже в пределах малых масштабов. Такая анизотропия влияет на распределение аминокислотных остатков в последовательности ТМ сегментов. Гипотеза гидрофобного соответствия предполагает, что интегральные мембранные белки перестраивают окружающие липиды таким образом, что толщина мембранного бислоя начинает подстраиваться к длине трансмембранного сегмента, а липидные мембраны, содержащие холестерин, имеют тенденцию к повышенной толщине бислоя, по сравнению с мембранами, не имеющими холестерина [48]. Специфический липидный состав рафтов обуславливает более плотную упаковку липидов в их структуре, придавая рафтам жесткость и большую толщину по сравнению с мембраной в целом. При этом межспиральные взаимодействия ТМ сегментов, как отмечается, могут определяться не только утолщением рафтовой мембраны за счет холестерина и высокой упорядоченности остатков жирных кислот: в ряде случаев само-ассоциация возможно происходит благодаря исключению α -спиральных ТМ сегментов из более плотной фазы L_0 в липидных бислоях, причем холестерин, как отмечается, способствует не только межспиральным взаимодействиям, но и инициирует искривление мембранной структуры [49].

Следует особо остановиться на свойствах так называемых бороздчатых (striated) доменов в модельных липидных бислоиных мембранах. Эти домены представляют собой высокоупорядоченные линейные агрегаты липидов и модельных гидрофобных пептидов (poly-LA) с фланкирующими концами из остатков триптофана (пептиды WALP). Тогда как модельные липидные бислои дипальмитоил-фосфатидилхлина являются равномерно гладкими и плоскими, внедрение в них пептидов WALP вызывает появление темных линейных депрессий (борозд), которые затем объединяются в небольшие бороздчатые домены с гексагональной структурой. Методом АСМ было показано, что борозды этих доменов пересекаются под углом $\sim 120^\circ$. Однако в фазе L_0 липидных бислоев, включающих сфингомиелин и холестерин, таких бороздчатых доменов не наблюдалось [45, 47, 49, 51]. Трансмембранные белки очевидно сами не встраиваются вовнутрь рафтовых платформ (липидная фаза L_0), а активно формируют их своими ТМ фрагментами и ассоциируются с их периферией [52], в частности,

встраивание меченого гемагглютиниона (НА) IFV исключительно в липидную фазу L_d было прямо визуализировано методом флуоресцентной микроскопии при встраивании его в гигантские везикулы, содержащие фазы L_0 и L_d [53], а также независимо подтверждено методом компьютерного моделирования [42]. Примечательно, что компьютерная симуляция не только показывает распределение НА в фазу L_d , но также выявляет роль тримерных шипов НА как агентов, активно формирующих фазу L_0 и общую положительную кривизну мембраны с помощью своих ТМ доменов. При этом удается оценить как форму такого образования, близкую к гексагональной, так и его размер (~ 10 – 20 нм) [42]. Эти результаты хорошо соотносятся с экспериментальными данными более ранних работ. Тонкая структура дегидратированных вирионов вируса IFV типа А, исследованных методом электронной микроскопии, как было показано, напоминает икосаэдр с шипами НА, расположенными на поверхности в виде равнобедренных треугольников, которые в свою очередь формируют правильные шести- и пятиугольные элементы с размерами в поперечнике ~ 20 нм [54]. Криоэлектронные микрофотографии вирионов кошачьего пенящего вируса также фиксируют вирионы с фрактальной структурой, образованной гексагональными элементами [55]. В следующей работе были визуализированы рафтоподобные структуры, получаемые при специфической холодовой (рафтовой) солиubilизации комбинацией неионных детергентов оболочек вирионов IFV в виде комплекса НА с липидами и периферическим белком M1. Эти дискретные структуры имели средний размер частиц ~ 28 нм и организовывались в процессе флотации при центрифугировании в градиенте плотности в стабильные везикулы [41].

Примечательно, что похожие гексагональные структурные элементы были зафиксированы также на модельных бислоиных мембранах состава сфингомиелин/холестерин методом высокоскоростной АСМ при взаимодействии олигомеров порообразующего токсина лизенина с мембраной, на которой олигомеры и формируются [39].

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ РАФТОВОЙ СТРУКТУРЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Архитектура и структурная организация ТМ доменов интегральных мембранных белков и их спиральных ТМ сегментов в бислоиных мембранах подробно освещены в специальных обзорах [45, 47, 56]. В данном разделе целесообразно выделить те особо значимые структурные особенности, которые являются общими для большинства ТМ доменов. В первичной последовательности ТМ доменов аминокислотные остатки расположены характерным образом в профиле бислоиной липидной мембраны, отражающим их структурно-функциональный вклад в организацию липид-белкового ансамбля биологических

мембран [45, 56, 57]. ТМ сегменты этих доменов, как известно, состоят из 20–25 аминокислотных остатков, которые внутри липидного бислоя в основном представлены гидрофобными аминокислотами (**V**, **L**, **I**, **F**, **A**). При этом, остатки **V**, **L**, **I** в виде кластеров находятся преимущественно на внешней стороне пучка скрученных спиралей. Более компактные остатки аланина напротив локализуются преимущественно внутри, способствуя ассоциации α -спиралей в пучке.

Очевидно, именно такая архитектура наиболее надежно скрепляет трансмембранный пучок спиралей одновременно с двумя листами мембраны за счет гидрофобных взаимодействий с ацильными остатками жирных кислот липидов. Фенилаланин (**F**) со своим гидрофобным ароматическим кольцом, лишенным гетероатомов и поляризационных эффектов, также располагается предпочтительно в гидрофобной части ТМ доменов, хотя имеет и более широкое распространение, выполняя вероятно двойственную функцию как гидрофобной, так и ароматической аминокислоты [57, 58]. Тонкая межфазная пограничная область мембран на стыке гидрофобной области внутри мембраны и внешней высокополярной ионизированной и гидратированной среды, окружающей мембрану, обогащена ароматическими остатками **W**, **Y**, а иногда и **H**, которые имеют поляризованные ароматические циклы за счет наличия гетероатомов в **W** и **H** или полярных заместителей в **Y**. Этот тонкий слой мембран, непосредственно обращенный к водной фазе, представляет собой химически разнородную сложную среду, состоящую из структурных элементов глицерина, и поляризованных остатков холина/этанолamina фосфолипидов. Эти элементы образуют пограничную область биологических мембран вместе с полярными группами сфингозинового основания (глико)сфинголипидов, холестерина, и молекул воды. Молекулы сфинголипидов, в отличие от глицерофосфолипидов, обладают более высоким потенциалом взаимодействия как между собой, так и с холестерином за счет существенно большей длины углеводородных остатков жирных кислот (особенно в рафтовых доменах) и также за счет наличия большого количества полярных донорно-акцепторных групп ($-\text{OH}$, $-\text{NH}$, $>\text{C}=\text{O}$), способных к образованию сложной сети многочисленных водородных связей [6, 59, 60], а также к π -взаимодействиям с ароматическими циклами аминокислот как раз в полярной области на межфазной границе мембранного листа.

Хорошо известно, что межмолекулярные взаимодействия с участием ароматических циклов (π/π , OH/π , NH/π , катион/ π взаимодействия) являются ключевыми процессами во взаимном распознавании молекул по принципу как биологического, так и химического родства. Эти взаимодействия контролируют кристаллическую структуру ароматических молекул, стабильность многих био-

логических систем и процессы молекулярного распознавания в них. Поэтому изучение силы таких взаимодействий и их физической природы очень важны для понимания структур и свойств многих надмолекулярных образований [61]. Наличие этих взаимодействий как раз и подтверждается характерным присутствием в большинстве ТМ доменов поляризованных гетероциклических ароматических остатков **W**, причем, как правило, именно в полярной пограничной области липидной мембраны и вблизи аминокислотных остатков **F**/**Y**. Изучение поведения гидрофобных синтетических пептидов с фланкирующими остатками триптофана (модельные пептиды WALP) в модельных липидных бислоях, а также многих мембранных белков, показывает, что гетероциклический остаток триптофана преимущественно располагается вблизи карбонильных остатков в фосфолипидных бислоях и не вовлекается ни в гидрофобный слой липидов, ни в водную полярную среду. Анализ поведения гидрофобных синтетических пептидов поли-лейцилаланил (poly **LA**) с фланкирующими остатками лизина (модельные пептиды KALP) в липидных бислоях показывает, что положительно заряженные остатки лизина предпочтительно локализуются дальше от полярного пограничного слоя мембран и фиксируются на значительно более полярной ионизированной поверхности мембраны, где они взаимодействуют с отрицательно заряженными фосфатными и цвиттерионными группами фосфолипидов. Отмечается, что боковая функция **K** более эффективно связывается с этими группами, чем **R** [47, 56, 62, 63, 68]. Ароматический гетероцикл **H** также способен выступать в роли положительно заряженной аминокислоты при протонировании в диапазоне физиологических значений pH, аналогично **K** и **R**, выполняя функцию своего рода pH-зависимого переключателя и вызывая изменения в липид-белковых взаимодействиях при изменении pH: известно, что рКа имидазольного цикла сильно зависит от локального окружения [47]. Таким образом, положительно заряженные аминокислоты играют важную роль в топологии мембранных белков [45]. То есть, **H**, как и **F**, вероятно может выполнять двойственную функцию при взаимодействиях белков с липидами мембраны.

Компьютерное молекулярно-динамическое моделирование предоставляет дополнительную информацию о том, что гидрофобные углеводородные цепочки боковых остатков **K** и **R** вероятно погружены в гидрофобный слой мембраны, а положительно заряженные группы локализуются в пограничной полярной интерфазе, также как и ароматические циклы. Аналогичная локализация выявляется и для боковых остатков **M**, что можно объяснить наличием сульфометильной группы, характерной чертой которой является высокая поляризованность [58]; такая мембранная активность этой аминокислоты косвенно подтверждается и экспериментальными данными [64]. Несмотря на то, что использованный метод моделирова-

ния имел существенные ограничительные условия, полученные данные позволяют строить предположения о более значительном, чем представлялось, структурно-функциональном вкладе тонкой поляризованной пограничной интерфазы липидной слоя в консолидацию липидов в рафтах под действием мембраноактивных мотивов белков.

Суммируя известные экспериментальные данные и теоретические рассуждения, можно заключить, что липидная бислойная мембрана организована в три принципиальных латеральных макродомена: (i) внутренний гидрофобный, образованный углеводородными остатками жирных кислот липидов, (ii) межфазный пограничный, образованный полярными, но не заряженными, структурными элементами липидов и холестерина, склонными к π -взаимодействиям и формированию водородных связей, и (iii) ионизированная гидратированная поверхность мембраны, содержащая отрицательно заряженные фосфатные и цвиттерийонные группы фосфолипидов.

В соответствии с принципами концепции гидрофобного соответствия и адаптации, то есть согласно базовым свойствам трех принципиальных макродоменов биомембран, осуществляется встраивание ТМ сегментов, а также и других мотивов мембран-активных белков в бислойные мембраны; и это встраивание может модулироваться сродством ароматических и заряженных аминокислотных остатков к соответствующим специфическим межфазным сайтам мембраны. Это заключение подтверждается расчетом количественного вклада каждой из двадцати аминокислот в этот механизм при измерении кажущейся свободной энергии внедрения спиральных ТМ сегментов в биологическую мембрану (ΔG_{app}), и статистическим анализом распределения индивидуальных аминокислот внутри этих фрагментов для множества известных интегральных мембранных белков. На основании этих расчетов, а также и других компьютерных симуляций в сочетании с экспериментальными данными, удалось создать шкалу своего рода "биологической гидрофобности" и определить в виде кривых распределения Гаусса оптимальную позицию внутри липидного бислоя для каждой из 20 аминокислот [57, 58, 65]. Полученные распределения наглядно выявляют тяготение ароматических аминокислот к дислокации как раз у пограничного слоя между липидной мембраной и ионизированной средой, причем **F** имеет тенденцию к размещению внутри мембраны, а **Y** предпочтительно располагается вне мембраны. Функция ароматических остатков, прежде всего **W** и **Y**, заключается в фиксации (anchoring) ТМ сегментов на пограничных полярных интерфазах бислойной мембраны, обращенных к водной среде.

Фиксация полипептидных цепей ТМ сегментов на полярных интерфазах двух листов биомембраны часто необходима для регулирования угла наклона и/или угла вращения ТМ сегментов

внутри липидного бислоя к его нормали, в зависимости от длины ТМ сегмента [56, 65, 66]. При этом в рафтовых мембранах ТМ сегменты локализуются на границе двух липидных фаз, L_o и L_d , и ассоциированы с L_o (рафтовой) фазой, что способствует их олигомеризации.

Положительно заряженные остатки **K**, **R**, локализующиеся вне мембраны, ассоциируются с внешней заряженной гидратированной поверхностью мембран, что способствует разрушению олигомерных ассоциатов ТМ доменов в этой области за счет отталкивания одноименных зарядов, что, например, наглядно иллюстрируется компьютерными предсказаниями разупорядоченности цепей эктодомена HA IFV как раз в этой примембранной области [67].

С учетом всего вышеизложенного становится возможным выдвинуть предположение, что важным фактором, формирующим рафтовые домены в биологических мембранах, является консолидирующий потенциал тонкой полярной интерфазы, который основан на синэргетическом взаимодействии множества полярных групп (глико)сфинголипидов. Последние обладают повышенным потенциалом взаимодействия как между собой, так и с холестерином, и таким образом концентрируют эти молекулы в уплотненных рафтовых структурах, что согласуется и с данными исследований модельных мембранных структур сфингомиелина методом ЯМР [68]. Наряду с этим консолидации рафтовых липидов также способствуют усиленные гидрофобные взаимодействия насыщенных углеводородных цепей жирных кислот сфинголипидов, которые имеют значительно большую длину, чем другие липиды мембраны [15]. Поддержание таких мультимолекулярных агрегатов в биомембране в стабильном состоянии, особенно при физиологических температурах [60], вероятно требует дополнительных стабилизирующих структур, своего рода внешних поддерживающих конструкций, в виде специфических мотивов/доменов мембранных и мембран-ассоциированных белков, которые специфически взаимодействуют с рафтовыми липидами.

Таким образом, можно полагать, что изложенные выше структурообразующие принципы на молекулярном уровне в основном реализуются при взаимодействиях как ТМ сегментов интегральных мембранных белков с липидами внутри биологической мембраны, так и периферических мембран-ассоциированных белков, примыкающих к ее поверхности. Эти взаимодействия являются инструментом для формирования и укрепления межфазных пограничных контактов между двумя фазами, L_o и L_d , внутри биологических мембран, а также и на границе мембран с внешней средой электролита.

CRAC МОТИВЫ КАК ВАЖНЕЙШИЙ СТРУКТУРНЫЙ ЭЛЕМЕНТ ПОДДЕРЖАНИЯ ФУНКЦИЙ РАФТОВЫХ БИОМЕМБРАН

Также как и для интегральных мембранных белков электростатические, гидрофобные и π -взаимодействия, опосредуемые соответственно катионными, алифатическими, и ароматическими аминокислотными остатками, являются определяющими для поверхностного связывания периферических мембран-ассоциированных белков с мембраной. Эти белки или их домены сами по себе не включаются в рафтовые структуры, но могут вносить свой вклад в перераспределение холестерина в мембранах. Известны типы взаимодействия белков с липидами, которые фиксируют холестерин мембраны и таким образом стабилизируют обогащенные холестерином мембранные домены – рафты. Одним из основных аминокислотных консенсусных мотивов, которые способствуют взаимодействию белков с холестерином, является так называемый холестерин-распознающий аминокислотный консенсусный мотив (CRAC motif), $-(L/V)_{1-2}-(X)_{(1-5)}-Y-(X)_{(1-5)}-R/K-$, выявленный в первичной последовательности таких белков. Эта формула в действительности является более гибкой и может трактоваться более широко [69, 70]. Консенсус с приведенной формулой впервые был выявлен в C-концевой части так называемого периферического бензодиазепинового рецептора (теперь транслокаторный белок) [71]. Было показано, что этот небольшой белок, как и пептидные синтетические аналоги его консенсусного мотива, связывают холестерин, что и послужило основанием для введения данного термина. Подобные консенсусы были выявлены и во многих других белках. Они локализуются непосредственно в приграничной мембранной области, их длина в соответствии с алгоритмом может варьироваться примерно от 5 до 13 аминокислот [70]. Помимо CRAC мотива трансмембранные и мембран-ассоциированные белки могут включать в свою структуру и другие дополнительные группы, такие как миристоильные и пальмитоильные остатки и другие, которые также придают им способность вовлекаться в рафтовые домены [68, 69]. Анализ результатов многочисленных исследований позволяет предположить, что все CRAC мотивы можно разделить соответственно их топологии на две группы, несколько различающиеся по формуле мотивов, а именно трансмембранные и мембран-ассоциированные структурно-функциональные единицы [17]. Примерами таких структурных мотивов могут служить последовательность **LWYIK** в сегменте белка слияния Grp41 вируса иммунодефицита человека (HIV), примыкающего к спиральному ТМ сегменту и обогащенного остатками триптофана [69, 72] или заякоривающий мембранный фрагмент протонного канала IFV (белок M2), в первичной последовательности которого объединены обе эти структуры [73]. CRAC мотивы с участием ТМ до-

менов интегральных мембранных белков, чья биологическая активность является холестерин-зависимой (например, FcγRI, пуринорецептор P2X1, коннексыны Cx32 и Cx43 и др.), были выявлены при выравнивании их аминокислотных последовательностей, и соответствовали формуле $-(L/V)_{1-2}-X_{1-4}-Y/F-X_{1-3}-W-$ [74]. Позднее, мотивы с близкими формулами были обнаружены и во множестве других ТМ доменов интегральных мембранных белков, включая и НА вируса гриппа [75]. Схожая структура, представляющая собой холестерин связывающий сайт, была выявлена в α -спиралях IV и II β 2-адренорецептора человека, которая, в отличие от вышеописанных мотивов, была определена как составной холестеринный консенсусный мотив (cholesterol consensus motif, CCM), с формулой: $-R/K-(X)_{7-10}-W/Y-(X)_4-L/V/I-$ – на одной спирали, и F/Y – на другой [76]; CCM здесь образует пространственную щель для связывания холестерина. Другой CCM, приспособленный для поверхностного связывания с рафтами вирусной мембраны, был обнаружен на поверхности глобулы мембран-ассоциированного M1 белка IFV; в этом случае два аминокислотных остатка (**L** и **Y**) подмембранного консенсусного мотива располагались на одной спирали, а третий (**R**) – на другой [77].

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РАФТОВЫХ МЕМБРАН НЕКОТОРЫХ ОБОЛОЧЕЧНЫХ ВИРУСОВ

Оболочечные вирусы с мембраной рафтовой природы, особенно те из них, структура и липидный состав оболочек которых достаточно подробно исследованы, являются наиболее ценными и информативными объектами для изучения структурных принципов и молекулярных механизмов формирования липидных рафтов в биологических мембранах в целом. В частности, данные о структуре интактных вирионов IFV и NDV с достаточно высоким разрешением получены методом криоэлектронной томографии [78, 79]. На основании биохимических и физико-химических исследований были выдвинуты предположения, что оболочку вирусов гриппа можно рассматривать как мозаичную смесь рафтовых и нерафтовых микродоменов или как некий ансамбль гибко сочлененных рафтовых платформ, разделенных узкими флюидными участками липидной мембраны. Такая мембрана являет собой образец сосуществования двух липидных фаз, при этом основная часть липидов присутствует в виде стабильных рафтовых кластеров, организуемых ТМ доменами трансмембранных мембранных белков совместно с мембран-ассоциированным матричным M1 белком [42, 80]. Сравнение данных криоэлектронной томографии вирионов IFV и NDV свидетельствует о том, что оболочка NDV принципиально устроена похожим образом. В недавних исследованиях этот взгляд нашел подтверждение и в отношении биологических мембран в

целом. Результаты этих исследований показывают, что холестерин в них составляет около 40 мол. % всех липидов плазматических мембран и, вероятно, и находится в соотношении 1 : 1 с фосфолипидами мембран [81], и позволяют предполагать, что около трех четвертей липидов бислоистой мембраны, окруженной минорной фазой Ld может пребывать в фазе Lo в конденсированном состоянии [82].

С другой стороны, вышеописанная структурная организация липидных оболочек IFV и NDV ожидаемо предполагает наличие CRAC мотивов как в ТМ доменах, так и в последовательностях мембран-ассоциированных матриксных белков [75]. Матриксные белки IFV, HIV и NDV представляют собой небольшие молекулы, которые при выполнении своих множественных функций при инфицировании, находятся в постоянном взаимодействии с липид-белковыми надмолекулярными структурами [10, 80]. В связи с этим появляется все больше исследований по выявлению в их первичных последовательностях специфических мотивов и структурных доменов, определяющих взаимодействие с различными партнерами и влияющих на базовые характеристики вирусов (морфологию, репликацию, инфекционность и т.д.). Ранее CRAC мотив был описан на одной из α -спиралей M1 белка, которая содержит еще и сигнал ядерной локализации этого белка [83]. Оказалось, что некоторые из α -спиралей с CRAC мотивами в M1 IFV обладают и вторыми, ранее установленными, функциональными мотивами на противоположных сторонах α -спиралей (NLS, сигнал ядерной локализации и NES, сигнал ядерного экспорта); примечательно, что оба этих сигнальных мотива участвуют в трансмембранном переносе M1 через ядерную мембрану клетки. Таким образом, выяснилось, что эти спирали имеют двойную функциональную нагрузку, то есть являются амфипатическими [77, 17].

Вышеупомянутая консервативная последовательность ионного канала (M2 белка) IFV, примыкающая к его трансмембранному сегменту, параллельная поверхности мембраны и взаимодействующая с рафтовыми доменами, не только представляет собой сегмент перекрывающихся CRAC мотивов, но и организована в амфипатическую α -спираль [73].

Подробный анализ и моделирование пространственной структуры матриксных M белков IFV, NDV и HIV по данным рентгеноструктурного анализа в сочетании с биоинформатическим обработкой последовательностей, позволил идентифицировать в этих белках мотивы, соответствующие формуле CRAC, и также выявить амфипатический характер тех элементов вторичной структуры (α -спиралей и β -складчатых структур), на которых располагались CRAC мотивы, то есть функциональные аминокислотные остатки-компоненты CRAC мотивов выстраивались линейно на элементах вторичной структуры и экспонировались вовне. Такая пространственная конфигу-

рация как раз и позволяет этим структурным элементам располагаться параллельно поверхности мембраны и взаимодействовать с боковой поверхностью рафтовых платформ, внедряясь во флюидную фосфолипидную фазу Ld, окружающую рафт. Пространственное моделирование показало, что именно элементы вторичной структуры этих M белков с CRAC мотивами, экспонированными наружу, образуют попарно благоприятную пространственную конфигурацию на поверхности их глобул, потенциально пригодную для соединения посредством CRAC мотивов двух соседних рафтов и формирования таким образом рафтовых кластеров, формирующих вирусную мембрану на поверхности подмембранного матриксного слоя.

Методом обратной генетики ранее были осуществлены точечные мутации по аминокислотным остаткам – компонентам CRAC мотивов вируса гриппа А (A/WSN/33). Базовые характеристики полученных мутантов оказались подверженными радикальным изменениям, а многие мутационные варианты оказались нежизнеспособны [77]. С учетом этих структурных особенностей M белков становится возможным объяснить на молекулярном уровне тонкую структурную организацию оболочек M белков вирионов, которая согласуется с данными криоэлектронной томографии для вирионов IFV и NDV. Методом криоэлектронной томографии на вирионах IFV выявляется слой белка M1, прилегающий к мембране, который представляет собой сложную упорядоченную структуру из ассоциированных молекул белка, очевидно организованную в спиралеобразную сетку. Эта сеть (network) мономеров M1 белка под вирусной мембраной с регулярными полостями возможно специально предназначена для внедрения трансмембранных участков HA [84]. Данные криоэлектронной томографии также показывают, что липидная оболочка вирионов NDV организована принципиально сходным образом, но слой подмембранного матриксного M белка структурно представляет собой решетку с периодической “прямоугольной” упаковкой димеров M белка [79]. В целом, изложенные выше результаты позволяют сформулировать новый взгляд на структурно-функциональные свойства матриксных белков оболочечных вирусов с мембраной рафтовой природы и детализировать структурные аспекты функционирования рафтовых доменов в биологических мембранах на молекулярном уровне. В частности можно полагать, что CRAC мотивы поверхностных гликопротеидов и матриксных белков играют важнейшую роль в организации и поддержании фрактальной структуры липидной оболочки этих вирусов, составленной из множества нанокластеров рафтовой природы.

В заключение можно сказать, что наличие CRAC мотивов на элементах вторичной структуры как интегральных мембранных, так и мембран-ассоциированных белков характерно не только для вышеописанных объектов. Эти амфипатиче-

Таблица 1. Примеры амфипатических альфа-спиралей некоторых мембранных белков и пептидов, содержащих CRAC-мотивы

Пептидный фрагмент/пептид	Аминокислотная последовательность
α -Спираль 3 M1 белка IFV	NMDKAVKLWRKLR
α -Спираль 6 M1 белка IFV	NNMDKAVKLYRKLKR
α -Спираль 13 M1 белка IFV	GLKNDLLENLQAYQKR
α -Спираль 4 M (p17) белка HIV	SEELRSLYNTVATLYCVHQR
Пептид CADY	GLWRALWRLRLSLWRLWRA
Фрагмент N-концевого заякоривающего домена белка NS5A вируса гепатита С	SWLRDIWDWICEVLSDFK

Примечание. Аминокислоты, составляющие индивидуальные консенсусы, выделены одинаковым цветом.

ские элементы имеют более универсальную функциональную значимость во многих процессах с участием биологических мембран. Они выявляются на белках других оболочечных вирусов, а также на клеточно-проникающих пептидах (cell-penetrating peptides, CPP). Значимым примером может быть структура амфипатического пептида — производного консервативного N-концевого заякоривающего домена неструктурного белка вируса гепатита С (NS5A), который прилегает к внутреннему цитозольному листу параллельно мембране. Было показано, что синтетический аналог этого фрагмента ингибировал наработку вируса гепатита в культуре клеток, а также ингибировал инфицирование вирусом этих клеток при нетоксических концентрациях [85]. Как показали исследования, взаимодействие расширенного синтетического фрагмента этого же белка с гигантскими однослойными везикулами (GUV) с рафтовой липидной композицией индуцировало перераспределение липидов в модельной мембране с образованием оптически разрешимых доменов [86]. С точки зрения структурной организации в приведенной первичной последовательности этого пептида оказывается возможным выявить два отдельных (bipartite) CRAC мотива, то есть потенциальное формирование амфипатической α -спирали (табл. 1).

Аналогичный структурный принцип двух отдельных амфипатических CRAC мотивов выявляется также и в широко известных пептидах CADY, которые определяются как “умные” трансмембранные переносчики внутрь клетки широкого набора различных субстанций: пептидов, белков, малых РНК, липосом, лекарственных субстанций и т.д. Хорошо известно, что мембраноактивные пептиды при взаимодействии с мембранами легко адаптируются к ним, формируя вторичную структуру [87, 88]. Наличие в первичных последовательностях этих и некоторых других пептидных фрагментов двух разделенных CRAC мотивов, совмещенных на одной амфипатической структуре, подтверждает их функциональную значимость. Исходя из наших представлений, амфипатичность такого рода, как новый структурный феномен

может указывать на сложный и тонкий механизм взаимодействия таких пептидов с анизотропными биомембранами. Именно такой гибкий механизм потенциально способен индуцировать динамичное образование рафтов при транслокациях пептидов внутри биомембраны. Вероятным следствием таких структурных перестроек может явиться изменение локальных базовых характеристик мембран (кривизны, толщины, проницаемости и др.), которое регулируется динамичной пространственной перегруппировкой/транслокацией пептидных фрагментов в рафтовой биомембране.

Анализ результатов исследований последних лет свидетельствует по существу о плодотворном развитии фундаментальных представлений о механизмах взаимодействия белков и липидов, участвующих в формировании специфических рафтовых комплексов, опосредующих многие биохимические процессы биологических мембран. Значимым научным результатом можно считать выявление и изучение структурных факторов, обеспечивающих образование белок-белковых и белок-липидных комплексов, которые могут быть использованы для целенаправленного поиска и разработки новых противовирусных препаратов, а также новых лекарственных иммуномодулирующих средств.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда фундаментальных исследований (проекты РФФИ № 16-04-00563 и № 18-04-01363).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Singer S.J., Nicolson G. L.* // *Science*. 1972. V. 175. P. 720–731.
2. *Simons K., Van Meer G.* // *Biochemistry*. 1988. V. 27. P. 6197–6202.
3. *Simons K., Ikonen E.* // *Nature*. 1997. V. 387. P. 569–572.
4. *Simons K., Toomre D.* // *Mol. Cell. Biol.* 2000. V. 1. P. 31–39.
5. *Bigay J., Antonny B.* // *Developmental Cell*. 2012. V. 23. P. 886–895.
6. *Lingwood D., Simons K.* // *Science*. 2010. V. 327. P. 46–50.
7. *Quinn P. J.* // *Progress in Lipid Research*. 2012. V. 51. P. 179–198.
8. *Pare C., Lafleur M.* // *Biophys. J.* 1998. V. 74. P. 899–909.
9. *Marsh D.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 2008. V. 1778. P. 1545–1575.
10. *Boulo S., Akarsu H., Ruigrok R.W.H., Baudin F.* // *Virus Res.* 2007. V. 124. P. 12–21.
11. *Mollinedo F., Gajate C.* // *Adv. Biol. Regulation*. 2015. V. 57. P. 130–146.
12. *Devaux P.F., Morris R.* // *Traffic*. 2004. V. 5. P. 241–246.
13. *Lorent J.H., Levental I.* // *Chem. Phys. Lipids*. 2015. V. 192. P. 23–32.
14. *Stone M.B., Shelby S.A., Nunez M.F., Wisser K., Veatch S.L.* // *elife*. 2017. V. 6.
15. *Gerl M.J., Sampaio J.L., Urban S., Kalvodova L., Verbavatz J.-M., Binnington B., Lindemann D., Lingwood C.A., Shevchenko A., Schroeder C., Simons K.* // *J. Cell. Biol.* 2012. V. 196. P. 213–221.
16. *Brügger B., Grass B., Haberkant P., Leibrecht I., Wieland F.T., Kräusslich H.-G.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 2641–2646.
17. *Radyukhin V.A., Dadinova L.A., Orlov I.A., Baratova L.A.* // *J. Biomol. Struct. Dynam.* 2018. V. 36. P. 1351–1359.
18. *Brown D.A., Rose J.K.* // *Cell*. 1992. V. 68. P. 533–544.
19. *Hattersley K.J., Hein L.K., Fuller M.* // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2013. V. 442. P. 62–67.
20. *Gowrishankar K., Ghosh S., Saha S.C.R., Mayor S., Rao M.* // *Cell*. 2012. V. 149. P. 1353–1367.
21. *Mueller V., Ringemann C., Honigmann A., Schwarzmann G., Medda R., Leutenegger M., Polyakova S., Belov V.N., Hell S.W., Eggeling C.* // *Biophys. J.* 2011. V. 101. P. 1651–1660.
22. *Fujiwara T. K., Iwasawa K., Kalay Z., Tsunoyama T. A., Watanabe Y., Umemura H., Murakoshi Y.M., Suzuki K.G., Nemoto Y.L., Morone N., Kusumi A.* // *Mol. Biol. Cell*. 2016. V. 27. P. 1101–1119.
23. *Lenne P.F., Wawrzyniak L., Conchonaud F., Wurtz O., Boned A., Guo X.J., Rigneault H., He H.T., Marguet D.* // *EMBO J.* 2006. V. 25. P. 3245–3256.
24. *Frisz J.F., Kaiyan Lou, Klitzing H.A., Hanafin W.P., Lizunov V., Wilson R.L., Carpenter K.J., Kim R., Hutcheon I.D., Zimmerberg J., Weber P.K., Kraft M.L.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. P. 2701–2702.
25. *Frisz J.F., Klitzing H.A., Lou K., Hutcheon I.D., Weber P.K., Zimmerberg J., Kraft M.L.* // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. P. 16855–16861.
26. *Heftberger P., Kollmitzer B., Rieder A.A., Amenitsch H., Pabst G.* // *Biophys. J.* 2015. V. 108. P. 854–862.
27. *Garner A.E., Smith D.A., Hooper N.M.* // *Mol. Mem. Biol.* 2007. V. 4. P. 233–242.
28. *Courtney K.C., Pezeshkian W., Raghupathy R., Zhang C., Darbyson A., Ipsen J.H., Ford D.A., Khandelia H., Presley J.F., Zha X.* // *Cell Reports*. 2018. V. 24. P. 1037–1049.
29. *Solanko L.M., Sullivan D.P., Sere Y.Y., Szomek M., Lunding A., Solanko K.A., Pizovic A., Stanchev L.D., Pomorski T.G., Menon A.K., Wüstner D.* // *Traffic*. 2018. V. 19. P. 198–214.
30. *Van Meer G.* // *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 2011. V. 3:a004671.
31. *Fairn G.D., Schieber N.L., Ariotti N., Murphy S., Kuerschner L., Webb R.I., Grinstein S., Parton R.G.* // *J. Cell Biol.* 2011. V. 194. P. 257–275.
32. *Daly T.A., Minghui Wang, Regen S.L.* // *Langmuir*. 2011. V. 27. P. 2159–2161.
33. *Róg T., Vattulainen I.* // *Chem. Phys. Lipids*. 2014. V. 184. P. 82–104.
34. *Litz J.P., Thakkar N., Portet T., Keller S.L.* // *Biophys. J.* 2016. V. 110. P. 635–645.
35. *Sung-Tae Yang, Kreutzberger A.J.B., Jinwoo Lee, Kiessling V., Tamm L.K.* // *Chem. Phys. Lipids*. 2016. V. 199. P. 136–143.
36. *Langea Y., Steck T.L.* // *Chem. Phys. Lipids*. 2016. V. 199. P. 74–93.
37. *Marquardt D., Kucerka N., Wassall S.R., Harrounf T.A., Katsaras J.* // *Chem. Phys. Lipids*. 2016. V. 199. P. 17–25.
38. *Mingjun Cai, Weidong Zhao, Xin Shang, Jinguang Jiang, Hongbin Ji, Zhiyong Tang, Hongda Wang* // *Small*. 2012. V. 8. P. 1243–1250.
39. *Yilmaz N., Yamada T., Greimel P., Uchihashi T., Ando T., Kobayashi T.* // *Biophys. J.* 2013. V. 105. P. 1397–1405.
40. *Yao-Wen Jiang, Hao-Yue Guo, Zhan Chen, Zhi-Wu Yu, Zhifei Wang, Fu-Gen Wu.* // *Langmuir*. 2016. V. 32. P. 6739–6745.
41. *Radyukhin V., Fedorova N., Ksenofontov A., Serebryakova M., Baratova L.* // *Arch. Virol.* V. 153. P. 1977–1980.
42. *Parton D. L., Tek A., Baaden M., Sansom M.S.P.* // *PLoS Comput. Biol.* 2013. V. 9(4): e1003034. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003034>
43. *Laliberte J.P., McGinnes L.W., Morrison T.G.* // *J. Virol.* 2007. V. 81. P. 10636–10648.
44. *Ali A., Avalos R.T., Ponimashkin E., Nayak D.P.* // *J. Virol.* 2000. V. 74. P. 8709–8719.
45. *Nyholm T.K.M., Özdirekcan S., Killian A.* // *Biochemistry*. 2007. V. 46. P. 1457–1465.
46. *Pogozheva I.D., Mosberg H.I., Lomize A.L.* // *Prot. Sci.* 2014. V. 23. P. 1165–1196.
47. *De Kruijff B., Killian J.A., Ganchev D.N., Rinia H.A., Sparr E.* // *Biol. Chem.* 2006. V. 387. P. 235–241.
48. *Jensen M.O., Mouritsen O.G.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 2004. V. 1666. P. 205–226.
49. *Kaiser H.-J., Orłowski A., Róg T., Nyholm T.K.M., Wengang C., Ten Feizi, Lingwood D., Vattulainen I., Simons K.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. P. 16628–16633.
50. *Vidal A., McIntosh T.J.* // *Biophys. J.* 2005. V. 89. P. 1102–1108.
51. *Sparr E., Ash W.L., Nazarov P.V., Rijkers D.T., Hemminga M.A., Tieleman D.P., Killian J.A.* // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 39324–39331.
52. *Fastenberg M.E., Shogomori H., Xu X., Brown D.A., London E.* // *Biochemistry*. 2003. V. 42. P. 12376–12390.
53. *Nicolaou J., Scolani S., Bayraktarov E., Jungnick N., Engel S., Pia Plazzo A., Stöckl M., Volkmer R., Veit M., Herrmann A.* // *Biophys. J.* 2010. V. 99. P. 489–498.
54. *Nermut M.V., Frank H.* // *J. Gen. Virol.* 1971. V. 1. P. 37–51.
55. *Briggs J.A.G., Wilk T., Fuller S.D.* // *J. Gen. Virol.* 2003. V. 84. P. 757–768.
56. *De Planque M.R.R., Killian, J.A.* // *Mol. Membr. Biol.* 2003. V. 20. P. 271–284.

57. Hessa T., Meindl-Beinker N.M., Bernsel A., Kim H., Sato Y., Lerch-Bader M., Nillson I.-M., White S.H., Von Heijne G. // *Nature*. 2007. V. 450. P. 1026–1030.
58. MacCallum J.L., Drew Bennett W.F., Tieleman D.P. // *Biophys. J.* 2008. V. 94. P. 3393–3404.
59. Björkbohm A., Rög T., Kaszuba K., Kurita M., Yamaguchi S., Lönnfors M., Nyholm T.K.M., Vattulainen I., Katsumura S., Slotte J.P. // *Biophys. J.* 2010. V. 99. P. 3300–3308.
60. Aritz B., Garcia-Arribas A.A., Goñi F.M. // *Chem. Phys. Lipids*. 2016. V. 199. P. 26–34.
61. Tsuzuki S. // *Struc. Bond*. 2005. V. 115. P. 149–193.
62. De Jesus A.J., Allen T.W. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. V. 1828. P. 864–876.
63. Cedric Grauffel C., Boqian Yang, Tao He, Roberts M.F., Gershenson A., Reuter N. // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. V. 135. P. 5740–5750.
64. Luz-Madrigal A., Asanov A., Camacho-Zarco A.R., Sampieri A., Vaca L. // *J. Virol.* 2013. V. 87. P. 11894–11907.
65. MacCallum J.L., Tieleman D.P. // *Trends Biochem. Sci.* 2011. V. 36. P. 653–662.
66. Pogozheva I., Tristram-Nagle S., Mosberg H.I., Lomize A.L. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. V. 1828. P. 2592–2608.
67. Serebryakova M.V., Kordyukova L.V., Semashko T.A., Ksenofontov A.L., Rudneva I.A., Kropotkina E.A., Filipova I.Yu., Veit M., Baratova L.A. // *Vir. Res.* 2011. V. 160. P. 294–304.
68. Matsumori N., Yamaguchi T., Maeta Y., Murata M. // *Biophys. J.* 2015. V. 108. P. 2816–2824.
69. Epand R.M. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2008. V. 1778. P. 1576–1582.
70. Epand R.F., Thomas A., Brasseur R., Vishwanathan S.A., Hunter E., Epand R.M. // *Biochemistry*. 2006. V. 45. P. 6105–6114.
71. Li H., Papadopoulos V. // *Endocrinology*. 1998. V. 139. P. 4991–4997.
72. Vincenta N., Genina C., Malvoisin E. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2002. V. 1567. P. 157–164.
73. Shenstone Huang, Green B., Thompson M., Chen R., Thomaston J., De Grado W.F., Howard K.P. // *Prot. Sci.* 2015. V. 24. P. 426–429.
74. Dunina-Barkovskaya A. // *Protein Interactions* / Eds. Cai J., Wang R.E. Croatia: InTech Pub., 2010. P. 275–290.
75. De Vries M., Herrmann A., Veit M. // *Biochem. J.* 2015. V. 465. P. 305–314.
76. Hanson M.A., Cherezov V., Griffith M.T., Roth C.B., Jaakola V.P., Chien E.Y., Velasquez J., Kuhn P., Stevens R.C. // *Structure*. 2008. V. 16. P. 897–905.
77. Tsfasman T., Kost V., Markushin S., Lotte V., Koptiaeva I., Bogacheva E., Baratova L., Radyukhin V. // *Vir. Res.* 2015. V. 210. P. 114–118.
78. Harris A., Cardone G., Winkler D.C., Heymann J.B., Brecher M., White J.M., Steven A.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 19123–19127.
79. Battisti A.J., Geng Menga, Winkler D.C., McGinness L.W., Plevka P., Steven A.C., Trudy G., Morrison T.G., Rossmann M.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. P. 13996–13996.
80. Nayak D.P., Hui E.K.-W., Barman S. // *Virus Res.* 2004. V. 106. P. 147–165.
81. Steck T.L., Lange Y. // *Trends Cell Biol.* 2010. V. 20. P. 680–687.
82. Lange Y., Steck T.L. // *Chem. Phys. Lipids*. 2016. V. 199. P. 74–93.
83. Schroeder C. // *Cholesterol Binding and Cholesterol Transport Proteins, Subcellular Biochemistry* / Ed. Harris J. B.: Springer Science + Business Media B. V., 2010. V. 51. P. 77–108.
84. Calder L.J., Wasilewski S., Berriman J.A., Rosenthal P.B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 10685–10690.
85. Guofeng Cheng, Montero A., Gastaminza P., Whitten-Bauer C., Stefan F., Wieland S.F., Isogawa M., Fredericksen B., Selvarajah S., Gallay P.A., Ghadiri M.R., Chisari F.V. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 3088–3093.
86. Hanson J.M., Gettel D.L., Tabaei S.R., Jackman J., Min Chul Kim, Sasaki D.Y., Groves J.T., Liedberg B., Nam-Joon Cho, Parikh A.N. // *Biophys. J.* 2016. V. 110. P. 176–187.
87. Eiríksdóttir E., Konate K., Langel Ü., Divita G., Deshayes S. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2010. V. 1798. P. 1119–1128.
88. Bechara C., Sagan S. // *FEBS Lett.* 2013. V. 587. P. 1693–1702.

Molecular Mechanisms of Rafts Organization in Biological Membranes

V. A. Radyukhin* and L. A. Baratova*

*Phone: +7 (495) 9395408; fax: +7 (495) 939-31-81; e-mail: varvic@belozersky.msu.ru

*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Leninskie gory 1, Moscow, 119991 Russia

This review analyses and summarizes some actual models of raft organization as dynamic structural units in lipid membranes accenting on discrimination of mechanisms influencing raft nanodomains sustaining in biological and model membranes, and on roles of membrane proteins. Contentious issue of specific input of cholesterol recognizing/interacting amino acid consensus (CRAC) motifs in the membrane rafts and proteins interaction mechanism on molecular level is discussed in detail. Especially, lipid membrane raft-like structure of some enveloped viruses is considered as a manifested example demonstrating basic mechanisms of raft type membranes organization.

Keywords: lipid membranes, rafts, membrane proteins, cholesterol-recognizing amino acid consensus (CRAC) motifs, amphipathic elements of the secondary structure of proteins



ЛИПИДОМ ПЛАЗМЫ КРОВИ: ВОЗМОЖНОСТИ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ПРЕЭКЛАМПСИИ

© 2020 г. Т. И. Торховская*, **, #, Т. С. Захарова*, Е. И. Короткевич*,
Н. К. Касум-заде***, Р. И. Шалина***, С. С. Маркин*

*ФГБНУ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
Россия, 119221, Москва, ул. Погодинская, 10

**Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины,
Россия, 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, 1А

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

Поступила в редакцию 08.07.2019 г.

После доработки 25.11.2019 г.

Принята к публикации 26.11.2019 г.

Липидомный анализ плазмы крови — масс-спектрометрическая (МС) оценка молекулярных видов липидов, иногда в комбинации с высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) — занимает все большее место в исследованиях, направленных на выявление новых информативных биомаркеров заболеваний. В обзоре детально рассмотрены работы по применению этого подхода при преэклампсии (ПЭ) — распространенном (около 5%) аномальном развитии беременности, часто приводящем к смертности матери и плода. Отсутствие своевременно выявляемых биомаркеров, как и четких представлений о патогенезе ПЭ, обуславливает активные исследования в этой области. Рассмотрены результаты липидомных исследований с выявлением у больных с ПЭ отличий уровней отдельных молекулярных видов липидов от нормы. В разных работах обнаруживали повышенные уровни различных липидов при ПЭ — нескольких видов церамидов, ряда видов фосфолипидов (фосфатидилглицерина, окисленный фосфатидилхолин, лизофосфатидилхолин с С14:0). В двух независимых исследованиях показано повышение в плазме при ПЭ фосфатидилсерина и диглицеридов, так же как и сфингозин-фосфата. Сообщается о различии в характере динамики изменения уровней сфингомиелина, особенно с С16:0, сниженного в первом триместре беременности и затем возрастающего только у больных ПЭ. Выработка стандартных условий проведения МС-анализа — пробоподготовки, условий ионизации и режимов детекции ионов — позволит, в сочетании с другими метаболомными подходами, получить дополнительную информацию о патогенезе ПЭ, с возможностью выявления новых информативных биомаркеров.

Ключевые слова: липидомика, молекулярные виды липидов, биомаркеры, липиды плазмы, преэклампсия

DOI: 10.31857/S0132342320030318

Преэклампсия представляет собой комплексное нарушение, возникающее у 4.6% беременных и являющееся одной из причин смертности матери и плода [1, 2]. Основная проблема в ее лечении или/и возможном предупреждении обусловлена относительно поздним сроком первых клинических проявлений. Патфизиология ПЭ остается неясной. Считают, что основная ее причина — неадекватное кровоснабжение формирующейся плаценты из-за отсутствия свойственной нормальной беременности гестационной перестройки спиральных маточных артерий [3]. Однако исход-

ный фактор этого нарушения не выяснен [4, 5], что частично сопряжено и с отсутствием модели этого заболевания у животных. Проявляется ПЭ после 20, чаще 34, недель беременности в виде артериальной гипертензии, протеинурии, отеков, жалоб на головную боль и/или нарушения зрения, боли в эпигастрии и/или правом подреберье, тошноту или рвоту [1, 2]. Однако эти признаки не являются специфичными.

Отсутствие методов ранней диагностики ПЭ стимулирует поисковые исследования — для проведения мониторинга с целью выявления женщин с риском развития этой патологии, что позволило бы вовремя принять соответствующие профилактические превентивные меры [1, 6]. Существенным шагом в таких разработках явилось

Сокращения: ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; ПЭ — преэклампсия; ЖК — жирнокислотные остатки.

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

развитие в последние годы чрезвычайно чувствительных МС методов, дающих возможность одновременного определения в плазме крови многих веществ различной природы, в частности — относительно низкомолекулярных метаболитов (с молекулярной массой менее 3000 Да).

Одной из биологически значимых групп метаболитов являются липиды различных классов, что инициировало развитие отдельного направления таких метаболомных исследований — липидомики. В последнее десятилетие этот подход был применен для целого ряда заболеваний (“клиническая липидомика”), сопряженных так или иначе с липидным обменом. Это коснулось и ПЭ, так как одним из важных предрасполагающих к ней фактором является тучность [7–9], свидетельствующая о вовлеченности липидов в ее патогенез. Существенное увеличение информативности такого анализа по сравнению с традиционными липидными показателями обусловлено высоким разнообразием отдельных молекулярных видов липидов. Это связано со строением липидных молекул, включающих до 4-х жирнокислотных (ЖК) остатков различной длины цепи и степени насыщенности в различных сочетаниях и комбинациях. Такие различия определяют их индивидуальные биологические свойства, например, подверженность ферментативным реакциям, которые не отражаются при оценке только общих классов липидов плазмы. Недостаточность информации о механизмах, патогенетическом значении и возможной диагностической ценности изменений липидов плазмы при ПЭ, наряду с развитием современного МС подхода к их анализу [10–13], обусловили серию липидомных исследований плазмы при ПЭ. В этой связи полагают, что ожидаемая от применения липидомики информация об отдельных молекулярных видах липидов может выявить информативные биомаркеры ПЭ на ранних этапах развития [5, 6]. При этом, в связи с водонерастворимостью липидов, методической особенностью липидомного (в отличие от общего метаболомного) анализа является использование не цельной плазмы, а ее экстракта органическими растворителями с последующим МС анализом [10–13]. Темой настоящего обзора явилось рассмотрение опубликованных в последние годы работ по липидомным исследованиям плазмы крови при риске развития ПЭ.

ЛИПИДОМНЫЙ АНАЛИЗ ПЛАЗМЫ ПРИ ПРЕЭКЛАМПСИИ

Впервые липидомный анализ был проведен у 199 беременных женщин в 2010 году как часть общего метаболомного исследования, Screening for Pregnancy Endpoints (SCOPE) Study, в двух центрах Новой Зеландии [14]. В целом обследовали более 1500 женщин на небольших сроках бере-

менности (14–16 недель), из которых у 4.2% развилась впоследствии ПЭ. С помощью МС в сочетании с ВЭЖХ и последующего мультивариантного сравнительного анализа в плазме последних было идентифицировано 14 метаболитов, в том числе 7 липидных, отличающихся по уровню от такового при нормальной беременности. В качестве критерия их частоты использовали соотношение частоты случаев в сравниваемых группах, называемое “отношением шансов” (OR, odd ratio). Данные по двум центрам приведены в табл. 1. Некоторые различия между ними авторы связывают с разным числом обследованных.

Достоверным оказалось повышение при ПЭ уровня трех из приведенных в табл. 1 липидов — двух видов диглицеридов (содержащих или два остатка линолевой кислоты, С18:2, или олеиновую и арахидоновую ЖК, С16:1 и С20:4) и сфингозин-1-фосфата. Ввиду высокой биологической активности последнего [15] его повышение при ПЭ может быть вовлечено в цепь реакций патогенеза этого заболевания. Авторы [14] отмечают перспективность метаболомных исследований (включая и липидом) для исследования нарушений при ПЭ.

В работе [16] у 20 женщин с ПЭ и 20 в контроле было проведено исследование 49 различных метаболитов, включая 21 вид липидов. Исследование выполнялось с использованием ВЭЖХ-МС анализа с детекцией в режимах положительных и отрицательных ионов. Показано некоторое повышение при ПЭ уровня пальмитиновой и олеиновой кислот, а также ряда лизофосфолипидов, из которых после статистической обработки достоверным осталось только возрастание липида, обозначенного как “РС(14:0/00)”. Судя по молекулярной массе (453.3), это лизофосфатидилхоллин, содержащий миристиновую кислоту. Возрастание данного липида, сопряженное с увеличением количества пролина и его конъюгата с бетаином, авторы трактуют как возможный показатель дисрегуляции при ПЭ [16].

Первое исследование, направленное специально на липидомный анализ при ПЭ, было проведено в Бразилии в 2012 г. De Oliveira с соавт [17]. Анализировали липидом плазмы крови у 8 женщин с ранней ПЭ (до 34 недель беременности) в сравнении с 8 женщинами с нормально протекающей беременностью. Традиционный анализ липидных и липопротеиновых показателей плазмы не выявил различий между группами обследованных. МС анализ липидного экстракта (MALDI-MS), проведенный в режиме положительных ионов, показал пики 1290 ионов, идентификацию которых — по величинам отношений массы к заряду (m/z) — осуществляли, как и в ряде других липидомных исследований [10, 11], по базе данных Lipid Database Search (<http://www.lipidmaps.org>). Для идентификации и анализа вариабельности

Таблица 1. Молекулярные виды липидов с различной степенью повышения уровня в плазме у женщин с развившейся впоследствии преэклампсией (из работы [14])

Липид*	1-ый центр (Auckland) (n = 120)		2-ой центр (Adelaide) (n = 79)	
	p	OR**	p	OR*
Деканоил-карнитин (C10:0)	0.007	3.1	0.624	1.6
Олеиновая кислота (C18:1)	0.007	3.1	0.276	2.0
Докозагексаеновая кислота (C22:6)	0.01	5.6	0.204	2.8
Диглицерид с C16:1 и C20:4 (пальмитолеиновой и арахидоновой кислотами соответственно)	0.01	3.0	0.035	2.8
Диглицерид с двумя остатками линолевой кислоты (C18:2)	0.05	2.2	0.007	5.6
Сфингозин 1-фосфат	0.01	3.3	0.037	4.2
Сфинганин 1-фосфат	0.03	2.6	0.939	1.8

* В скобках после названия липида указано количество атомов углерода (C) в цепи и, после двоеточия – число в ней двойных связей.

** OR (отношение шансов) – статистический термин, оценивающий отношение количества случаев изменения к количеству случаев его отсутствия; p достоверность различий.

Таблица 2. Основные молекулярные виды липидов, для которых наблюдался повышенный уровень в плазме при преэклампсии, по данным липидомного масс-спектрометрического анализа* (по [17] с изменениями)

m/z**	Формула	Идентифицированный липид	Класс липидов
722.49	C ₄₀ H ₆₉ NO ₈ P	Диацилглицерофосфосерин	Фосфатидилсерин
745.53	C ₄₁ H ₇₈ O ₉ P	1-Алкенил,2-ацил-глицеро-фосфо-глицерин	Фосфатидилглицерин
746.50	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₀	Гликозилдиацилглицерин	Гликозилдиглицерид
757.60	C ₄₃ H ₈₄ NO ₇ P	1-Алкил,2-ацил-глицерофосфо-холин	Фосфатидилхолин
770.59	C ₄₄ H ₈₃ O ₈ P	Диацилглицерофосфат	Диглицерид фосфат***
772.62	C ₄₄ H ₈₅ O ₈ P	Диацилглицерофосфат	Диглицерид фосфат***
776.62	C ₄₃ H ₈₅ O ₉ P	1-Алкил,2-ацил-глицеро-фосфо-глицерин	Фосфатидилглицерин
796.61	C ₄₇ H ₇₂ O ₁₀	Гликозилдиацилглицерин	Гликозилдиглицерид
798.61	C ₄₆ H ₈₇ O ₈ P	Диацилглицерофосфат	Диглицерид фосфат***
802.60	C ₄₅ H ₈₇ O ₉ P	1-Алкенил,2-ацил-глицеро-фосфо-глицерин	Фосфатидилглицерин
810.59	C ₄₅ H ₇₉ O ₁₀ P	Диацилглицерофосфоглицерин	Фосфатидилглицерин
812.59	C ₄₆ H ₈₅ O ₉ P	1-Алкил,2-ацил-глицеро-фосфо-глицерин	Фосфатидилглицерин

* Анализировали плазму 8 женщин с ПЭ и 8 женщин с нормально протекающей беременностью.

** Отношение массы молекулы к заряду.

*** По традиционной классификации фосфатидная кислота.

пиков с величинами m/z в пределах до 820 использовали U -тест Манна–Уитни (Mann–Whitney U test).

В табл. 2 приведены 12 найденных авторами [17] основных видов липидов с более высоким уровнем в плазме у женщин с ПЭ по сравнению с контролем.

Среди них отмечают 5 молекулярных видов фосфатидилглицеринов, с небольшими различиями по молекулярному весу и, соответственно, отношению m/z – 745, 776, 802, 810 и 812, обуслов-

ленными разными входящими в состав молекулы цепями ЖК. Другими повышенными при ПЭ липидами оказались фосфаты диглицеридов (называемые чаще фосфатидной кислотой). При этом, первые два их пика (с m/z 770 и 772) отличались друг от друга только числом атомов водорода – C₄₄H₈₃O₈P и C₄₄H₈₅O₈P (что говорит о присутствии одной двойной связи в первом из них). В третьем пике диглицерид фосфата (C₄₆H₈₇O₈P) на два атома углерода больше, т.е. одна из его углеродных цепей содержит две дополнительные ме-

тиленовые группы (CH_2). Авторы отмечают при ПЭ выраженное повышение двух пиков гликозилдиглицеридов (с m/z 746 и 796), а также фосфатидилсерина с m/z 722 (без указания входящих в них ЖК). Однако по сравнению с другими липидными исследованиями [14, 18] в данной работе отсутствует информация о расшифровке различий в наборе ЖК, определяющих указанные различия величин m/z . Кроме того, не представлена обработка пиков более крупных липидных молекул, с величинами m/z более 820, показавших отличия на представленных в работе [17] масс-спектрах плазмы больных с ПЭ и здоровых лиц.

Авторы предполагают, что выявленные ими различия обусловлены нарушениями липидного метаболизма, отмечая, однако, что пока трудно утверждать их связь с механизмом развития ПЭ [17]. Например, некоторые из этих липидов могут служить эндогенными лигандами, определяющими клеточные ответы через различные сигнальные пути. На основании полученных данных авторы считают, что липидомный анализ (названный ими, из-за малого количества требуемой крови, “отпечатком пальцев”) может идентифицировать возможные биомаркеры ПЭ. В связи с этим они упоминают ди(гептадеканойл)-эйкозаноил-глицерин, обнаруженный ранее L. Kenny с соавт. [14] (хотя и не отмеченный ими) – уровень которого был снижен при ПЭ в одном из центров-участников исследования. Однако это утверждение [17], как и сама идентификация этого липида [14], вызывают сомнения – из-за присутствия в одной молекуле двух цепей несвойственной липидам организма ЖК с нечетным числом атомов углерода, C_{17} [18, 19]. В целом, анализируя результаты данного исследования [17], как первого специального липидомного анализа при ПЭ, можно сказать, что его реальная значимость может быть выше, чем это указано авторами. По-видимому, из-за методических трудностей на тот момент, вне поля зрения авторов оказались различия в уровнях неидентифицированных пиков липидов, которые могут быть проанализированы в дальнейшем.

В последующей работе той же группы авторов [20] было проведено МС исследование липидов плазмы и плаценты у 10 женщин с ПЭ (по сравнению с нормальной беременностью), в широком интервале значений m/z – от 600 до 1200 (табл. 3). Наиболее выраженным при ПЭ оказалось возрастание в плазме уровня фосфатидилсерина (по более современной, но еще не вошедшей в практику номенклатуре и терминологии [21], глицерофосфосерина), более чем в 3 раза по сравнению с контролем (52.3 против 15.5%). Однако данные приводятся без указания ацильных групп, содержащихся в фосфатидилсерине. Увеличение уровня данного липида при ПЭ также было обна-

ружено и в ткани плаценты, что авторы связывают с рядом метаболических нарушений – апоптозом, коагуляцией, окислительным стрессом [20]. Показано также возрастание процента глицерофосфохолина (фосфатидилхолина) от 0.41 до 9.47%. В тоже время данные по соотношению уровней этих фосфолипидов (даже в контроле) вызывают сомнения – из-за резкого несоответствия с данными обширной литературы по составу фосфолипидов плазмы крови, где, как известно, преобладающим (>70%) является фосфатидилхолин. Фосфатидилсерин же относится к минорным компонентам и его уровень более чем в 20 раз ниже (около 1%) [19, 22]. Можно предположить, что это различие в работе [20] обусловлено выбранной авторами точкой отсчета – результаты даны в процентах, но не указано, от чего. По всей вероятности, за 100% были приняты только анализируемые и идентифицируемые авторами компоненты, а остальные – основные содержащиеся в плазме, преобладающие холин-содержащие фосфолипиды (фосфатидилхолин и сфингомиелин) остались “за кадром”. Тем не менее, показанное авторами 3х-кратное возрастание в плазме уровня фосфатидилсерина при ПЭ [20] (табл. 3) является достоверным, указывая на возможное участие этого фосфолипида в свойственных ПЭ нарушениях, с вероятностью возможного внимания к нему как к потенциальному биомаркеру. Необходимость более углубленных исследований подчеркивается и самими авторами [20].

В последующей работе по липидному исследованию плазмы при ПЭ [6] о фосфатидилсерине не упоминается – что может быть связано с другими условиями МС анализа. В качестве внутренних стандартов в работе использовали ЖК, холестерин и его эфиры, фосфатидилхолин и триглицерид. Авторы проводили два последовательных исследования в общей сложности у 136 женщин на 12–14 неделях беременности, из которых почти у половины впоследствии развилась ПЭ. Были выбраны 23 молекулярных вида липидов с разной степенью достоверности различий (при $0.1 > P > 0.001$) по уровню в двух группах. Из всех приведенных авторами нами были выбраны и представлены в табл. 4 те виды липидов, для которых критерий достоверности (P) был менее или равен 0.05.

Как видно из табл. 4, при ПЭ для трех видов липидов, включая окисленные производные глицерофосфохолина (фосфатидилхолина) и холестерина, наблюдалось повышение уровня в плазме, а для семи, в основном некоторых видов триглицеридов – его снижение [6]. Авторы предполагают, что повышение уровня фосфатидилхолинов в плазме при ПЭ может служить указанием на начало лизиса и разрушения клеток плаценты, с высвобождением этих фосфолипидов как основных мембранных компонентов. Более высокий уровень окисленных фосфатидилхо-

Таблица 3. Основные классы липидов плазмы, различающиеся, согласно работе [20]*, по уровню в плазме крови больных с преэклампсией и при нормальной беременности

Класс липидов	Процентное содержание (%)		<i>p</i>
	контроль (<i>n</i> = 10)	преэклампсия (<i>n</i> = 10)	
Фосфатидилхолин	0.41	9.47	<0.0001
Фосфатидилэтаноламин	77.38	24.03	<0.0001
Фосфатидилсерин	15.53	52.30	<0.0001
Фосфатидилглицерин	3.14	0.90	<0.003
Фосфатидилинозит	0.62	0.13	Не достоверно
Триглицериды	0.22	0.16	Не достоверно
Сфингомиелин	0.00	0.37	<0.0001
Нейтральные гликофинголипиды	0.00	1.72	<0.0001
Стерины	0.31	0.03	<0.0001
Конъюгаты стеринов	0.00	0.65	<0.0002
Эфиры жирных кислот	0.55	0.24	Не достоверно

* Указано, что "результаты выражены в процентах".

Таблица 4. Индивидуальные виды липидов плазмы крови при преэклампсии, статистически достоверно* отличающиеся по уровню от таковых в контроле (по [6] с изменениями)

<i>m/z</i>	Аддукты при МС анализе	<i>P</i>	Класс липидов	Предполагаемый молекулярный вид	Основные фрагменты
Повышение при преэклампсии:					
383.3		0.05	Окисленный холестерин	–	–
784.6	+H ⁺	0.05	Глицерофосфохолин	ФХ 36:3	18:1 и 18:2
798.6	+H ⁺	0.03	Окисленный глицерофосфо-холин	ФХ 36:4:+ОН	16:0 и 20:4 + ОН
Снижение при преэклампсии:					
445.4	+H ⁺	0.05	Производное холестерина	–	–
714.6	+NH ₄ ⁺	0.009	Эфир холестерина	С22:6 эфир холестерина	–
916.8	+NH ₄ ⁺	0.01	Окисленные триглицериды	–	ООО-эпоксиды
920.7	+NH ₄ ⁺	0.009	Триглицериды	ТГ 56:8	16:0, 18:2 и 22:6
954.8	+NH ₄ ⁺	0.01	Триглицериды	–	–
956.8	+NH ₄ ⁺	0.004	Триглицериды	–	–
958.8	+NH ₄ ⁺	0.005	Триглицериды	–	–

* $P \leq 0.05$; сокращения: ФХ – фосфатидилхолины, ТГ – триглицериды; в обозначении вида первая цифра – общее число атомов С в молекуле, после двоеточия – число двойных связей.

лина и холестерина связывают с ишемией сосудов плаценты, усиливающейся из-за активации свободно-радикальных окислительных процессов [23]. Несколько видов липидов присутствовали в плазме при ПЭ в меньших количествах, чем в контроле (табл. 4), что может быть сопряжено с большей активностью ряда липолитических ферментов [24].

АНАЛИЗ СФИНГОЛИПИДОМА ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ ПРЕЭКЛАМПСИИ

Множественные биологические функции сфинголипидов [25] дают основание полагать возможное участие некоторых из них в нарушениях, свойственных ПЭ. Charkiewicz с соавт. [26] определяли с использованием ВЭЖХ-МС концентрации 11 видов сфинголипидов, включая цера-

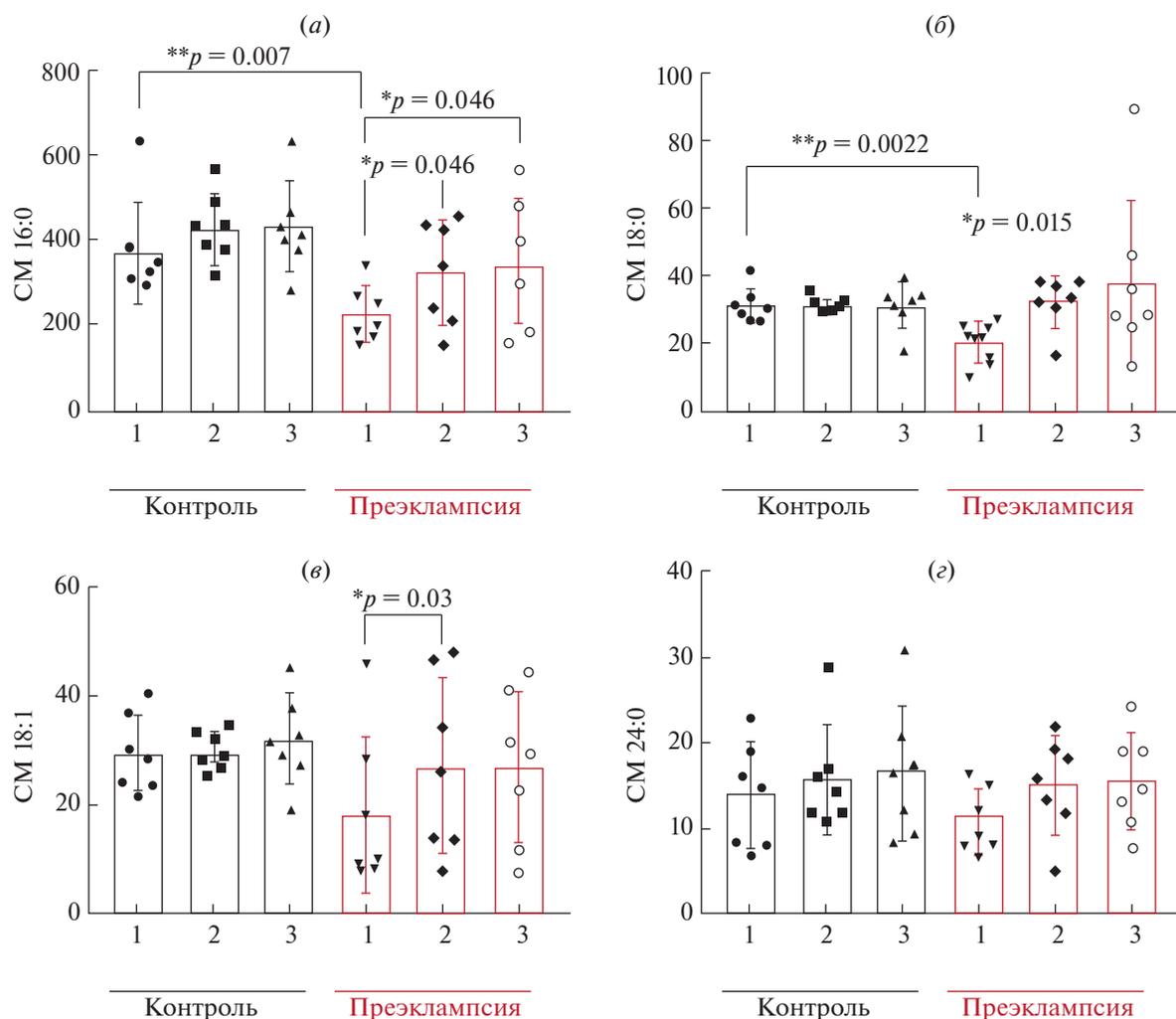


Рис. 1. Концентрация молекулярных видов сфингомиелинов (СМ) в плазме женщин с преэклампсией и в контроле на трех гестационных сроках (I, II и III триместры – соответственно, 11–14, 22–24 и 32–36 недели), в нмоль/мл (*a–г* – виды сфингомиелинов: *a* – СМ 16:0, *б* – СМ 18:0, *в* – СМ 18:1, *г* – СМ 24:0) (по [44] с изменениями).

миды, в плазме и клетках крови у 57 женщин на 25–40 неделях беременности. В образцах плазмы при ПЭ показано возрастание 6 молекулярных видов церамидов, с ЖК от С16 до С24, включая две мононенасыщенные (18:1 и 24:1), а также сфингомиелина и сфингозин-фосфата. На основании отсутствия изменений этих липидов в клетках крови при ПЭ авторы делают вывод, что сфинголипиды секретируются в плазму из плаценты, как следствие ее аномального развития [26].

В другой работе [27] оценивали динамику уровней сфинголипидов в процессе развития беременности в трех ее последовательных периодах (триместрах) у 7 женщин в каждой группе (ПЭ и контроль). При ПЭ во 2-ом триместре (по сравнению с 1-ым), существенно снижался дигидросфингозин-фосфат что, по мнению авторов, может вносить вклад в снижение эндотелиального барьера. Уровень минорного церамида с С14:0 в 1-ом три-

местре был ниже, чем в контроле. Основные церамиды (с кислотами 16:0 и 24:0) проявляли тенденцию к повышению в процессе гестации у всех беременных. Наибольшие различия между ПЭ и контролем были обнаружены в уровнях сфингомиелинов с разными ЖК и в характере их динамики (рис. 1), особенно на ранних сроках беременности. В плазме женщин с ПЭ в 1-ом триместре обнаружено сниженное (почти вдвое) содержание всех сфингомиелинов (СМ), особенно с пальмитиновой и олеиновой ЖК (СМ 16:0 и СМ 18:1), по сравнению с уровнем при нормальной беременности (рис. 1*a* и 1*в*). Для СМ 18:1 (рис. 1*в*) эти различия к 2-ому триместру сглаживались – то есть, его уровень, сниженный при ПЭ, постепенно возрастал, приближаясь к значению в контроле (неизменному при гестации). Уровень СМ с 16:0 тоже несколько увеличивался, однако не достигая контрольных значений (рис. 1*a*).

Авторы, как и в других работах [6, 14, 17, 20, 26], пытаются связать выявленные изменения с возможными метаболическими нарушениями и предлагают использовать обнаруженные в 1-ом триместре различия в уровнях сфинголипидов — особенно последующее возрастание сфингомиелина ко 2-ому триместру — в качестве возможных предиктивных критериев риска развития ПЭ [27].

Таким образом, подводя итог рассмотрению относительно небольшого числа работ по липидному анализу плазмы при ПЭ — меньшего, чем для ряда других заболеваний [10, 12, 18] — приходится отметить, что на настоящий момент еще не выработано четких информативных липидных маркеров этого состояния, так как данные различных работ отличаются друг от друга. Помимо методических различий в разных лабораториях — условий масс-спектрометрии, иногда в сочетании с ВЭЖХ, разных режимов ионизации и детектирования образующихся ионов, использования внутренних стандартов — результаты, согласно данным [27], могут зависеть и от срока гестации. Тем не менее, выявляемая большинством авторов высокая достоверность различий липидома при ПЭ по сравнению с плазмой при нормальной беременности, на довольно большом числе случаев (например, более чем у 60 больных ПЭ в работе [6], или у 120 в [14]) не позволяет сомневаться в существовании его специфических особенностей, однако обнаруживаемые при этом различающиеся показатели рассматривают пока только как “кандидаты в биомаркеры”.

ЛИПИДНЫЕ “КАНДИДАТЫ В БИОМАРКЕРЫ” ПРЕЭКЛАМПСИИ

Из рассмотренных выше данных наиболее вероятными “кандидатами” можно считать на сегодняшний день те, повышение уровня которых выявлялось в более, чем одной работе. Это:

- 1) сфингозин-фосфат [14, 26];
- 2) диглицериды или диглицерид-фосфаты, с двумя цепями линолевой кислоты и сочетанием пальмитолеиновой и арахидоновой [14] или с общими формулами $C_{44}H_{83}O_8P$ и $C_{44}H_{85}O_8P$ [17], куда, в свою очередь, могут входить несколько молекулярных видов; и,
- 3) фосфатидилсерины — суммарные [20] или отдельные их виды с общей формулой $C_{40}H_{69}NO_8P$ [17].

Возможно, что детекция некоторых из них, обнаруженных L. Kenny с соавт. [14] — сфингозин-фосфата и двух видов диглицеридов — входит, в комбинации с другими метаболическими показателями, в разработанный на основании работ этой лаборатории диагностический набор PrePsia™ V1.0 (<http://www.fp7-improved.eu/tags/prepsia>), об использовании которого и определяемых при этом

показателях пока еще не сообщается. Интересным, на наш взгляд, представляется выявление в плазме при ПЭ дефицита сфингомиелина, особенно с пальмитиновой кислотой, в первом триместре беременности с последующим его возрастанием [27].

Перспективность использования липидома плазмы как части метаболомных исследований с целью обнаружения биомаркеров ПЭ отмечается многими исследователями [5, 6, 14, 16, 17, 20]. В то же время для реализации возможности использования такого чувствительного и информативного метода как липидомный анализ необходимым условием считают — как и для других липидомных исследований — его строгую стандартизацию [10, 13, 18], с последующим проведением исследований на большем количестве пациентов [5, 6].

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ghulmiyyah L., Sibai B.* // *Semin. Perinatol.* 2012. V. 36(1). P. 56–59.
2. *Шалина П.И., Михалева Л.М., Симухина М.А., Коноплянников А.Г., Штабницкий А.М. Симухина, М.А.* // *Вопр. гинекологии, акушерства и перинатологии.* 2017. Т. 16(6), С. 16–23.
3. *Burton G.J., Charnock-Jones D.S., Jauniaux E.* // *Reproduction.* 2009. V. 138(6). P. 895–902.
4. *De Kat A.C., Hirst J., Woodward M., Kennedy S., Peters S.A.* // *Pregnancy Hypertens.* 2019. V. 16. P. 48–66.
5. *Wojcik-Baszko D., Charkiewicz K., Laudanski P.* // *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2018. V. 139. P. 19–23.
6. *Anand S., Young S., Esplin M., Peaden B., Tolley H.D., Porter T.F., Varner M.W., D’Alton M.E., Jackson B.J., Graves S.W.* // *J. Lipid Res.* 2016. V. 57. P. 687–696.
7. *Paré E., Parry S., McElrath T.F., Pucci D., Newton A., Lim K.H.* // *Obstet. Gynecol.* 2014. V. 124(4). P. 763–770.
8. *Bodnar L.M., Ness R.B., Markovic N., Roberts J.M.* // *Ann. Epidemiol.* 2005. V. 15(7). P. 475–482.

9. *Frederick O., Rudra C.B., Miller R.S., Foster J.C., Williams M.A.* // *Epidemiology*. 2006. V. 17(4). P. 428–434.
10. *Торховская Т.И., Захарова Т.С., Короткевич Е.И., Ипатова О.М., Маркин С.С.* // *Биоорг. химия*. 2019. Т. 45(5). С. 1–14. [*Torkhovskaya T.I., Zakharova T.S., Korotkevich E.I., Ipatova O.M., Markin S.S.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45(5). P. 335–346.]
11. *Quehenberger O., Dennis E.A.* // *N. Engl. J. Med.* 2011. V. 365(19). P. 1812–1823.
12. *Лохов П.Г., Маслов Д.Л., Балашова Е.Е., Трифонова О.П., Медведева Н.В., Торховская Т.И., Ипатова О.М., Арчаков А.И., Мальшев П.П., Кухарчук В.В., Шестакова Е.А., Шестакова М.В., Дедов, И.И.* // *Биомед. химия*. 2015. Т. 61(1). С. 7–18.
13. *Wang J., Wang C., Han X.* // *Anal. Chim. Acta.* 2019. V. 1061. P. 28–41.
14. *Kenny L.C., Broadhurst D.I., Dunn W., Brown M., North R.A., McCowan L., Roberts C., Cooper G.J., Kell D.B., Baker P.N.* // *Hypertension*. 2010. V. 56. P. 741–749.
15. *Li N, Zhang F.* // *Front. Biosci. (Landmark Ed)*. 2016. V. 21. P. 1296–1313.
16. *Chen T., He P., Tan Y., Xu D.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017. V. 485(1). P. 119–125.
17. *De Oliveira L., Camara N.O., Bonetti T., Lo Turco E.G., Bertolla R.P., Moron A.F., Sass N., Da Silva I.D.* // *Clin. Biochem.* 2012. V. 45. P. 852–855.
18. *Hyötyläinen T., Orešič M.* // *Anal. Bioanal. Chem.* 2015. V. 407(17). P. 4973–4993.
19. *Nelson G.J.* (Ed.) // *Blood Lipids and Lipoproteins: Quantitation, Composition, and Metabolism*. Wiley-Interscience, New York, 1972. p. 980.
20. *Korkes H.A., Sass N., Moron A.F., Câmara N.O., Bonetti T., Cerdeira A.S., Da Silva I.D., De Oliveira L.* // *PLoS One*. 2014. V. 9(10). e110747.
21. *Fahy E., Subramaniam S., Murphy R.C., Nishijima M., Raetz C.R., Shimizu T., Spener F., van Meer G., Wakelam M.J., Dennis E.A.* // *J. Lipid Res.* 2009. V. 50 (Suppl). P. S9–S14.
22. *Маркин С.М. Ольбинская Л.И., Торховская Т.И.* // *Фосфолипидная терапия атеросклероза*. М.: Белый ветер, 2016. 194 с.
23. *Алесенко А.В., Лебедев А.Т., Курочкин И.Н.* // *Биомед. химия*. 2018. Т. 64(6). С. 487–495.
24. *Jarvie E., Hauguel-de-Mouzon S., Nelson S.M., Sattar N., Catalano P.M., Freeman D.J.* // *Clin. Sci. (Lond.)*. 2010. V. 119(3). P. 123–129.
25. *Clausen T., Djurovic S., Henriksen T.* // *BJOG*. 2001. V. 108(10). P. 1081–1087.
26. *Charkiewicz K., Goscik J., Blachnio-Zabielska A., Raba G., Sakowicz A., Kalinka J., Chabowski A, Laudanski P.* // *PLoS One*. 2017. V. 12(5). e0177601.
27. *Dobierzewska A., Soman S., Illanes S.E., Morris A.J.* // *PLoS One*. 2017. V. 12(4). e0175118.

Blood Plasma Lipidome: Opportunities in the Early Diagnostics of Preeclampsia

**T. I. Torkhovskaya*^{*, **}, T. S. Zakharova*, E. I. Korotkevich*,
N. K. Kasum-zade***, R. I. Shalina***, and S. S. Markin***

Phone: +7 (499) 248-40-08; e-mail: torti@mail.ru

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

**Scientific Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, ul. Malaya Pirogovskaya 1A, Moscow, 119435 Russia

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

Blood plasma lipidome analysis – mass spectrometry assessment of molecular molecular species of lipids, some times with combination with high effective liquid chromatography – occupies an increasing place in research aimed at identifying new informative biomarkers of diseases. The review highlights studies of the application of this approach to preeclampsia (PE) – the distributed (nearly 5%) abnormal pregnancy development that results often in maternal and fetal mortality. The absence of timely detecting biomarkers and of clear understanding about its pathogenesis determines the active research in this area. Increased levels of a number of various lipids in PE plasma were found in various studies – several ceramides species, a number of individual phospholipids (phosphatidylglycerols, oxidized phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine with C14:0). There are two lipid classes, for which data of two independent studies have shown the increase in plasma in PE – these are some phosphatidylserine and diglyceride species as well as sphingosin-1-phosphate. Differences in the dynamics of change of sphingomyeline level are reported, particularly with C16:0, that appeared to be decreased in first pregnancy trimester with subsequent growth only in PE patients. Development of standard conditions for MS analysis – sample preparation, conditions of ionization and ions detection modes – is thought to allow, in combination with other metabolomics approaches, to get additional information on the pathogenesis of PE and to identify new informative biomarkers.

Keywords: lipidomics, molecular lipid species, biomarkers, plasma lipid classes, preeclampsia



УДК 577.112.824:615.917

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ ЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ АЛЬБУМИНА

© 2020 г. Д. А. Белинская*, #, Н. В. Гончаров*, **

*ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Россия, 194223, Санкт-Петербург, проспект Гореза, 44

**ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России,
Россия, 188663, Ленинградская обл., г.п. Кузьмолковский, ст. Капитолово, корп. 93

Поступила в редакцию 23.09.2019 г.

После доработки 05.12.2019 г.

Принята к публикации 12.12.2019 г.

Молекула альбумина, в отличие от многих других плазменных белков, практически не гликозилирована, и может связывать и транспортировать различные лиганды эндогенного и экзогенного происхождения. Накапливаются данные о ферментативной активности альбумина: псевдоэстеразной (необратимое связывание субстрата с белком) и истинно эстеразной (связывание субстрата с активным центром белка с последующим распадом комплекса на фермент и продукт). В токсикологии наибольший интерес представляет проблема (псевдо)эстеразной активности альбумина по отношению к фосфорорганическим соединениям (ФОС) – эфирам фосфорной или фосфоновой кислот. В представленном обзоре собраны литературные данные и результаты наших собственных исследований, посвященных эстеразной активности белка. Рассмотрена возможность направленного воздействия на альбумин с помощью молекул, способных влиять на его связывающую и эстеразную активность. Обсуждаются перспективы практического применения некоторых методов воздействия на альбумин в токсикологии.

Ключевые слова: альбумин, эстеразы, фосфорорганические соединения, аллостерическая модуляция, адьювантная терапия

DOI: 10.31857/S0132342320030045

ВВЕДЕНИЕ

Альбумин – это главный белок крови млекопитающих, где его концентрация составляет 500–700 мкМ. Первые публикации, посвященные исследованию сывороточного альбумина, датируются концом XIX века [1]. К середине XX века ежегодно публиковали десятки работ, в 1960-х – сотни, а в 1970-х их счет перевалил за тысячу. Лигандами альбумина являются различные молекулы и ионы: вода, катионы металлов, жирорастворимые гормоны, свободные жирные кислоты,

трансферрин, неконъюгированный билирубин, окись азота, аспирин и другие лекарственные средства, токсины [2]. Выявлены два первичных сайта взаимодействия альбумина с лигандами (Садлоу I и Садлоу II) [3], а также несколько вторичных сайтов. Накапливаются данные о ферментативной активности альбумина: псевдоэстеразной (необратимое связывание субстрата с белком) и истинно эстеразной (связывание субстрата с активным центром белка с последующим распадом комплекса на фермент и продукт) [4]. Установлена гидролитическая активность альбумина и по отношению к некоторым фосфорорганическим соединениям (ФОС) [5–8]. Способность альбумина взаимодействовать с отравляющими веществами, учитывая его количества в крови и в организме в целом, дают основания полагать, что связывающие и каталитические свойства белка по отношению к ФОС следует учитывать в клинической токсикологии при разработке адьювантной терапии отравлений и предупреждении их последствий.

В представленном обзоре собраны литературные данные и результаты наших собственных ис-

Сокращения: ФОС – фосфорорганические соединения; ЧСА – человеческий сывороточный альбумин; БСА – бычий сывороточный альбумин; КСА – крысиный сывороточный альбумин; КФ – код фермента; НФА – *n*-нитрофенилацетат; ЯМР – ядерный магнитный резонанс; ОФ – оценочная функция; ЭЗЧ – экстракт зеленого чая; ЭГКГ – галлат эпигаллокатехина, ЖК – жирные кислоты; РСА – рентгеноструктурный анализ; ПЭГ – полиэтиленгликоль; ММ-РBSA – метод расчета свободной энергии, сочетающий использование молекулярной механики и решение уравнения Пуассона–Больцмана (molecular mechanics/Poisson–Boltzmann surface area).

Автор для связи: (тел.: +7 (921) 580-69-19; +7 (812) 552-32-56; эл. почта: d_belinskaya@mail.ru).

следований, посвященных изучению эстеразной активности альбумина. Особое внимание уделено межвидовым различиям, а именно сравнительному анализу свойств сывороточных альбуминов человека (ЧСА), быка (БСА) и крысы (КСА). Для биохимических экспериментов часто используют недорогой бычий альбумин, тогда как доклинические токсикологические тестирования проводят, как правило, на грызунах [9], так что для решения задач трансляционной медицины и правильной экстраполяции полученных данных на человеческий организм необходимо знать обо всех структурных и функциональных особенностях альбуминов разных видов. Отдельно рассмотрена возможность направленного воздействия на альбумин с помощью молекул, способных влиять на связывающую и каталитическую активность белка по отношению к ФОС. Обсуждаются перспективы практического применения в токсикологии некоторых методов воздействия на альбумин.

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АЛЬБУМИНА

Молекула сывороточного альбумина образована одной полипептидной цепью, состоящей из 585, 584 и 583 аминокислотных остатков для альбумина человека, крысы и быка, соответственно [10]. Выравнивание первичных последовательностей аминокислотных остатков молекул ЧСА, КСА и БСА показало, что наибольшей идентичностью обладают молекулы ЧСА и БСА – 75.6%. Процент идентичности первичной структуры у молекул ЧСА и КСА составляет 73.0%, а у БСА и КСА – 69.9%. Структура альбумина консервативна для всех млекопитающих: молекула состоит из трех гомологичных доменов, каждый из которых состоит из десяти спиралей и может быть разделен на два субдомена, А и В, содержащих шесть и четыре спиралей, соответственно; эти два субдомена соединены длинной петлей. Трехмерная структура ЧСА была исследована с высоким разрешением довольно поздно, лишь в 1990х [11]. Аналогичная структура БСА получена в 2012 г. [12], а трехмерная структура КСА не получена до сих пор. При отсутствии данных рентгеноструктурного анализа (РСА), трехмерная структура белка может быть сконструирована с помощью гомологичного моделирования – построения 3d-модели белка по его первичной последовательности и известным трехмерным структурам гомологичных белков [13]. Впервые этим методом нами была построена трехмерная модель КСА [14].

На рис. 1 приведены трехмерные структуры сайтов Садлоу I и II ЧСА, БСА и КСА. Видно, что сайт Садлоу II высоко консервативен, лишь в последовательности КСА присутствует одна гомологичная замена лейцина на изолейцин в позиции 407. Однако для сайта Садлоу I консерва-

тивность не характерна. Так, Lys195 и Lys199, входящие в структуру ЧСА, в молекуле БСА заменены на более разветвленные аргинины Arg194 и Arg198. В КСА Lys195 также заменен на аргинин. Гистидины His242(241) и His288(287) в первичной последовательности ЧСА и БСА заменены на Asn242 и Gln288 в структуре КСА. Следует ожидать, что межвидовые различия связывающих и каталитических свойств альбумина будут проявляться в характеристиках Садлоу I.

СВЯЗЫВАЮЩАЯ И ЭСТЕРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ АЛЬБУМИНА ПО ОТНОШЕНИЮ К ФОС

С альбумином способны связываться практически все известные лекарственные препараты и токсические вещества [15, 16]. Альбумин в значительной степени определяет их фармако- и токсикокинетику, транспортируя к тканям-мишеням или местам их биотрансформации. При разработке новых лекарств проверка их связывания с альбумином является стандартной процедурой [17–19]. Однако альбумин является не только пассивным, но и активным участником фармако- или токсикокинетических процессов. Можно выделить две группы ферментативных активностей альбумина, с которыми связано наибольшее количество исследований на протяжении десятков лет [4]. Первая группа – это карбоксилэстераза (КФ 3.1.1.1), арилэстераза (КФ 3.1.1.2), ариллациламидаза (КФ 3.5.1.13). Вторая группа характеризует фосфатазную активность: это фосфомоноэстераза (КФ 3.1.3...?), РНК-гидролаза или фосфодиэстераза (КФ 3.1.4.16), фосфотриэстераза (КФ 3.1.8.1 и 3.1.8.2). К подподклассу 3.1.8 (гидролазы триэфир фосфорной кислоты) относятся арилдиалкилфосфатаза (КФ 3.1.8.1) и диизопропилфторфосфатаза (КФ 3.1.8.2). Арилдиалкилфосфатаза более известна под названием параоксоназа, среди других названий – А-эстераза, арилтрифосфатаза, эстераза В1, эстераза Е4, пиримифос-метилоксонэстераза, параоксон-гидролаза, арилтрифосфат-диалкилфосфогидролаза. Гидролизует эфиры трехосновной фосфорной, двухосновной фосфоновой и одноосновной фосфиновой кислот. В многочисленных экспериментах была показана истинно- или псевдоэстеразная активность альбумина по отношению к α -нафтилацетату и *n*-нитрофенилацетату (НФА), эфирам жирных кислот, аспирину, глюкурониду кетопрофена, циклофосфамиду, эфирам никотиновой кислоты, октаноилгРЕЛИНУ, нитроацетанилиду, нитротрифторацетанилиду.

Первая публикация, в которой было обосновано существование в молекуле альбумина по меньшей мере двух разных центров (сайтов), отвечающих за два вида активности, – истинно- и псевдоэстеразную, – появилась в 1972 г. [20]. Вза-

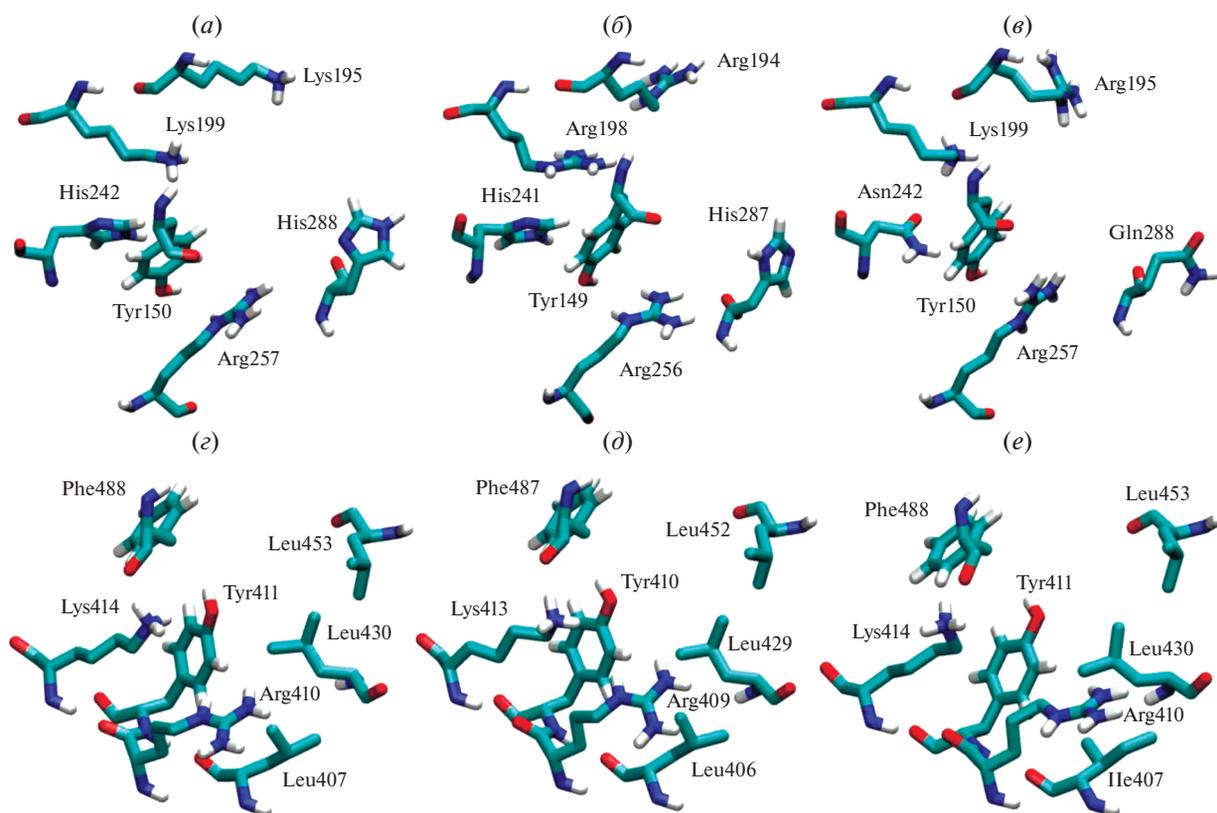


Рис. 1. Структуры сайтов Садлоу I (а, б, в) и Садлоу II (г, д, е) альбуминов человека (а, г), быка (б, д) и крысы (в, е).

имодействие альбумина с НФА имеет двухфазный характер: в течение первых минут наблюдается “всплеск” активности, т.е. происходит быстрое образование продукта, после чего система переходит в стационарный режим, но не выходит на плато. Первую фазу обеспечивают два процесса в двух разных сайтах: моноацетилирование альбумина в результате псевдоэстеразной активности одного сайта и альбумин-катализируемый “истинный” гидролиз во втором сайте. Вторая стадия обусловлена активностью только второго сайта. В токсикологии наибольший интерес представляет проблема (псевдо)эстеразной активности альбумина по отношению к ФОС – эфирам фосфорной или фосфоновой кислот. В разные годы показана эстеразная [6, 7, 21] и псевдоэстеразная [5, 22] активность альбумина по отноше-

нию к ФОС. Авторы работы [7] по нарастанию продуктов в ходе реакций гидролитического расщепления ФОС и карбарила альбумином рассчитали кинетические константы (табл. 1) и установили, что альбумин играет важную роль в детоксикации параоксона и карбарила и в меньшей степени в детоксикации хлорпирифосоксона. В других работах также получены константы взаимодействия альбумина с ФОС. Так, значение кажущейся константы Михаэлиса K_m реакции гидролиза хлорпирифосоксона БСА составляет 0.41 мМ, а параоксона – 1.85 мМ [23]. Значения констант гидролиза диизопропилфторфосфата альбумином человека составляют: кажущаяся константа диссоциации K_s – 3.6 мМ, константа скорости k_2 – 0.0045 с⁻¹ [24].

Таблица 1. Характеристики ферментативного гидролиза ФОС и карбаматов альбумином [7]

Фермент	Субстрат	k_{cat} (мин ⁻¹)	K_m (мкМ)	Каталитическая эффективность k_{cat}/K_m (М ⁻¹ мин ⁻¹)
ЧСА	Параоксон	1.5×10^{-3}	377	3.9
ЧСА	Хлорпирифосоксон	4.0×10^{-2}	2640	15
БСА	Карбарил	9.9×10^{-3}	380	26

Следует отметить, что основными ферментами, участвующими в детоксикации ФОС и карбаматов, являются фосфотриэстеразы, к которым относится параоксоназа-1 (PON-1), а также карбоксилэстеразы (КЭ). В отличие от грызунов, в крови человека содержание КЭ крайне мало, и, по всей видимости, функции этого фермента в значительной степени выполняет альбумин. По этим причинам НФА (классический субстрат для изучения КЭ), и параоксон (субстрат PON-1) широко применяются для изучения эстеразной активности альбумина. Еще одним важным преимуществом данных соединений является тот факт, что продукт их гидролиза нитрофенол имеет желтую окраску с пиком поглощения при длине волны 400–412 нм и может быть детектирован спектрофотометрическими методами.

Одна из главных причин медленного гидролиза альбумином НФА и других эфиров – отсутствие каталитической триады и оксианионного центра, однако в ряде работ подчеркивается важная роль гуанидинового остатка соседнего Arg410 для псевдоэстеразной активности альбумина в сайте Tyr411. Полагают, что Arg410 выполняет роль оксианионного центра, образуя водородную связь с карбонильной группой субстрата [25], тогда как при связывании, например, негидролизуемого диазепама Arg410 особой роли не играет [26]. Кроме того, для эстеразной активности альбумина (по крайней мере, по отношению к такому эфиру как *n*-нитрофенил 4-гуанидинобензоат) необходим остаток гистидина [27], т.к. рН-профиль константы скорости k_2 показал наличие двух ионизируемых каталитических групп в молекуле альбумина с рКа около 6 и 10, что свидетельствует об ионизации имидазольного остатка гистидина и гидроксильной группы тирозина соответственно. Имидазольная группа гистидина функционирует при гидролизе как общеосновной катализатор. Возможно, что для гидролиза альбумином некоторых субстратов необходима каталитическая “диада” His-Tyr или Lys-Tyr, в которой гистидин или лизин выполняют роль кислотного остатка; такие случаи описаны в литературе, с тем отличием, что два разных гистидина выполняют функции кислотного и основного остатков [28]. С учетом анализа этих и других литературных данных мы предположили, что из двух главных сайтов, взаимодействующих с НФА и ФОС, сайт Садлоу I с Tyr150 проявляет истинно эстеразную активность, а сайт Садлоу II с Tyr411 – псевдоэстеразную. Для проверки предположения были проведены эксперименты *in vitro* и *in silico* [8, 29–33].

Детали механизма псевдо(эстеразной) активности альбумина подробно описаны в нашем предыдущем обзоре [4]. В той же работе рассмотрены кинетические схемы взаимодействия альбумина с различными субстратами. В наших последующих биохимических исследованиях [8, 33] для

количественной оценки кинетических параметров гидролиза НФА и параоксона альбумином мы прежде всего принимали во внимание модель, предложенную Ascenzi и Fasano [34], но также ацилферментативную модель расщепления НФА химотрипсином, предложенную Бендером и соавторами [35], модель гидролиза НФА липазой [36], модель ингибирования холинэстераз фосфорорганическими соединениями [37]. На первом этапе взаимодействия альбумина с субстратом (схема 1) происходит его адсорбция в сайте Садлоу II (*ES*), быстрое высвобождение продукта *n*-нитрофенола (P_1), отмечаемое как “всплеск” активности, и ацелирование тирозина Tyr411 (*EA*). На втором этапе субстрат связывается с альбумином в сайте Садлоу I, где происходит его гидролиз до ацетата (P_2) и *n*-нитрофенола (P_1). Важной особенностью схемы для интерпретации полученных нами данных является то, что она может и даже должна быть применима для описания взаимодействия субстрата не только с одним сайтом альбумина, и не только с каждым из двух (или более) сайтов в отдельности, но также с молекулой альбумина, в состав которой входит как минимум два сайта связывания и (псевдо)эстеразной активности.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТ СВЯЗЫВАЮЩЕЙ И ЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ АЛЬБУМИНА

Задачу определения кинетических констант ферментативных реакций можно разбить на два этапа. Первый этап – построение зависимости концентраций продукта и/или субстрата от времени, так называемой концентрационной кривой. Существует целый ряд подходов для этой цели: спектрофотометрия в видимой и ультрафиолетовой областях, спектрофлуориметрические, люминесцентные, спектроскопические и радиоизотопные методы [38]. Каждый из подходов имеет свои достоинства и ограничения, свою точность и чувствительность к примесям и выбирается исходя из объектов исследования. Отдельной группой стоят подходы для анализа активности ферментов с высоким числом оборотов, для которых длительность предстационарного состояния составляет миллисекунды: методы остановленной струи, температурного скачка и др. Однако такой “медленный” фермент как альбумин не требует специальных манипуляций для замедления или остановки реакции.

Второй этап – применение математических моделей для вычисления кинетических констант из концентрационных кривых. Классическая кинетика Михаэлиса-Ментен и Бриггса-Холдейна [39, 40] не является универсальной, поскольку имеет ряд допущений: 1) избыток свободного субстрата, 2) стационарность ($d[ES]/dt = 0$), и 3) быстрое установление равновесия между ферментом и

субстратом, что возможно при $k_{cat} \ll k_{-1}$ и $k_{cat} \leq k_{+1}$, т.е. когда значения K_m и K_s практически совпадают. Ситуации, когда $k_{cat} \gg k_{-1}$ и/или k_{+1} , или когда мы не знаем *a priori* сколько свободного субстрата имеется в стационарном состоянии, означают серьезное отклонение от классической кинетики и требуют применения других моделей, например, ван Слайка-Каллена или Моррисона [41–43]. Совершенствование математического описания ферментативных реакций продолжается и в новейшее время [44–46].

Что касается альбумина, спектрометрические методы, основанные на мониторинге высвобождаемого продукта гидролиза, хорошо зарекомендовали себя в экспериментах, направленных на измерение кинетических констант ферментативной активности этого белка [47, 48]. В наших экспериментах активность альбумина относительно НФА и параоксона определяли по накоплению нитрофенола, образующегося в результате гидролиза этих субстратов (продукт P_1 на схеме 1) [8]. Нитрофенол является продуктом псевдоэстеразной реакции в сайте Садлоу II и одним из продуктов эстеразной реакции в сайте Садлоу I. Для вычисления констант из полученных концентрационных кривых мы применяли следующий подход. Согласно используемой нами модели (схема 1), процесс выхода нитрофенола включает 2 этапа: предстационарное состояние (фаза “всплеска”, кинетика Садлоу II) и стационарное состояние (кинетика Садлоу I).

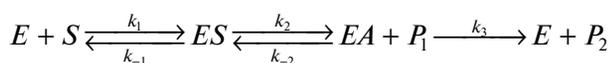


Схема 1. Взаимодействие между альбумином и субстратом (*n*-нитрофенилацетатом и параоксоном). S – субстрат, P_1 – *n*-нитрофенол, P_2 – ацильная или диэтилфосфатная группа.

Амплитуду фазы “всплеска” обозначим α . Константу скорости обозначим k_{obs} . Выход продукта представляет собой реакцию (псевдо)первого порядка в течение почти 95% времени фазы “всплеска”. Константа скорости деацетилирования сайта Садлоу II k_3 на два порядка ниже скорости ацетилирования тирозина, полученной даже на самых низких концентрациях субстрата.

Использованные нами аппроксимирующие функции имеют вид:

$$[P_1] = \alpha[E_0](1 - e^{-k_{obs}t}), \quad (1)$$

где:

$$\alpha = \left[\frac{k_2[S]}{(k_2 + k_2)(k_m + [S])} \right]^2, \quad (2)$$

$$k_{obs} = \left(\frac{k_2[S]}{K_s + [S]} \right) + k_2. \quad (3)$$

Преобразуем уравнение (3) по методу двойных обратных величин. Скорость деацетилирования сайта Садлоу II очень низка, поэтому константой k_3 можно пренебречь:

$$\frac{1}{k_{obs}} = \frac{1}{k_2} + \frac{K_s}{k_2} \frac{1}{[S_0]}. \quad (4)$$

Стационарное состояние описывается следующим уравнением:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{k_3[E_0]} + \frac{K_m^{app}}{k_3[E_0][S_0]}. \quad (5)$$

Уравнения (4) и (5) имеют форму $y = b + ax$ и могут быть использованы для линейного регрессионного анализа. Определив наклон прямой и ее пересечение с осью ординат, мы найдем k_2 , k_3 , K_s и K_m^{app} .

Отделить кинетику сайта Садлоу I от кинетики сайта Садлоу II и дополнить набор констант возможно, если наблюдать выход продукта эстеразной реакции в сайте Садлоу I (P_2 на схеме 1). В случае гидролиза НФА – это ацетат, определить который с помощью спектрофотометрии невозможно. Одним из возможных способов детекции ацетата может стать метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР). В литературе не описано применение ЯМР-спектроскопии для изучения ферментативной активности альбумина, и без сомнения такого рода эксперимент мог бы открыть его новые функциональные особенности.

Широкое применение для изучения взаимодействия белков с лигандами получили методы молекулярного моделирования, в первую очередь методы молекулярного докинга и классической молекулярной динамики, а также методы оценки свободной энергии образования белок-лигандных комплексов из траекторий молекулярной динамики [49]. Молекулярный докинг представляет собой так называемую “стыковку” молекулы лиганда в центре связывания белка [50]. С помощью компьютерной программы молекула лиганда виртуально помещается в центр связывания мишени, затем перебором конформаций лиганда и аминокислот сайта связывания ищется наиболее энергетически выгодное их взаимное расположение. Ранжирование конформаций лиганда в сайте связывания производится с помощью оценочной функции (ОФ). Основные проблемы поиска оптимальных конфигураций заключаются в следующем: 1) вычисления по всему конфигурационному пространству требуют много времени и существующие алгоритмы конформационного поиска не могут проверить все возможные конформации; 2) современные оценочные функции не могут с высокой точностью учесть все нюансы взаимодействия между белком и лигандом (влияние растворителя, энтропийный компонент). Поэтому результатом запуска процедуры докинга

обычно является набор возможных конформаций, из которых на основе известных экспериментальных данных выбирается наиболее вероятная [51, 52].

Энергетическая характеристика белок-лигандного комплекса, полученного методом докинга, в идеале характеризует сродство лиганда к белку, то есть, по сути – константу диссоциации $K_s = k_{-1}/k_1$ (схема 1), пусть и не в абсолютном значении, а при сравнении разных лигандов. Но, во-первых, как было отмечено выше, докинг определяет лишь положение молекулы лиганда непосредственно в сайте связывания белка, не давая возможности проследить предшествующие стадии взаимодействия (связывание лиганда в периферических сайтах, конформационные изменения в молекуле белка в процессе “прохождения” лиганда к сайту связывания, движение молекул воды). Особенно это важно для сайта Садлоу I альбумина, в большой полости которого имеются две полярные микроструктуры из соответствующих аминокислот (в Садлоу II лишь одна подобная микроструктура), но что особенно важно – молекулы воды, которых нет в полости Садлоу II, которые довольно жестко структурированы под влиянием полярных микроструктур, и которые не учитывает метод молекулярного докинга. Во-вторых, из множества решений молекулярного докинга для анализа обычно выбирается конформация комплекса, которая соответствует геометрическим критериям продуктивной конформации: положение субстрата должно быть таким, чтобы могла состояться ферментативная реакция (в случае альбумина – нуклеофильная атака каталитического тирозина на карбонильный атом углерода НФА или атом фосфора параоксона). Не обязательно продуктивный фермент-субстратный комплекс является единственным решением и не всегда ранжируется как самый энергетически выгодный. По этой причине, мы полагаем, что в случае альбумина энергетические характеристики продуктивного фермент-субстратного комплекса, полученного методом молекулярного докинга, скорее характеризуют скорость ацетилирования белка: константа k_2 из схемы 1.

Метод молекулярной динамики позволяет проследить конформационные изменения макромолекул во времени с помощью интегрирования уравнений движения атомов [53]. Период времени, в течение которого наблюдается поведение системы, называется длиной траектории или длиной симуляции. Метод ММ-РBSA (molecular mechanics/Poisson–Boltzmann surface area), сочетающий использование молекулярной механики и решение уравнения Пуассона-Больцмана [49] позволяет оценить свободную энергию образования комплекса белок-лиганд ΔG из траекторий молекулярной динамики. В этом подходе учитывается

энергия сольватации, а в некоторых программах оценивается и энтропийная составляющая. Более того, обычно значение свободной энергии рассчитывается во многих точках траектории, то есть для ряда возможных конформаций лиганда внутри сайта связывания, итоговое значение рассчитывается как среднее \pm стандартное среднее отклонение [54]. Полученное этим методом значение свободной энергии образования комплекса с лучшим приближением (по сравнению с докингом) характеризует аффинность сайта к лиганду, и его можно сопоставить с константой диссоциации K_s .

Таким образом, совместно применяемые расчетные и экспериментальные методики, дополняя и уточняя друг друга, могут дать полное представление о взаимодействии биологических молекул.

МЕЖВИДОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ В ЭСТЕРАЗНОЙ И СВЯЗЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ АЛЬБУМИНА

Ранее мы исследовали возможные сайты эстеразной активности альбумина человека по отношению к зоману [30]. Проанализировав окружение всех возможных каталитических аминокислот (все серины, тирозины и треонины), для дальнейшего исследования были отобраны те аминокислоты, в окружении которых присутствуют возможные акцепторы протонов. Молекулярный докинг показал, что, помимо уже известного сайта псевдоэстеразного гидролиза зомана Садлоу II с каталитическим тирозином Tyr411 [5], зоман может продуктивно связываться только возле аминокислот Tyr150 (сайт Садлоу I) и Ser193. В окружении Tyr150 присутствует аминокислотный остаток гистидина His242, а в окружении Ser193 – гистидин His146. Логично было предположить, что эти сайты могут быть ответственными за эстеразную активность альбумина по отношению к зоману.

Однако при анализе новых литературных и собственных данных возникли новые вопросы. Как было отмечено, сайт Садлоу II высоко консервативен: диада Tyr411-Arg410 присутствует в альбуминах всех млекопитающих. Что касается аминокислот Tyr150, Ser193 и их окружения – такой консервативности не наблюдается. Так, His242(241), содержащийся в структуре ЧСА и БСА, заменен на Asn242 в структуре КСА. Ser193 присутствует в ЧСА и БСА, но в КСА заменен на остаток аланина. Lys199 в сайте Садлоу I человека отвечает за гидролиз аспирина [55], но в структуре БСА вместо лизина находится аргинин. Значит ли это, что эффективность (псевдо)эстеразной активности альбуминов разных видов будет различна?

Таблица 2. Кинетические характеристики карбоксилэстеразной активности разных видов альбумина [8]

	ЧСА	БСА	КСА
Садлоу II			
<i>Предстационарный режим</i>			
k_2 (с ⁻¹)	0.48 ± 0.1	0.48 ± 0.01	0.47 ± 0.01
$K_s = k_{-1}/k_1$ (мкМ)	5.92 ± 0.99	2.77 ± 1.1	6.28 ± 0.67
k_2/K_s (мм ⁻¹ с ⁻¹)	81.1 ± 7.7	173.3 ± 21.1	74.8 ± 4.45
Садлоу I			
<i>Стационарный режим</i>			
k_3 (с ⁻¹)	0.020 ± 0.001	0.020 ± 0.003	0.019 ± 0.003
K_m^{app} (мкМ)	761.9 ± 50.5	2208.3 ± 73.8	396.7 ± 95.1
k_3/K_m^{app} (мм ⁻¹ с ⁻¹)	0.026 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.051 ± 0.008

Не так много исследований посвящено сравнительному анализу связывающей и ферментативной активности альбуминов разных видов, а в этих редких работах обычно проводится сравнение лишь двух видов белка. Для пары ЧСА-БСА накоплены данные о том, что эффективность взаимодействия различных ксенобиотиков различается для этих двух белков. Так, сравнительный анализ показал, что ЧСА эффективнее связывает капрофен и 2-антроцен-карбоксильную кислоту [56]. В работе [57] показано, что декстран голубой связывается только с ЧСА и не взаимодействует с БСА. Авторы другой работы [58] показали, что варфарин с большей эффективностью взаимодействует с БСА, чем с ЧСА, а его структурный аналог аценокумарол, содержащий дополнителную NO₂ группу, наоборот, эффективнее связывается с ЧСА. Полифенолы куркумин и диацетилкуркумин намного эффективнее взаимодействуют с БСА, чем с ЧСА [59]. Выявлено, что пиридоксальфосфат связывается в 10 раз менее эффективно с БСА, чем с ЧСА [60], а метилпараион при комнатной температуре в полтора раза лучше взаимодействует с ЧСА, чем с БСА [61]. В некоторых исследованиях показано, что ЧСА и КСА имеют схожие характеристики связывания биологически активных веществ [62]. Согласно другим данным, эффективность взаимодействия некоторых ксенобиотиков различается для ЧСА и КСА [63, 64].

Таким образом, согласно анализу литературных данных, по результатам исследования функциональных характеристик альбумина одного вида животных нельзя *a priori* утверждать, что альбумин другого вида будет обладать такими же характеристиками. В нашем недавнем исследовании мы изучили эстеразную и параоксоназную активность сывороточного альбумина человека, быка и крысы [8]. Для этого биохимическими методами были получены кинетические и равнове-

сные характеристики взаимодействия ЧСА, БСА и КСА с двумя субстратами — НФА и параоксоном. Результаты сравнительного биохимического анализа представлены в табл. 2 и 3.

Данные сравнительного биохимического анализа трех видов альбумина с использованием НФА и параоксона в качестве субстратов свидетельствуют о том, что равновесные и кинетические характеристики обоих сайтов Садлоу ЧСА и КСА довольно близки между собой, но существенно отличаются от аналогичных характеристик бычьего альбумина. Карбоксилэстеразные характеристики сайта Садлоу II ЧСА и КСА практически одинаковы, тогда как параоксоназные характеристики лишь незначительно отличаются между ЧСА и КСА. Результаты наших исследований подтверждают предположение, основанное на данных об идентичности сайтов, об эволюционной консервативности сайта Садлоу II по сравнению с сайтом Садлоу I исследованных видов альбумина. Отметим, что сайт Садлоу I БСА отличается от ЧСА заменой Lys195 и Lys199 на Arg194 и Arg198, а сайт Садлоу I КСА от ЧСА заменой His242 и His288 на Asn242 и Gln288 (рис. 1). Следовательно, замена лизинов на аргинины более критична для работы сайта Садлоу I, чем замена гистидинов на аспарагины. Более того, замена Lys на Arg по-разному влияет на родство сайта к НФА и параоксону: БСА хуже связывает НФА по сравнению с ЧСА и КСА, но лучше — параоксон, что влияет на эффективность карбоксилэстеразной и параоксоназной реакции в сайте Садлоу I БСА.

Следует отметить практическую значимость выявленных межвидовых различий эстеразной активности альбумина. Полученная информация позволяет сформулировать некоторые рекомендации использования альбумина в биологических экспериментах. Так, если альбумин используется исключительно для создания необходимого уров-

Таблица 3. Кинетические характеристики параоксоназной активности разных видов альбумина в отношении параоксона [8]

	ЧСА	БСА	КСА
Садлоу II			
<i>Предстационарный режим</i>			
k_2 (с ⁻¹)	0.43 ± 0.01	0.49 ± 0.02	0.48 ± 0.01
$K_s = k_{-1}/k_1$ (мкМ)	3.99 ± 1.7	0.86 ± 0.1	2.41 ± 0.8
k_2/K_s (мМ ⁻¹ с ⁻¹)	0.15 ± 0.06	0.58 ± 0.06	0.23 ± 0.08
k_3 (× 10 ⁻⁶ с ⁻¹)	0.82 ± 0.15	0.75 ± 0.21	0.50 ± 0.25
Садлоу I			
<i>Стационарный режим</i>			
k_3 (с ⁻¹)	0.00032 ± 0.00001	0.00096 ± 0.00006	0.00072 ± 0.00007
K_m^{app} (мкМ)	801.6 ± 7.8	447.7 ± 34.5	1361.6 ± 165.3
k_3/K_m^{app} (мМ ⁻¹ с ⁻¹)	0.00040 ± 0.00001	0.00216 ± 0.00029	0.00052 ± 0.00002

ня осмотичности, например, в буферных растворах, или в культуральных средах при работе с клетками человека, то ничего плохого в использовании дешевого бычьего альбумина нет. При этом даже не обязательно применять БСА, свободный от жирных кислот. Если же речь идет о токсико- или фармакокинетических исследованиях препаратов для человека, не говоря уже об определении кинетических и равновесных констант, то, безусловно, надо использовать альбумин человека, причем ЧСА, свободный от жирных кислот, который на порядок дороже аналогичного бычьего альбумина. С другой стороны, если предполагается работа с клетками крысы или препаратами для крысы, требующая использования альбумина, то в таких исследованиях можно применять альбумин человека, так как КСА на порядок дороже ЧСА.

МОДУЛЯЦИЯ СВЯЗЫВАЮЩЕЙ И ЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ АЛЬБУМИНА

Молекула альбумина может связать одновременно до десяти молекул лигандов, и по этой причине многие вещества конкурируют между собой за связывающие центры [65, 66]. Помимо прямой конкуренции, альбумин подвержен аллостерической модуляции: связывание лиганда в одном сайте может влиять на эффективность связывания в другом. Так, в молекуле альбумина происходят конформационные изменения после связывания ряда эндогенных соединений, таких как билирубин [67], мочевины [68], эстрадиол [69], глюкоза [70]. Экзогенные соединения также могут оказывать аллостерическое влияние. Напри-

мер, связывание лоразепама с сайтом Садлоу II меняет эффективность связывания варфарина в Садлоу I [71], связывание теноксикама в Садлоу I усиливает связывание диазепама в Садлоу II, и наоборот [72]. Эти особенности позволяют предположить, что направленным воздействием на альбумин с помощью молекул, модулирующих его связывающие и/или эстеразные свойства, можно влиять на процесс взаимодействия белка с ФОС, что в свою очередь может стать вспомогательным вариантом детоксикации отравляющих веществ в кровеносном русле. В поисках вспомогательных средств отравления в последнее время стали уделять внимание нутрицевтикам, биологически активным веществам природного происхождения, как правило, компонентам продуктов питания, действие которых проявляется не сразу, но при продолжительном приеме, иногда в составе т.н. функционального питания [73]. Их преимущество заключается в доступности и дешевизне. В экспериментах с ФОС установлены превентивные эффекты омега-3-полиненасыщенных жирных кислот [74], экстракта корня имбиря *Zingiber officinale* [75] и полифенолов *Parquetina nigrescens*, представителя семейства Кутровых [76]. Представляет интерес действие полифенолов декофеинизированного зеленого чая *Camellia sinensis* (ЭЗЧ) в силу его плейотропных эффектов [77, 78]. И жирные кислоты (ЖК), и полифенолы способны связываться с альбумином [79, 80], поэтому их возможное влияние на связывающие и эстеразные свойства белка представляет особый интерес.

Концентрация мажорных ЖК (олеиновая, пальмитиновая, стеариновая и линолевая) в плазме крови в норме составляет десятки или даже сотни мкМ [81]. Методом РСА было показано,

что в молекуле альбумина существует семь сайтов связывания ЖК: FA1 (возле Ala158), FA2 (возле Leu22), FA3 (возле Asn391), FA4 (возле Tyr411), FA5 (возле Ala528), FA6 (возле Ala213), FA7 (возле Tyr150) [79]. Мажорные жирные кислоты обладают максимальным сродством к сайту FA5, и чуть меньшим сродством к сайту FA2 [82]. Альбумин человека при взаимодействии с ЖК в растворе обладает повышенной пластичностью и гибкостью [83]. Показано влияние ЖК на сродство альбумина к различным лигандам [84–86], поэтому мы предположили влияние ЖК на эффективность взаимодействия альбумина с ФОС.

В экспериментах *in vitro* мы установили, что олеиновая и пальмитиновая кислоты обладают ингибирующим действием на эстеразную активность альбумина быка по отношению к НФА в сайте Садлоу I, причем даже более выраженным по сравнению с выявленным ранее у ибупрофена и варфарина. Константа скорости ингибирования эстеразной реакции олеатом в концентрациях 20 и 30 мкМ составила, соответственно, 2.37×10^{-3} и $3.19 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$, а пальмитатом 2.50×10^{-3} и $3.64 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$. Что касается параоксоназной активности, анализ экспериментальных данных не выявил выраженного ингибирующего действия пальмитата, в отличие от олеата, который незначительно, но подавлял ферментативную активность сайта Садлоу I БСА в отношении параоксона (аппроксимированная константа ингибирования $K_i = 963.0 \pm 157.8 \text{ мкМ}$). Применив математические и графические методы (методы Диксона и Корниш-Боудена), мы выявили *неконкурентный* тип ингибирования олеатом реакции гидролиза параоксона в сайте Садлоу I [87].

В нашем недавнем исследовании [88] методом молекулярной динамики были изучены геометрические характеристики комплексов параоксона с сайтами Садлоу I и Садлоу II ЧСА в отсутствие и в присутствии олеиновой кислоты в сайтах FA5 и FA2 (сайты с максимальной аффинностью к олеиновой кислоте). Были оценены стабильность продуктивных комплексов (в которых возможна атака гидроксила тирозина на атом фосфора лиганда) и значения свободной энергии образования этих комплексов. Согласно полученным данным, повышенная концентрация олеиновой кислоты в крови за счет аллостерической модуляции (неконкурентное ингибирование) будет снижать вероятность связывания параоксона с альбумином в обоих сайтах, а также уменьшать вероятность псевдоэстеразной реакции в сайте Садлоу II. Полученный результат не позволяет сделать однозначный вывод о том, будет ли связывание олеиновой кислоты в сайтах FA5 и FA2 влиять на эстеразную реакцию в сайте Садлоу I: и в отсутствие, и в присутствии олеиновой кислоты продуктивный комплекс параоксона с сайтом не

стабилен. Мы полагаем, что для его стабилизации и возможности прохождения эстеразной реакции требуются какие-то дополнительные условия, не учтенные в процессе моделирования, например, депротонирование каталитического тирозина.

Таким образом, и эксперименты *in vitro* и *in silico* указывают на возможность модуляции жирными кислотами эстеразной и связывающей активности альбумина по отношению к ФОС. Во многих работах отмечается роль Arg410 в механизме псевдоэстеразной активности альбумина в сайте Садлоу II [25], пространственное отдаление Arg410 от Tyr411 ведет к ослаблению этой активности [89]. Согласно нашим данным, Arg257 играет ключевую роль в механизме аллостерической модуляции активности сайта Садлоу I [31]. Arg257 служит своего рода “заслонкой” между каталитическим тирозином Tyr150 и гистидинами из ближайшего окружения His242 и His288, способными принимать протон группы ОН тирозина в процессе возможной эстеразной реакции. Мы полагаем, что связывание модуляторов может влиять на положение этой “заслонки” и влиять на возможность протекания эстеразной реакции.

Что касается полифенолов, наши эксперименты *in vitro* с НФА в качестве субстрата показали, что декофеинизированный ЭЗЧ и его мажорный компонент галлат эпигаллокатехин (ЭГКГ) оказывал активирующее влияние на эстеразную активность альбумина быка, что выражалось в повышении скорости истинно эстеразной реакции в сайте Садлоу I. Анализ полученных данных показал, что полифенолы зеленого чая снижают кажущуюся константу Михаэлиса K_m^{app} в 1.9 раза (при концентрации ЭГКГ 50 мкМ), а также повышают каталитическую константу k_{cat} на 30% по сравнению с контролем. Влияние ЭЗЧ на псевдоэстеразную активность сайта Садлоу II выражается в незначительном увеличении константы диссоциации K_s и понижении кажущейся константы Михаэлиса K_m^{app} по сравнению с контролем, однако данные изменения статистически недостоверны. Действие ЭЗЧ на скорость гидролиза параоксона бычьим альбумином оказалось схожим с НФА: активность обоих сайтов альбумина значительно усиливалась [87]. Последующие эксперименты *in vivo* показали, что применение ЭЗЧ обуславливает снижение индексов атерогенности, а также позитивную динамику целого ряда первичных и производных показателей за счет изменения уровней альбумина, триглицеридов, орозомукоида, мочевой кислоты, баланса клеток иммунной системы, способствуя регенерации организма экспериментальных животных после отравления ФОС [90].

ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО КРАУДИНГА НА СВЯЗЫВАЮЩУЮ И ЭСТЕРАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ АЛЬБУМИНА

Отличительной особенностью живых систем является то, что биохимические процессы протекают в среде, содержащей высокие концентрации макромолекул (50–400 мг/мл). Такие условия называются молекулярным краудингом. За счет “плотной” среды уменьшается объем доступного растворителя, что приводит к увеличению эффективной концентрации макромолекул и повышению их химической активности. Это в свою очередь изменяет скорости и константы равновесия их реакций. В частности, этот эффект способствует ассоциации макромолекул, например, объединению белков в надмолекулярные структуры. Краудинг может также влиять на ферментативные реакции с участием малых молекул, если в процессе реакции изменяется конформация фермента [91]. К настоящему моменту экспериментально показано влияние молекулярного краудинга на структуру многих белков [92–94], связывающую и каталитическую активность ряда ферментов [95–97].

В плазме крови плотность макромолекул достигает 80 мг/мл, что обуславливает заметные краудинг-эффекты, влияя на конформационные и функциональные характеристики белков плазмы [98]. Краудинг-эффекты были выявлены, в том числе, и для альбумина. В работе [99] методом Рамановской спектроскопии было показано, что высокие концентрации БСА и среда с высокой концентрацией другого белка (высокостабильная производная рибонуклеазы термофильной археи *Thermococcus kodakarensis*) влияли на силу водородных связей внутри молекулы альбумина. Это в свою очередь приводило к тому, что молекула БСА принимала более компактную структуру. В работе [100] изучали влияние молекулярного краудинга на связывание насыщенных среднецепочечных и ненасыщенных длинноцепочечных ЖК с БСА. Для создания необходимых условий использовали полимер полиэтиленгликоль ПЭГ2000. Добавление в среду полимера улучшало связывание среднецепочечных ЖК, однако последующее повышение концентрации ПЭГ приводило к снижению аффинности. Проанализировав вторичную структуру БСА, авторы пришли к заключению, что с постепенным увеличением плотности среды молекула альбумина разрыхляется, но после определенной концентрации ПЭГ (5 wt %) процентное соотношение упорядоченных альфа-спиралей и бета-слоев снова возрастает, и альбумин принимает более компактную форму. Таким образом, чем “рыхлее” белок, тем лучше он связывает среднецепочечные ЖК. Что касается длинноцепочечных ЖК, при любой ненулевой

концентрации полимера их связывание с БСА ухудшалось.

Таким образом, с учетом имеющихся литературных данных, можно предположить, что константы эстеразной и связывающей активности альбумина в кровеносном русле, где его концентрация существенно выше, чем в биохимических экспериментах, будут отличаться от констант, измеренных в “идеальном растворе” *in vitro* и/или рассчитанных с помощью методов молекулярного моделирования. Безусловно, требуются дополнительные эксперименты, моделирующие активность альбумина в условиях молекулярного краудинга.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФОС С АЛЬБУМИНОМ

В настоящее время антидотная терапия при отравлении ФОС направлена на блокаду ацетилхолиновых рецепторов с помощью атропина, на реактивацию АХЭ с помощью оксимов (карбоксим, пралидоксим, HI-6 и др.), а также на ослабление судорог с помощью агонистов бензодиазепиновых рецепторов (диазепам, мидазолам и т.д.) [101–104]. Базовый антидотный комплекс предназначен, прежде всего, для выживания организма в догоспитальный период, но не предназначен для предотвращения развития отставленных эффектов острого отравления, среди которых наиболее известными являются т.н. промежуточный синдром и ФОС-индуцированная отставленная полинейропатия [105]. Между тем, описаны и другие патологические состояния, обуславливающие отставленную патологию после острой интоксикации ФОС: это эпилептические припадки, воспалительные процессы в центральной нервной системе, периферических нервных волокнах и кровеносных сосудах, злокачественная гипертермия [106–109].

Эффективность существующей антидотной, симптоматической и профилактической терапии можно существенно повысить за счет усиления детоксикации ФОС на первом этапе поступления яда в организм – в кровеносном русле, что позволит уменьшить токсическое действие ФОС на АХЭ нервно-мышечных и нейрональных синапсов и избежать отставленных эффектов отравления. Исследования, связанные с разработкой средств детоксикации ФОС на первом этапе поступления яда в организм, направлены в основном на получение рекомбинантных биочистильщиков: бутирилхолинэстеразы для стехиометрического и параксоназы для каталитического взаимодействия с ФОС [110, 111]. Несмотря на огромные затраты, связанные с разработкой биочистильщиков, перспективы получения на их основе эффективных и применимых на практике средств антидотной терапии весьма туманны, поскольку для достиже-

ния желаемого эффекта требуется существенная “перекрыжка” ферментов на молекулярном уровне [112, 113]. Высокоаффинное связывание ФОС в кровеносном русле можно также обеспечить с помощью ДНК- или РНК-аптамеров, представляющих собой короткие нити олигонуклеотидов [114]. Основная сложность в подборе аптамеров к ФОС состоит в том, что молекулы этих токсических веществ часто имеют схожую структуру. Это затрудняет выбор аптамера, который не просто хорошо связывает молекулу ФОС, но связывает ее с высокой специфичностью [115, 116]. Существуют и трудности в методологии, связанные с тем, что молекула аптамера в разы больше, чем молекула отравляющего вещества [117].

Что касается разрабатываемой нами возможности направленного воздействия на альбумин для усиления терапии отравления ФОС, основные преимущества этого подхода следующие: 1) альбумин является основным транспортным белком крови и его концентрация в плазме крайне высока, 2) трехмерная структура альбумина достаточно лабильна и легко подвержена аллостерической модуляции, 3) альбумин может связывать практически все биоактивные вещества, и влиять на его активность можно доступными и дешевыми соединениями.

Результаты наших экспериментов позволяют сделать вывод о том, что с помощью эндогенных и экзогенных лигандов альбумина возможно регулировать эффективность взаимодействия альбумина с ФОС. Другой вопрос, что в условиях *in vivo* качество этой модуляции зависит от многих факторов и не в последнюю очередь от количественного соотношения модуляторов и ФОС. Наши данные позволяют предположить, что позитивный результат с точки зрения выживания при остром отравлении ФОС можно получить лишь в случае менее токсичных ФОС с более высокой аффинностью к альбумину. Например, меньшая токсичность параоксона по сравнению с зоманом может быть связана не только с его меньшей ингибиторной активностью в отношении холинэстераз, но также с повышенной аффинностью параоксона к обоим сайтам Садлоу альбумина [33].

Еще одна задача, которую предстоит решить, заключается в том, что в условиях молекулярного краудинга в плазме крови альбумин, по всей видимости, становится чем-то вроде диффузного цитоскелета, поверхность которого покрыта маслом (жирные кислоты) и/или ледяной коркой (структурированная вода). По этой поверхности гораздо легче перемещаться, чем по воде (раствор без альбумина) или по рыхлому снегу (неструктурированная вода в окружении альбумина). По этой причине взаимодействие жирных кислот с альбумином может привести к тому, что молекулы ФОС будут проигрывать конкуренцию за свя-

зывание с сайтами Садлоу. Тогда альбумин будет служить для них лишь удобной платформой для более быстрого перемещения – с молекулы на молекулу – по кровеносному руслу и межклеточному пространству к основной мишени – ацетилхолинэстеразе нейромусcularных или нейрональных синапсов. Выходом может стать создание аптамера к параоксону, который бы связывался с белком и закрывал его сайты от взаимодействия с ФОС и ЖК. Усовершенствованием этого решения может стать создание двойного аптамера, который бы мог одним фрагментом связаться с альбумином, другим – с ФОС. Более дешевым и при этом, может быть, даже более эффективным способом нарушения транспорта молекул ФОС в условиях молекулярного краудинга является ослабление сил “сцепления”, т.е. связывающих характеристик альбумина за счет транзитного уменьшения его концентрации в крови с помощью регидратирующих солевых препаратов. Работа в этом направлении уже начата, получены первые обнадеживающие результаты и есть основания надеяться на то, что альбумин преподнесет нам еще немало сюрпризов в самом хорошем смысле этого слова.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания № АААА-А18-118012290142-9 при поддержке РФФИ (проект № 18-015-00304).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Macwilliam J.A.* // *Br. Med. J.* 1891. V. 1. P. 837–840.
2. *Fasano M., Curry S., Terreno E., Galliano M., Fanali G., Narciso P., Notari S., Ascenzi P.* // *IUBMB Life.* 2005. V. 57. P. 787–796.
3. *Sudlow G., Birkett D.J., Wade D.N.* // *Mol. Pharmacol.* 1975. V. 11. P. 824–832.
4. *Гончаров Н.В., Белинская Д.А., Разыграев А.В., Уколов А.И.* // *Биоорг. химия.* 2015. Т. 41. № 2. С. 131–144. [*Goncharov N.V., Belinskaya D.A., Ukolov A.I., Razygraev A.V.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2015. V. 41. P. 113–124.]
5. *Li B., Nachon F., Froment M.T., Verdier L., Debouzy J.C., Brasme B., Gillon E., Schopfer L.M., Lockridge O., Masson P.* // *Chem. Res. Toxicol.* 2008. V. 21. P. 421–431.

6. John H., Breyer F., Thumfart J.O., Höchstetter H., Thiermann H. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. V. 398. P. 2677–2691.
7. Sogorb M.A., Vilanova E. // *Chem. Biol. Interact.* 2010. V. 187. P. 325–329.
8. Гончаров Н.В., Терпиловский М.А., Шмурак В.И., Белинская Д.А., Авдонин П.В. // *ЖЭБФ.* 2017. Т. 53. № 4. С. 241–250. [Goncharov N.V., Terpilovskii M.A., Belinskaya D.A., Shmurak V.I., Avdonin P.V. // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2017. V. 53. P. 271–281.]
9. Гончаров Н.В., Терпиловский М.А., Шмурак В.И., Белинская Д.А., Авдонин П.В. // *ЖЭБФ.* 2019. Т. 55. № 2. С. 104–114. [Goncharov N.V., Terpilovskii M.A., Shmurak V.I., Belinskaya D.A., Avdonin P.V. // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2019. V. 55. P. 112–123.]
10. *The UniProt Consortium* // *Nucleic Acids Res.* 2015. V. 43. P. 204–212.
11. Ghuman J., Zunszain P.A., Petitpas I., Bhattacharya A.A., Otagiri M., Curry S. // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 353. P. 38–52.
12. Vijacz A. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2012. V. 68. P. 1278–1289.
13. Yuas V. K., Ukawala R.D., Ghate M., Chintha C. // *Indian J. Pharm. Sci.* 2012. V. 74. P. 1–17.
14. Таборская К.И., Белинская Д.А., Авдонин П.В., Гончаров Н.В. // *ЖЭБФ.* 2017. Т. 53. С. 342–350. [Taborskaya K.I., Belinskaya D.A., Goncharov N.V., Avdonin P.V. // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2017. V. 53. P. 384–393.]
15. Луйк А.И., Лукьянчук В.Д. Сывороточный альбумин и биотранспорт ядов. М.: Медицина, 1984.
16. Пшенкина Н.Н. // *Российский биомедицинский журнал.* 2011. Т. 12. С. 980–989.
17. Dömötör O., Pelivan K., Borics A., Keppler B.K., Kowol C.R., Enyedy É.A. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018. V. 154. P. 321–331.
18. Schenfeld E.M., Ribone S.R., Quevedo M.A. // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2018. V. 115. P. 109–118.
19. Tang B., Tang P., He J., Yang H., Li H. // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2018. V. 184. P. 18–26.
20. Tildon J.T., Ogilvie J.W. // *J. Biol. Chem.* 1972. V. 247. P. 1265–1271.
21. Radilov A., Rembovskiy V., Rybalchenko I., Savelieva E., Podolskaya E., Babakov V., Ermolaeva E., Dulov S., Kuznetsov S., Mindukshev I., Shpak A., Krasnov I., Khlebnikova N., Jenkins R., Goncharov N. // *Handbook of the Toxicology of Chemical Warfare Agents* / Ed. Gupta R.C. Amsterdam: Academic Press/Elsevier, 2009. P. 69–91.
22. Гладилович В.Д., Краснов И.А., Подольская Е.П., Дубровский Я.А., Войтенко Н.Г., Фиронов С.В., Бабаков В.Н., Гончаров Н.В., Краснов Н.В. // *Научн. приборостр.* 2010. Т. 20. С. 84–92.
23. Sultatos L.G., Basker K.M., Shao M., Murphy S.D. // *Mol. Pharmacol.* 1984. V. 26. P. 99–104.
24. Means G.E., Wu H.L. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1979. V. 194. P. 526–530.
25. Sakurai Y., Ma S.F., Watanabe H., Yamaotsu N., Hirano S., Kurono Y., Kragh-Hansen U., Otagiri M. // *Pharm. Res.* 2004. V. 21. P. 285–292.
26. Watanabe H., Tanase S., Nakajou K., Maruyama T., Kragh-Hansen U., Otagiri M. // *Biochem. J.* 2000. V. 20. P. 813–819.
27. Kurono Y., Miyajima M., Tsuji T., Yano T., Takeuchi T., Ikeda K. // *Chem. Pharm. Bull (Tokyo).* 1991. V. 39. P. 1292–1294.
28. Ekici O.D., Paetzel M., Dalbey R.E. // *ProteinSci.* 2008. V. 17. P. 2023–2037.
29. Белинская Д.А., Шмурак В.И., Прокофьева Д.С., Гончаров Н.В. // *Токсикол. вестник* 2012. № 6. С. 13–19.
30. Белинская Д.А., Шмурак В.И., Прокофьева Д.С., Гончаров Н.В. // *Биоорг. химия.* 2014. Т. 40. № 5. С. 541–549. [Belinskaya D.A., Goncharov N.V., Shmurak V.I., Prokofieva D.S. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2014. V. 40. P. 499–506.]
31. Белинская Д.А., Таборская К.И., Авдонин П.В., Гончаров Н.В. // *Биоорг. химия.* 2017. Т. 43. С. 347–356. [Belinskaya D.A., Taborskaya K.I., Goncharov N.V., Avdonin P.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017. V. 43. P. 359–367.]
32. Белинская Д.А., Шмурак В.И., Таборская К.И., Авдонин П.П., Авдонин П.В., Гончаров Н.В. // *ЖЭБФ.* 2017. Т. 53. С. 170–177. [Belinskaya D.A., Taborskaya K.I., Goncharov N.V., Shmurak V.I., Avdonin P.P., Avdonin P.V. // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2017. V. 53. P. 191–199.]
33. Goncharov N.V., Belinskaya D.A., Shmurak V.I., Terpilowski M.A., Jenkins R.O., Avdonin P.V. // *Molecules* 2017. V. 22. e1201.
34. Ascenzi P., Fasano M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012. V. 422. P. 219–223.
35. Bender M.L., Kezdy F.J., Wedler F.C. Alpha-Chymotrypsin: Enzyme concentration and kinetics // *Journal of Chemical Education.* 1967. V. 44. P. 84–88.
36. De Caro J.D., Rouimi P., Rovey M. // *Eur. J. Biochem.* 1986. V. 158. P. 601–607.
37. Main A.R. // *Science* 1964. V. 144. P. 992–993.
38. Wilson K., Walker J. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology, 7th Edition. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.
39. Michaelis L., Menten M. L. // *Biochem. Z.* 1913. V. 49. P. 333–369.
40. Briggs G.E., Haldane J.B.S. // *Biochem. J.* 1925. V. 19. P. 338–339.
41. Morrison J.F. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1969. V. 185. P. 269–286.
42. Flach E.H., Schnell S. // *Syst. Biol. (Stevenage).* 2006. V. 153. P. 187–191.
43. Kuzmic P. // *Anal. Biochem.* 2009. V. 394. P. 287–289.
44. Галимова М.Х. Ферментативная кинетика: Справочник по механизмам реакций. М.: КомКнига, 2007.
45. Лянгузов А.Ю., Петрова Т.А., Стефанов В.Е. // *ДАН.* 2009. Т. 424. № 5. С. 692–695. [Lyangusov A.Yu., Petrova T.A., Stefanov V.E. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2009. V. 424. P. 49–52.]
46. Voecx J., Hertog M., Geeraerd A., Nicolai B. // *Plant Methods.* 2017. V. 13. E69.
47. Furlong C.E., Richter R.J., Seidel S.L., Motulsky A.G. // *Am. J. Hum. Genet.* 1988. V. 43. P. 230–238.

48. *Sogorb M.A., Díaz-Alejo N., Escudero M.A., Vilanova E.* // Arch. Toxicol. 1998. V. 72. P. 219–226.
49. *Genheden S., Ryde U.* // Expert Opin. Drug. Discov. 2015. V. 10. P. 449–461.
50. *Saikia S., Bordoloi M.* // Curr. Drug. Targets. 2019. V. 20. P. 501–521.
51. *Teodoro M.L., Phillips G.N., Jr., Kaviraki L.E.* // Proc. of the 2001 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA 2001). Seoul, Korea: IEEE press, 2001. P. 960–966.
52. *Пырков Т.В., Озеров И.В., Балицкая Е.Д., Ефремов П.Г.* // Биоорг. химия. 2010. Т. 36. № 4. С. 482–492.
53. *Hospital A., Goñi J.R., Orozco M., Gelpi J.L.* // Adv. Appl. Bioinform. Chem. 2015. V. 8. P. 37–47.
54. *Kumari R., Kumar R., Open Source Drug Discovery Consortium, Lynn A.* // J. Chem. Inf. Model. 2014. V. 54. P. 1951–1962.
55. *Liyasova M.S., Schopfer L.M., Lockridge O.* // Biochem. Pharmacol. 2010. V. 79. P. 784–791.
56. *Kohita H., Matsushita Y., Moriguchi I.* // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 1994. V. 42. P. 937–940.
57. *Antoni G., Casagli M.C., Bigio M., Borri G., Neri P.* // Ital. J. Biochem. 1982. V. 31. P. 100–106.
58. *Brown N.A., Müller W.E.* // Pharmacology. 1978. V. 17. P. 233–238.
59. *Mohammadi F., Bordbar A.K., Divsalar A., Mohammadi K., Saboury A.A.* // Protein J. 2009. V. 28. P. 189–196.
60. *Fonda M.L., Trauss C., Guempel U.M.* // Arch. Biochem. Biophys. 1991. V. 288. P. 79–86.
61. *Silva D., Cortez C.M., Cunha-Bastos J., Louro S.R.* // Toxicol. Lett. 2004. V. 147. P. 53–61.
62. *Han X., Snow T.A., Kemper R.A., Jepson G.W.* // Chem. Res. Toxicol. 2003. V. 16. P. 775–781.
63. *Aubry A.F., Markoglou N., McGann A.* // Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 1995. V. 112. P. 257–266.
64. *Frandsen P.C., Brodersen R.* // Acta Chem. Scand. B. 1986. V. 40. P. 55–59.
65. *Hossain M.K., Khatun A., Rahman M., Akter M.N., Chowdhury S.A., Alam S.M.* // Adv. Pharm. Bull. 2016. V. 6. P. 589–595.
66. *Schneider E.K., Huang J.X., Carbone V., Baker M., Azad M.A., Cooper M.A., Li J., Velkov T.* // J. Mol. Recognit. 2015. V. 28. P. 339–348.
67. *Jacobsen J., Brodersen R.* // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. P. 6319–6326.
68. *Uchida H., Hanano M.* // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 1974. V. 22. P. 1571–1579.
69. *Danesh N., Navae Sedighi Z., Beigoli S., Sharifi-Rad A., Saberi M.R., Chamani J.* // J. Biomol. Struct. Dyn. 2018. V. 36. P. 1747–1763.
70. *Barzegar A., Moosavi-Movahedi A.A., Sattarahmady N., Hosseinpour-Faizi M.A., Aminbakhsh M., Ahmad F., Saboury A.A., Ganjali M.R., Norouzi P.* // Protein Pept. Lett. 2007. V. 14. P. 13–18.
71. *Fitos I., Visy J., Kardos J.* // Chirality 2002. V. 14. P. 442–448.
72. *Brée F., Urien S., Nguyen P., Tillement J.P., Steiner A., Vallat-Molliet C., Testa B., Visy J., Simonyi M.* // J. Pharm. Pharmacol. 1993. V. 45. P. 1050–1053.
73. *Chauhan B., Kumar G., Kalam N., Ansari S.H.* // J. Adv. Pharm. Technol. Res. 2013. V. 4. P. 4–8.
74. *Avci B., Bilge S.S., Arslan G., Alici O., Darakci O., Baratzada T., Ciftcioglu E., Yardan T., Bozkurt A.* // Toxicol. Ind. Health. 2018. V. 34. P. 69–82.
75. *Mukherjee S., Mukherjee N., Saini P., Roy P., Babu S.P.* // Indian J. Exp. Biol. 2015. V. 9. P. 574–584.
76. *Oyagbemi A.A., Omobowale T.O., Ochigbo G.O., Asenuga E.R., Ola-Davies O.E., Ajibade T.O., Saba A.B., Adedapo A.A.* // J. Diet Suppl. 2018. V. 15. P. 269–284.
77. *Sinha S., Du Z., Maiti P., Klärner F.G., Schrader T., Wang C., Bitan G.* // ACS Chem. Neurosci. 2012. V. 3. P. 451–458.
78. *Goncharov N., Maevsky E., Voitenko N., Novozhilov A., Kubasov I., Jenkins R., Avdonin P.* // Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity / Ed. Gupta R.C. Amsterdam: Academic Press. Elsevier, 2016. P. 177–188.
79. *Van der Vusse G.J.* // Drug Metab. Pharmacokinet. 2009. V. 24. P. 300–307.
80. *Latruffe N., Menzel M., Delmas D., Buchet R., Lançon A.* // Molecules. 2014. V. 19. P. 17066–17077.
81. *Duran M.* // Disorders of Mitochondrial Fatty Acid Oxidation and Ketone Body Handling / Eds Blau N., Duran M., Blaskovics M.E., Gibson K.M. Berlin; Heidelberg: Springer, 2003. P. 309–334.
82. *Rizzuti B., Bartucci R., Sportelli L., Guzzi R.* // Arch. Biochem. Biophys. 2015. V. 579. P. 8–25.
83. *Reichenwallner J., Hinderberger D.* // Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1830. P. 5382–5393.
84. *Dasgupta A., Crossey M.J.* // Am. J. Med. Sci. 1997. V. 313. P. 75–79.
85. *Takamura N., Shinozawa S., Maruyama T., Suenaga A., Otagiri M.* // Biol. Pharm. Bull. 1998. V. 21. P. 174–176.
86. *Vorum H., Honoré B.* // J. Pharm. Pharmacol. 1996. V. 48. P. 870–875.
87. *Баталова А.А., Белинская Д.А., Гончаров Н.В.* // Сборник трудов Седьмой научной конференции с международным участием “Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения” / Панин В.П. Москва: ФГБНУ ВИЛАР, 2019. С. 428–434.
88. *Белинская Д.А., Баталова А.А., Гончаров Н.В.* // Токсикол. вестник. 2019. № 3. С. 26–32.
89. *Anraku M., Yamasaki K., Maruyama T., Kragh-Hansen U., Otagiri M.* // Pharm. Res. 2001. V. 18. P. 632–639.
90. *Гончаров Н.В., Терпиловский М.А., Кудрявцев И.В., Серебрякова М.К., Белинская Д.А., Соболев В.Е., Шмурак В.И., Корф Е.А., Авдонин П.В.* // ЖЭБФ. 2019. Т. 55. С. 188–198. [Goncharov N.V., Terpilovskiy M.A., Kudryavtsev I.V., Serebryakova M.K., Belinskaya D.A., Sobolev V.E., Shmurak V.I., Korf E.A., Avdonin P.V. // J. Evol. Biochem. Physiol. 2019. V. 55. P. 208–221.]
91. *Ellis R.J., Minton A.P.* // Nature. 2003. V. 425. P. 27–28.
92. *Kuzntseva I.M., Turoverov K.K., Uversky V.N.* // Int. J. Mol. Sci. 2014. V. 15. P. 23090–23140.

93. Hirai M., Ajito S., Sugiyama M., Iwase H., Takata S., Shimizu N., Igarashi N., Martel A., Porcar L. // *Physica B: Condensed Matter*. 2018. V. 551. P. 212–217.
94. Антифеева Ю.А., Поварова О.И., Родина Н.П., Сулацкий М.И., Карасев М.М., Кузнецова И.М. // *Цитология*. 2018. Т. 60. С. 856–859.
95. Chebotareva N.A. // *Biochemistry (Mosc)*. 2007. V. 72. P. 1478–1490.
96. Pozdnyakova I., Wittung-Stafshede P. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2010. V. 1804. P. 740–744.
97. Hou S., Trochimczyk P., Sun L., Wisniewska A., Kalwarczyk T., Zhang X., Wielgus-Kutrowska B., Bzowska A., Holyst R. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. e22033.
98. Чеботарева Н.А., Курганов Б.И., Ливанова Н.Б. // *Биохимия*. 2004. Т. 69. С. 1522–1536. [Chebotareva N.A., Kurganov B.I., Livanova N.B. // *Biochemistry (Moscow)*. 2004. V. 69. P. 1239–1251.]
99. Ota C., Takano K. // *Langmuir*. 2016. V. 32. P. 7372–7382.
100. Zhu T.T., Zhang Y., Luo X.A., Wang S.Z., Jia M.Q., Chen Z.X. // *J. Agric. Food Chem.* 2018. V. 66. P. 1242–1250.
101. Watson A., Opreško D., Young R.A., Hauschild V., King J., Bakshi K. // *Handbook of the Toxicology of Chemical Warfare Agents* / Ed Gupta R.C. Amsterdam: Academic Press; Elsevier, 2015. P. 111–130.
102. Deshpande L.S., Phillips K., Huang B., De Lorenzo R.J. // *Neurotoxicology*. 2014. V. 44. P. 352–357.
103. Reddy S.D., Reddy D.S. // *Epilepsia*. 2015. V. 56. P. 813–821.
104. Reddy S.D., Younus I., Clossen B.L., Reddy D.S. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2015. V. 353. P. 517–528.
105. Lotti M., Moretto A. // *Toxicol. Rev.* 2005. V. 24. P. 37–49.
106. Ченуп С. В. // *Токсикол. вестник*. 2010. № 3. С. 42–43.
107. de Araujo Furtado M., Rossetti F., Chanda S., Yourick D. // *Neurotoxicology*. 2012. V. 33. P. 1476–1490.
108. Goncharov N.V., Nadeev A.D., Jenkins R.O., Avdonin P.V. // *Oxid. Med. Cell Longev.* 2017. e9759735.
109. Oruch R., Pryme I.F., Engelsen B.A., Lund A. // *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2017. V. 13. P. 161–175.
110. Masson P., Lockridge O. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2010. V. 494. P. 107–120.
111. Bajaj P., Tripathy R.K., Aggarwal G., Pande A.H. // *Scientific World Journal*. 2014. e854391.
112. Kirby S.D., Norris J.R., Richard Smith J., Bahnson B.J., Cerasoli D.M. // *Chem. Biol. Interact.* 2013. V. 203. P. 181–185.
113. Lushchekina S.V., Schopfer L.M., Grigorenko B.L., Nemukhin A.V., Varfolomeev S.D., Lockridge O., Masson P. // *Front. Pharmacol.* 2018. V. 9. e211.
114. Ku T.H., Zhang T., Luo H., Yen T.M., Chen P.W., Han Y., Lo Y.H. // *Sensors (Basel)*. 2015. V. 15. P. 16281–16313.
115. Zhang C., Wang L., Tu Z., Sun X., He Q., Lei Z., Xu C., Liu Y., Zhang X., Yang J., Liu X., Xu Y. // *Biosens. Bioelectron.* 2014. V. 55. P. 216–219.
116. Belinskaia D.A., Avdonin P.V., Avdonin P.P., Jenkins R.O., Goncharov N.V. // *Comput. Biol. Chem.* 2019. V. 80. P. 452–462.
117. Белинская Д.А., Гончаров Н.В. // Доклады Международной конференции “Математическая биология и биоинформатика” / Лахно В.Д. Пушкино: ИМПБ РАН, 2018. e83.

Theoretical and Practical Aspects of Albumin Esterase Activity

D. A. Belinskaia*[#] and N. V. Goncharov*^{**}

[#]Phone: +7 (921) 580-69-19; e-mail: d_belinskaya@mail.ru

*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of Russian Academy of Sciences, pr. Toreza 44, Saint Petersburg, 194223 Russia

**Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, bld. 93 p.o. Kuz'molovsky, Leningrad region 188663, Russia.

Unlike many other plasma proteins, albumin is practically not glycosylated, and plays an important role in maintaining the colloidal-osmotic blood pressure, can bind and transport various molecules of endogenous and exogenous origin. Data on the enzymatic activity of albumin have been accumulated: pseudo-esterase (irreversible binding of the substrate to the protein) and true esterase (binding of the substrate to the active center of the protein with subsequent dissociation of the complex into enzyme and product). In toxicology, the problem of (pseudo)esterase activity of albumin in relation to organophosphates (OPs) is of the greatest interest. This review demonstrates the literature data and the results of our own research on protein esterase activity. The possibility of targeted modulation of albumin using the molecules capable of affecting its binding and esterase activity is considered. The prospects of practical application of some methods of influence on albumin in toxicology are discussed.

Keywords: albumin, esterases, organophosphates, allosteric modulation, adjuvant therapy



УДК 571.27

ТРЕХДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ: ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ *in vitro*

© 2020 г. Е. А. Василенко*., Е. Н. Горшкова*,
И. В. Астраханцева*, С. А. Недоспасов**, ***, В. В. Мохонов****

*Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
Россия, 603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23

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

***Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119991, Москва, ул. Ленинские Горы, 1

****ФБУН “Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной”,
Россия, 603950, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71

Поступила в редакцию 01.11.2019 г.

После доработки 08.11.2019 г.

Принята к публикации 12.12.2019 г.

Целью данной работы было изучение свойств новых трехдоменных антител, состоящих из двух доменов, специфичных к фактору некроза опухоли человека (hTNF), и третьего домена, отвечающего за связывание с клетками миелоидного ряда. Дополнительный hTNF-связывающий домен был введен в конструкцию антител для увеличения их биологической активности. Способность этих белков связывать hTNF на поверхности макрофагов и нейтрализовать его биологическую активность была исследована в экспериментах *in vitro*.

Ключевые слова: мультиспецифические антитела, наноантитела, фактор некроза опухоли

DOI: 10.31857/S013234232003032X

ВВЕДЕНИЕ

Мультиспецифические антитела на основе вариабельных доменов неканонических антител мозолоногих, так называемых наноантител (VNN), имеют большой потенциал в качестве диагностических и терапевтических препаратов для лечения заболеваний различной природы. Специфичность антител по отношению к двум и более типам молекул позволяет точно локализовать терапевтическую мишень, тем самым повысить эффективность борьбы с резистентными или быстро мутирующими штаммами вирусов, например, вирусом гриппа [1]. Кроме того, обеспечивая направленное связывание целевой молекулы (например, опухолевого маркера) и эффекторной клетки, можно повысить эффективность терапии онкологических заболеваний за счет активации механизмов клеточного лизиса [2]. Структура наноантител открывает широкие возможности для их форматирования путем слияния как идентичных, так и различных мономерных блоков для увеличения авидности или же сопутствующей блокировки нескольких непрерывающихся эпито-

пов [3]. Это позволяет увеличить эффективность мультивалентных комплексов по сравнению с моновалентными наноантителами [4, 5]. Так, например, перспективными для терапии аутоиммунных заболеваний могут быть биспецифические наноантитела, одновременно связывающие два различных провоспалительных цитокина, например, TNF и IL-17 [6] или IL-1 и IL-17A [7], что усиливает терапевтический эффект по сравнению с антителами против одного цитокина.

Помимо цитокинов мишенью для второй специфичности в составе мультиспецифичных конструкций могут быть различные рецепторы на клетках, участвующих в развитии воспалительного процесса [8], например, поверхностные молекулы клеток, обеспечивающих максимальный вклад в усиление воспалительного ответа в ходе развития того или иного заболевания. Ранее было показано, что основным источником провоспалительного цитокина фактора некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF) в модели аутоиммунного артрита являются миелоидные клетки, при этом подавление T-клеточного TNF приводило к усугублению заболевания. Плейотропные свойства данного цитокина, обеспечивающие как защитное, так и “патогенное” воздействие на функции орга-

Автор для связи: (тел.: +7 (831) 462-32-17; эл. почта: kat802@rambler.ru).

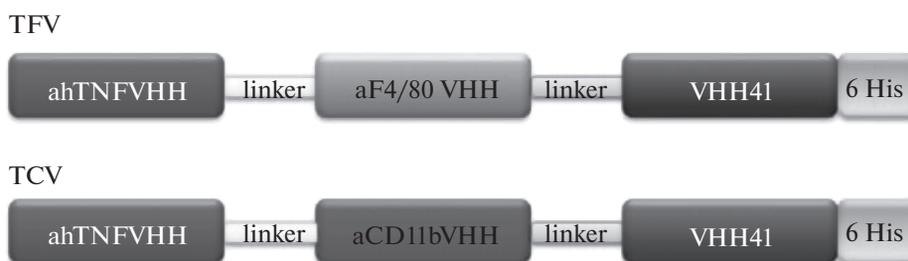


Рис. 1. Схема доменного состава биспецифических белков ahTNFVHH–aF4/80VHH–Vhh41 (TFV) и ahTNFVHH–aCD11bVHH–Vhh41 (TCV).

низма, легли в основу концепции о необходимости селективной нейтрализации TNF [9–11]. На ее основе были разработаны биспецифические антитела, позволяющие селективно нейтрализовать TNF из определенных клеточных источников, не препятствуя при этом реализации защитных функций данного цитокина, тем самым, увеличивая эффективность анти-TNF-терапии. Так, созданные на основе наноантител биспецифические агенты, связывающие и блокирующие человеческий TNF на поверхности миелоидных клеток за счет взаимодействия с маркерной молекулой F4/80, показали высокую эффективность на культуре макрофагов *in vitro* и в модели острого септического шока *in vivo* на гуманизированных по гену TNF мышцах [12]. Однако перенос данной модели на человека осложнен тем фактом, что человеческий ортолог F4/80 (EMR1) экспрессируется не только моноцитами/макрофагами, но в большей степени гранулоцитарными клетками [13]. Поэтому важной задачей для создания новых биспецифических антител является поиск дополнительных молекул-мишеней на миелоидных клетках. В качестве одной из таких молекул-мишеней была рассмотрена молекула CD11b [14], ортолог которой (Mac-1) характерен для популяции моноцитов/макрофагов человека и не продуцируется эозинофилами. Однако ранее полученные анти-TNF антитела, способные связываться с молекулой CD11b, обладали более низкой эффективностью нейтрализации TNF по сравнению с анти-F4/80 VHH-содержащими белками [15], поэтому для увеличения эффективности биспецифических антител в настоящей статье мы рассмотрели возможность введения в их доменный состав дополнительного TNF-узнающего модуля (Vhh41), связывающего TNF с высокой аффинностью [16]. Таким образом, нами были созданы и изучены трехдоменные антитела, обладающие специфичностью в отношении TNF за счет наличия двух различных анти-TNF VHH-доменов: ahTNFVHH [4] и Vhh41 [16], а также в отношении поверхностных маркеров миелоидных клеток F4/80 и CD11b за счет наличия aF4/80 VHH, либо aCD11bVHH доменов соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы были сконструированы генетические конструкции для продукции трехдоменных антител TFV и TCV в бактериальной системе, структура которых схематически представлена на рис. 1. Дизайн генетических конструкций и получение белков подробно описаны в разделе “Экспериментальная часть”. Анализ гомогенности полученных белков проводили с помощью денатурирующего электрофореза в ПААГ (рис. 2а, 2б) и вестерн-блоттинга (рис. 2в).

Эффективность связывания полученных трехдоменных антител с молекулами F4/80 и CD11b на поверхности макрофагов оценивали с помощью метода проточной цитофлуориметрии. В эксперименте использовали макрофаги, полученные из костного мозга гуманизированных по гену TNF мышей, у которых человеческий TNF (hTNF) продуцируется вместо мышинового. В ходе эксперимента анализировали уровень флуоресцентного сигнала от макрофагов, проинкубированных с трех- или с аналогичными им двухдоменными белками, затем с рекомбинантным hTNF, и, наконец, с детектирующими флуоресцентно-мечеными антителами к hTNF. Интенсивность флуоресцентного сигнала была пропорциональна количеству макрофагов, связанных с белками-блокаторами. Таким образом, уровень сигнала косвенно характеризовал эффективность связывания белков с ФНО и поверхностными белками на макрофагах. Было показано, что введение дополнительного модуля способствует повышению эффективности взаимодействия антител TFV и TCV с макрофагами по сравнению с MYSTI-2 и MYSTI-3, в 10 и 6 раз соответственно (рис. 3).

Способность трехдоменных антител удерживать на поверхности мышинных макрофагов продуцируемый ими TNF оценивали, анализируя количество свободного TNF в культуральной среде клеток методом иммуноферментного анализа. Эффективность удержания цитокина связанными с клетками биспецифическими антителами в данном эксперименте обратно пропорциональна его уровню в супернатанте (рис. 4). В случае контрольных образцов (культуральной среды макро-

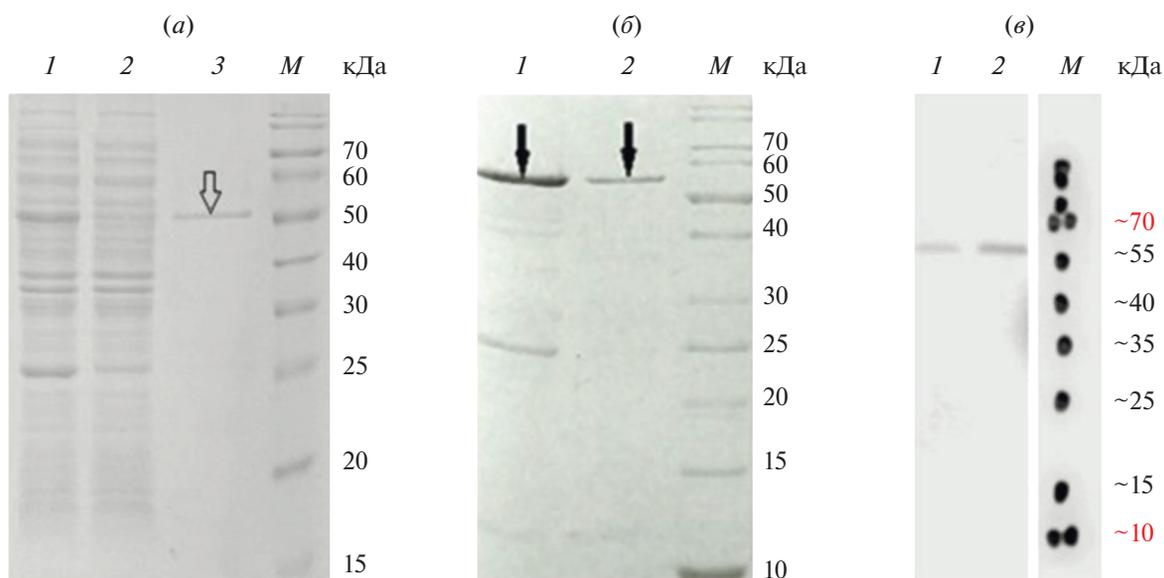


Рис. 2. Примеры типичной электрофореграммы (SDS-ПААГ) и вестерн-блоттинга трехдоменных антител: *M* – маркер молекулярных масс (Page Ruler Unstained Protein Ladder, кат. № 26614, Thermo Fisher Scientific). *a* – образцы с разных стадий очистки белков на примере TFV методом металл-хелатной аффинной хроматографии: 1 – лизат клеток, 2 – фракция не связавшихся в ходе хроматографии белков, 3 – элюируемый белок TFV. *б* – образцы очищенных белков TCV (дорожка 1) и TFV (дорожка 2). *в* – вестерн блоттинг образцов белков TFV (дорожка 1) и TCV (дорожка 2).

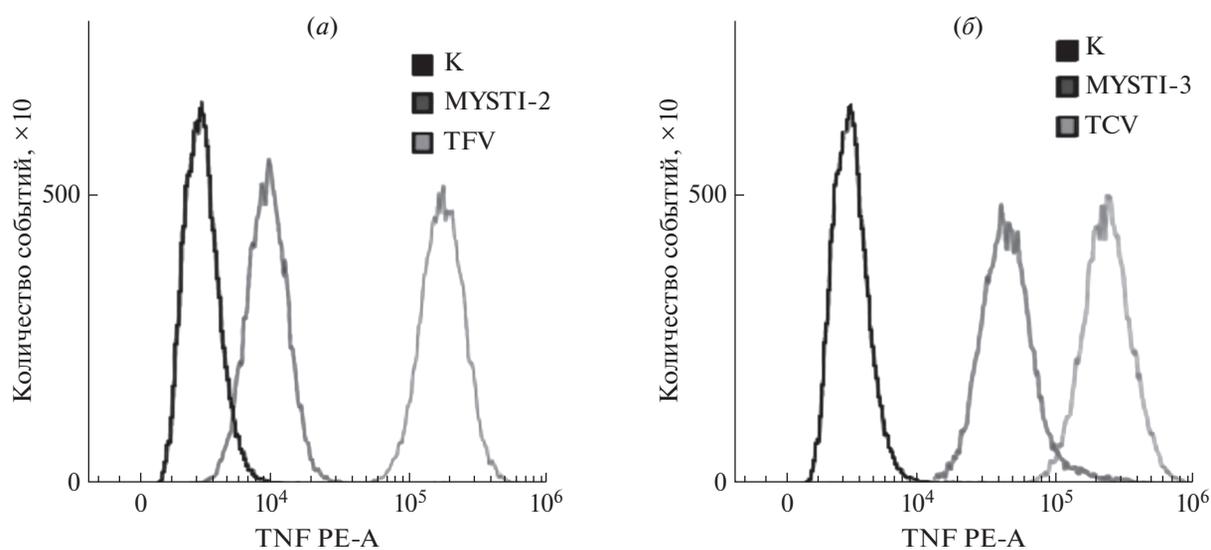


Рис. 3. Эффективность связывания биспецифических белков-блокаторов TNF с макрофагами гуманизированных по гену TNF (huTNFK1) мышей. Уровень флуоресцентного сигнала пропорционален количеству связавшихся с клетками анализируемых белков. Сравнительный анализ флуоресценции клеток, инкубированных с: TFV или MYSTI-2 (*a*), TCV или MYSTI-3 (*б*). К – уровень автофлуоресцентного сигнала от клеток, обработанных мечеными PE-антителами против человеческого TNF.

фагов без добавления биспецифических антител) при инкубации с липополисахаридом происходило резкое увеличение концентрации TNF в среде (рис. 4). Для всех исследуемых белков наблюдался более низкий уровень TNF по сравнению с контролем, причем количество TNF в среде повышалось с понижением концентрации биспецифических белков (рис. 4б). Кроме того, трехдо-

менные блокаторы TNF оказались способны удерживать этот цитокин на поверхности макрофагов с эффективностью, сравнимой с эффективностью двухдоменного белка MYSTI-2 и превышающей эффективность белка MYSTI-3.

Биологическую активность белков *in vitro* исследовали в ходе цитотоксического (MTT) теста

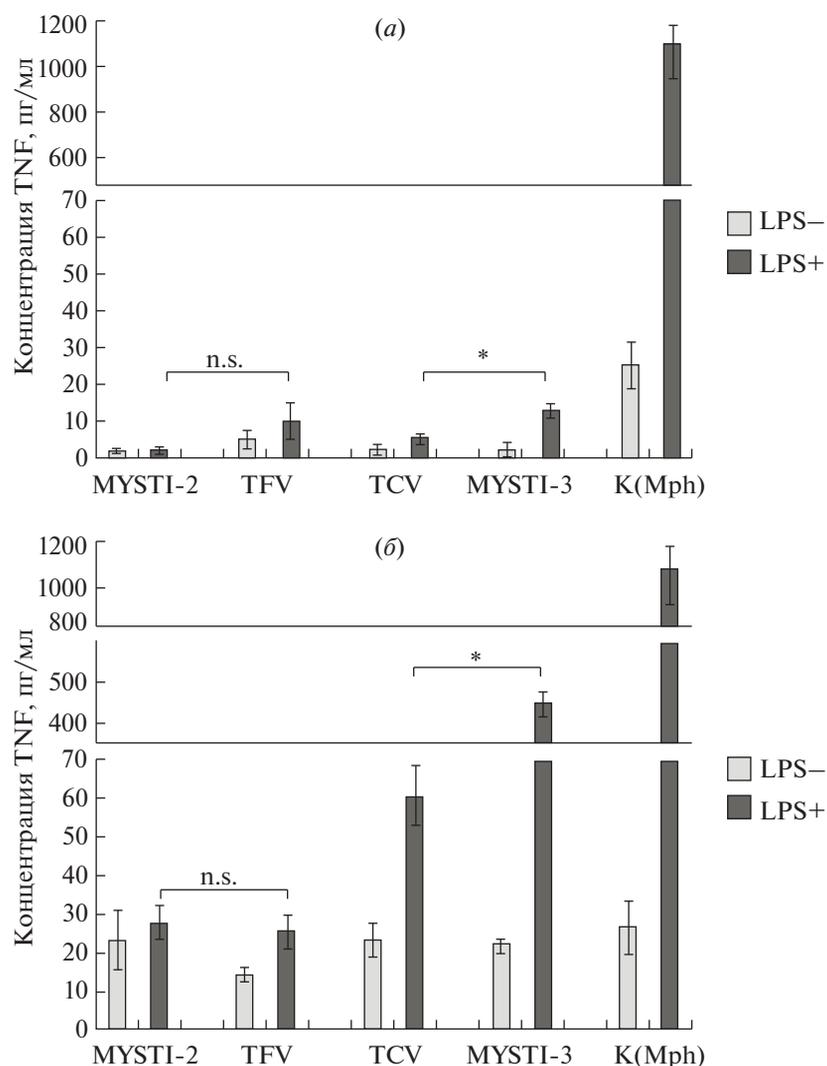


Рис. 4. Сравнение количества свободного TNF в культуральной среде макрофагов, проинкубированных с 1 мкМ (а) и 0.25 мкМ (б) биспецифических белков и липополисахаридом. На диаграмме представлены средние значения со стандартными отклонениями. * – статистически значимые отличия ($p < 0.05$), n.s. – статистически не значимые отличия.

на клетках линии WENI-164 (рис. 5). Наиболее показательными характеристиками биологической активности в данном эксперименте являются значения IC_{50} , которые для белков MYSTI-3 и TCV составили: 3.451 и 0.536 нМ, а для MYSTI-2 и TFV – 4.5 и 21.9 нМ соответственно. Таким образом, эффективность трехдоменного белка, содержащего $\alpha CD11b$ VHH-домен, оказалась выше эффективности его двухдоменного аналога.

Таким образом, введение дополнительного TNF-узнающего модуля (Vhh41) в доменный состав биспецифических белков позволило существенно увеличить эффективность удержания фактора некроза опухоли на поверхности макрофагов гуманизированных мышей, и, кроме того, в составе anti-CD11b VHH-содержащего антитела увеличило TNF-нейтрализующий потенциал мультиспецифической конструкции по сравнению с его

двухдоменным аналогом MYSTI-3 в тестах *in vitro*.

В целом, результаты исследования показали, что идея конструирования биспецифических антител с увеличенным количеством TNF-связывающих участков является перспективной: эта особенность трехдоменных антител впоследствии может быть использована для создания прототипов лекарств для терапии воспалительных заболеваний, связанных с гиперэкспрессией данного цитокина.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. Штамм DH5 α *E. coli* с генотипом F⁻ ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r_K⁻, m_K⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1

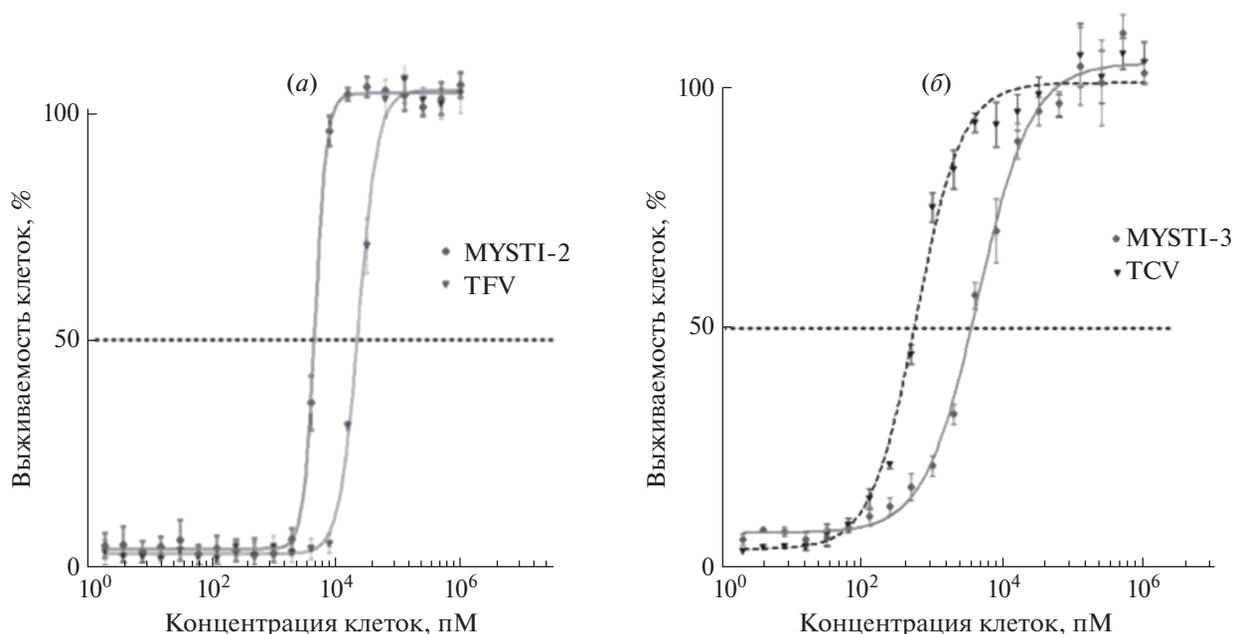


Рис. 5. Графики зависимости выживаемости клеток WENI-164 от концентрации биспецифических антител, нейтрализующих действие экзогенного TNF в ходе цитотоксического (МТТ) теста. Сравнительный анализ TNF-нейтрализующей активности белков TFV и MYSTI-2 (а), а также белков TCv и MYSTI-3 (б).

gy-rA96 relA1, Rosetta2(DE3) Δ SlyD/X *E. coli* с генотипом F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm Δ SlyD/X (DE3) pRARE2 (Cam^R), плазмидный вектор pET28b+ (Novagen), бактотриптон (Amresco, США); хлорид натрия (Helicon, Россия); хлорид никеля (Helicon, Россия); дрожжевой экстракт (Amresco, США); бакто-агар "Difco" (США); агароза (Helicon, Россия); β -меркаптоэтанол (Helicon, Россия); Triton X-100 (Panreac Applichem, Германия); акриламид и метиленбисакриламид (Helicon, Россия); ИПТГ (Helicon, Россия); ЭДТА (Serva, Германия); SDS (Panreac Applichem, Германия); имидазол (Panreac Applichem, Германия); диметилсульфоксид (Panreac Applichem, Германия); персульфат аммония (Panreac Applichem, Германия); TEMED (Panreac Applichem, Германия); глицерин – "PanReac" (Германия); канамицин (ПАО "Биохимик", Россия); хлорамфеникол (Sigma-Aldrich, США); смола для металл-аффинной хроматографии – "Ni-NTA Superflow" фирмы "GE Healthcare" (Великобритания); Tris (Amresco, США); HEPES (Amresco, США); L-аргинин (Диаэм), гуанидина гидрохлорид (Amresco, США); глутатион окисленный (Amresco, США); глутатион восстановленный (Amresco, США); бычий сывороточный альбумин (Panreac Applichem, Германия); сухое обезжиренное молоко (Nonfat dried milk powder, Panreac Applichem); наборы стандартов молекулярного веса ДНК ("Thermo Scientific", США); наборы стандартов молекулярного веса белков ("Thermo Scientific", США); набор для проведения клонирования по методу

Гибсона Gibson assembly cloning kit (NEB), набор реактивов для секвенирования: BigDyeTM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit ("Thermo Scientific", США); набор для иммуноферментного анализа Human TNF α ELISA Ready-SET-Go! (eBioscience, США); anti-4His-HRP антитела (MACS, Miltenyi Biotec, Германия); наборы West Dura Extended Duration Substrate (SuperSignal, США) и ECL Western Blotting Substrate (Promega, США); DPBS (1 \times) (Gibco), RPMI Medium 1640 (1 \times) (Gibco), DMEM (1 \times) (Gibco), HS (horse serum, Gibco), L-глутамин (ПанЭко, Россия), смесь антибиотиков пенициллин/стрептомицин (ПанЭко, Россия).

Дизайн генетических конструкций TCv и TFV, кодирующих блокаторы TNF с трехдоменной структурой, осуществляли с использованием пакета программ DNA Star Lasergene (DNA Star Madison, WI, USA) (рис. 1). Получение ДНК-конструкций целевых белков проводили с помощью стандартных методов молекулярной биологии. Экспрессионные плазмиды были получены на основе вектора pET28b (Novagene). Последовательности олигонуклеотидных праймеров (табл. 1) были синтезированы компанией ООО "ДНК-синтез" (г. Москва). Анализ последовательностей ДНК отдельных клонов клеток, трансформированных продуктом реакции, проводили с помощью электрофореза в 1.5% агарозном геле с последующим секвенированием плазмидной ДНК (ABI Prism 310 Genetic Analyzer). Полученные генетические конструкции использовали для транс-

TNF- α (Biolegend, США) (30 мин, 4°C). Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре Cytotflex S (Beckman Coulter, США) с использованием программного обеспечения CytExpert 2.0 (Beckman Coulter, США).

Оценка удержания TNF активированными макрофагами. Макрофаги, полученные описанным выше методом, культивировали в 96-луночных планшетах (Corning® 96-Well Microplates, Corning, США) из расчета 10^5 клеток на лунку и инкубировали в течение ночи при 37°C и 5% CO₂. После промывания полной средой DMEM клетки инкубировали с анализируемыми белками (2 мкМ) или DMEM (30 мин, 37°C, 5% CO₂) в качестве контроля. Затем клетки стимулировали (4 ч, 37°C, 5% CO₂) липополисахаридом (LPS, Sigma-Aldrich, L2630) в дозе 100 нг/мл для продукции клетками фактора некроза опухоли (TNF). После этого супернатант переносили в лунки 96-луночного планшета (Corning Costar, Corning, США) и измеряли концентрацию TNF с помощью набора HumanTNF- α ELISAREady-SET-Go® (eBioscience, США) согласно протоколу производителя.

Цитотоксический МТТ-тест. Исследование TNF-ингибирующей активности полученных рекомбинантных белков проводили с помощью цитотоксического МТТ-теста на клеточной линии WENI-164, чувствительной к действию человеческого TNF [20]. Клетки переносили в 96-луночные культуральные планшеты (Corning® 3788 96-Well Polystyrene Microplates, Corning, США) из расчета 2×10^3 клеток на лунку. Рекомбинантный hTNF добавляли в концентрации 100 ед./мл, исследуемые антитела – в серийных разведениях 1 мМ–2 пМ. После 24 ч инкубации добавляли 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид (МТТ) (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 4 мкг/мл и инкубировали в течение 4 ч, после чего кристаллы формазана растворяли в 10% (мас./об.) SDS в ДМСО с добавлением уксусной кислоты, и измеряли оптическую плотность (OD) при 570 нм с помощью спектрофотометра Multiskan EX (ThermoFisher Scientific, США). Далее рассчитывали процент живых клеток и отображали полученные значения на кривых нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения Prism 5 (GraphPad, США).

Статистическая обработка результатов. Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью U-критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия между группами при уровне значимости $p < 0.05$.

БЛАГОДАРНОСТИ

Часть работ по секвенированию была выполнена на оборудовании ЦКП “Геном” ИМБ РАН (http://www.eimb.ru/ru1/ckp/ccu_genome_c.php).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данная работа была выполнена при поддержке государственного задания (проект 6.6379.2017/8.9), при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 17-04-01478, № 17-04-01137 и РНФ № 19-75030032.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе были соблюдены международные принципы ухода и использования животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ibanez L.I., de Filette M., Hultberg A., Verrips T., Temperton N., Weiss R.A., Vandeveld W., Schepens B., Vanlandschoot P., Saelens X. // J. Infect. Dis. 2011. V. 203(8). P. 1063–1072.
2. Wu J., Fu J., Zhang M., Liu D. // J. Hematol. Oncol. 2015. V. 8(1). P. 96.
3. Василенко Е.А., Мохонов В.В., Горшкова Е.Н., Астраханцева И.В. // Молекулярная биология. 2018. Т. 52(3). С. 380–393. [Vasilenko E.A., Mokhonov V.V., Gorshkova E.N., Астраханцева I.V. // Molecular Biology. 2018. V. 52(3). P. 323–334.]
4. Coppieters K., Dreier T., Silence K., de Haard H., Lauwereys M., Casteels P., Beirnaert E., Jonckheere H., Van de Wiele C., Saelens L., Hostens J., Revets H., Remaut E., Elewaut D., Rottiers P. // Arthritis & Rheumatism. 2006. V. 54. P. 1856–1866.
5. Bradley M.E., Dombrecht B., Manini J., Willis J., Vlerick D., De Taeye S., Van den Heede K., Roobrouck A., Grot E., Kent T.C., Laeremans T., Steffensen S., Van Heeke G., Brown Z., Charlton S.J., Cromie K.D. // Molecular Pharmacology. 2015. V. 87. P. 251–262.
6. Qi J., Kan F., Ye X., Guo M., Zhang Y., Ren G., Li D. // International Immunopharmacology. 2012. V. 14(4). P. 770–778.
7. Liu M., Xie M., Jiang S., Liu G., Li L., Liu D., Yang X. // J. Biotechnology. 2014. V. 186. P. 1–12.
8. Kruglov A.A., Lampropoulou V., Fillatreau S., Nedospasov S.A. // J. Immunology. 2011. V. 187(11). P. 5660–5670. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100663>
9. Grivennikov S.I., Tumanov A.V., Liepinsh D.J., Kruglov A.A., Marakusha B.I., Shakhov A.N., Murakami T., Drutskaya L.N., Förster I., Clausen B.E., Tessarollo L., Ryffel B., Kuprash D.V., Nedospasov S.A. // Immunity. 2005. V. 22. P. 93–104.
10. Winsauer C., Kruglov A.A., Chashchina A.A., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A. // Cytokine Growth Factor Rev. 2014. V. 25. P. 115–123.
11. Ефимов Г.А., Вахрушева О.А., Сазыкин А.Ю., Муфазалов И.А., Круглов А.А., Купраш Д.В., Недоспасов С.А. // Российский иммунологический журнал. 2009. Т. 3(12). С. 23–29. [Efimov G.A., Vakhrusheva O.A., Sazykin A.Y., Mufazalov I.A., Kruglov A.A.,

- Kuprash D.V., Nedospasov S.A.* // Russian Journal of Immunology. 2009. V. 3(12). P. 23–29.]
12. *Efimov G.A., Kruglov A.A., Khlopchatnikova Z.V., Rozov F.N., Mokhonov V.V., Rose-John S., Scheller J., Gordon S., Stacey M., Drutskaya M.S., Tillib S.V., Nedospasov S.A.* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2016. V. 113(11). P. 3006–3011.
 13. *Hatmann J., Koning N., Pouwels W., Ulfman L.H., van Eijk M., Stacey M., Lin H.H., Gordon S., Kwakkenbos M.J.* // Eur. J. Immunol. 2007. V. 37(10). P. 2797–2802.
 14. *Мохонов В.В., Шилов Е.С., Корнеев К.В., Атретханы К.-С.Н., Горшкова Е.А., Жданова А.А., Василенко Е.А., Горяинова О.С., Купраш Д.В., Тиллиб С.В., Друцкая М.С., Ефимов Г.А., Недоспасов С.А.* // Российский иммунологический журнал. 2016. Т. 10(19). С. 378–385. [*Mokhonov V.V., Shilov E.S., Korneev K.V., Atrtikhany K.-S.N., Gorshkova E.A., Zhdanova A.A., Vasilenko E.A., Goryainova O.S., Kuprash D.V., Tillib S.V., Drutskaya M.S., Efimov G.A., Nedospasov S.A.* // Russian Journal of Immunology. 2016. V. 10(19). P. 378–385.]
 15. *Laemmli U.* // Nature 1970. V. 227. 680e685.
 16. *Ефимов Г.А., Хлопчатникова З.В., Сазыкин А.Ю., Друцкая М.С., Круглов А.А., Шилов Е.С., Кучмий А.А., Недоспасов С.А., Тиллиб С.В.* // Российский иммунологический журнал. 2012. Т. 6(15). С. 337–345. [*Efimov G.A., Khlopchatnikova Z.V., Sazikin A.Yu., Drutskaya M.S., Kruglov A.A., Shilov E.S., Kuchmiy A.A., Nedospasov S.A., Tillib S.B.* // Russian Journal of Immunology. 2012. V. 6(15). P. 337–345.]
 17. *Mokhonov V.V., Vasilenko E.A., Gorshkova E.N., Astrakhantseva I.V., Novikov D.V., Novikov V.V.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2018. V. 499(4). P. 967–972. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.029>
 18. *Olleros M.L., Chavez-Galan L., Segueni N., Bourigault M.L., Vesin D., Kruglov A.A., Drutskaya M.S., Bisig R., Ehlers S., Aly S., Walter K., Kuprash D.V., Chouchkova M., Kozlov S.V., Erard F., Ryffel B., Quesniaux V.F., Nedospasov S.A., Garcia I.* // Infect. Immun. 2015. V. 83(9). P. 3612–3623.
 19. *Atrtikhany K.N., Mufazalov I.A., Dunst J., Kuchmiy A., Gogoleva V.S., Andruszewski D., Drutskaya M.S., Faustman D.L., Schwabenland M., Prinz M., Kruglov A.A., Waisman A., Nedospasov S.A.* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2018. V. 115(51). P. 13051–13056. <https://doi.org/10.1073/pnas.1807499115>
 20. *Espevik T., Nissen-Meyer J.* // J. Immunol. Methods. 1986. V. 95. P. 99–105.

Three-Domain Antibodies against Tumor Necrosis Factor: Biological Activity *in vitro*

E. A. Vasilenko*., #, E. N. Gorshkova*, I. V. Astrakhantseva*, S. A. Nedospasov, ***, and V. V. Mokhonov******

Phone: + 7 (831) 462-32-17; e-mail: kat802@rambler.ru

*Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, prosp. Gagarina 23, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

**Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

***Lomonosov Moscow State University, ul. Leninskie Gory 1, Moscow, 119991 Russia

****Blokchina Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Nizhny Novgorod, ul. Malaya Yamskaya 71, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

The aim of this work was to evaluate novel three-domain antibodies consisting of two domains specific for human tumor necrosis factor (hTNF), and of the third domain responsible for binding to myeloid cells. The additional hTNF-binding domain should serve to increase the biological activity of new antibodies. Capacity of these proteins to bind hTNF on the macrophage surface and to neutralize its biological activity *in vitro* was assessed.

Keywords: multispecific antibodies, nanobodies, tumor necrosis factor



ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ВОАКАМИНА ИЗ *Voacanga africana* Stapf ПО ОТНОШЕНИЮ К ВИЧ НА ОСНОВАНИИ ДАННЫХ ППР ВИЗУАЛИЗАЦИИ¹

© 2020 Н. Х. Li*, **, #, R. Q. Liu***, H. M. Zhang**, Z. X. Cao**,
L. X. Zhu**, Y. Y. Li*, W. J. Ding***, Y. H. Chen***, #, and Y. Deng***

*Institute of Innovation, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, 610075 China

**Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine of the Ministry of Education, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, 610075 China

***Basic Medical College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, 610075 China

Поступила в редакцию 08.07.2019 г.

После доработки 24.11.2019 г.

Принята к публикации 15.12.2019 г.

СПИД/ВИЧ представляет угрозу жизни людей и серьезную проблему для здравоохранения, которая требует поиска новых противовирусных препаратов. Бис-индоловый алкалоид воакамин был выделен ранее из *Voacanga africana* Stapf. В данной работе химические сдвиги воакамина в спектрах ¹H и ¹³C ЯМР были уточнены с помощью 1D и 2D ЯМР. Абсолютная конфигурация воакамина была подтверждена методом рентгеноструктурного анализа (излучение CuK_α). Противовирусная активность по отношению к ВИЧ воакамина была исследована *in vitro* методом определения сродства к белку оболочки вируса gp120 с помощью ППР визуализации. Результаты исследования подтверждают, что воакамин является перспективным природным агентом против СПИДа/ВИЧ.

Ключевые слова: воакамин, *Voacanga africana* Stapf, gp120, анти-ВИЧ

DOI: 10.31857/S0132342320030197

¹ Полный текст статьи печатается в английской версии журнала.

Автор для связи: (эл. почта: tcmresearcher@163.com; dengyun2000@hotmail.com).



УДК 577.151.35:577.113.4:577.2.08

ЭФФЕКТ ПРОСКАЛЬЗЫВАНИЯ В РЕАКЦИИ ЭЛОНГАЦИИ ПРАЙМЕРА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ 2'-ДЕЗОКСИУРИДИНТРИФОСФАТОВ

© 2020 г. В. А. Василисков**, В. Е. Шершов**, Р. А. Мифтахов**,
В. Е. Кузнецова**, С. П. Радько*, ***, А. В. Лисица***, С. А. Лапа**,
С. А. Суржиков**, Э. Н. Тимофеев**, А. С. Заседателей**, А. В. Чудинов*, **, #

*ООО «ИБМХ-ЭкоБиоФарм», Россия, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8

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

***Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича Российской академии медицинских наук, Россия, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8

Поступила в редакцию 01.11.2019 г.

После доработки 29.11.2019 г.

Принята к публикации 10.12.2019 г.

Выявлен эффект проскальзывания праймерной цепи в реакции элонгации праймера на гомополимерной матрице при использовании модифицированных аналогов dUTP. Эффект наблюдается при использовании Vent(exo-) ДНК полимеразы и в заметной степени подавляется добавлением к реакционной смеси природных нуклеотидов dATP (2'-дезоксиаденозинтрифосфат), dCTP (2'-дезоксцитидинтрифосфат) и dGTP (2'-дезоксигуанозинтрифосфат).

Ключевые слова: модифицированные нуклеотиды, реакция элонгации праймера, проскальзывание

DOI: 10.31857/S0132342320030331

ВВЕДЕНИЕ

Модифицированные 2'-дезоксинуклеозид трифосфаты нашли широкое применение при отборе высокоаффинных ДНК аптамеров методом SELEX [1]. В качестве модифицированных нуклеотидов чаще всего используют аналоги 2'-дезоксидинтрифосфата (dUTP), содержащие модификацию в положении 5 урацила. Эффективность аналога в качестве субстрата ДНК полимераз оценивается, как правило, в реакции элонгации праймера.

Одной из основных характеристик модифицированного субстрата является его способность к многократному встраиванию с образованием полностью модифицированного участка. Для оценки этого параметра в реакции элонгации праймера используют ДНК-матрицу, содержащую гомополимерный участок типа (dA)_n. Однако, как пока-

зано в настоящей работе, при использовании гомополимерной матрицы интерпретация результатов может осложняться из-за эффекта проскальзывания цепи (slippage). При исследовании субстратных характеристик новых модифицированных нуклеотидов на основе амидов аминоксил-дUTP мы обнаружили выраженный эффект проскальзывания праймерной цепи.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы использовали олигонуклеотидную модель, содержащую в матричной цепи фрагмент dA₂₀ (рис. 1, а). Объектами настоящего исследования были неприродные аналоги dUTP (рис. 1, б), синтезированные нами ранее [2]. При проведении реакции удлинения праймера Vent(exo-) ДНК полимеразой с аналогами dUTP обнаружен эффект проскальзывания модифицированной цепи (рис. 2). Для dUTP (**1a**) максимальная длина модифицированной цепи превышала длину матрицы на 15–16 нуклеотидов. Столь выраженный эффект наблюдался лишь при условии добавления к реакционной смеси только неприродного нуклеотида. Введение в реакцию дополнительно смеси dATP, dCTP и dGTP ограничивает число избыточных нуклеотидов до 6–7 (рис. 2б).

Сокращения: dUTP – 2'-дезоксидинтрифосфат; dTTP – 2'-дезокситимидинтрифосфат; dATP – 2'-дезоксиаденозинтрифосфат; dCTP – 2'-дезоксцитидинтрифосфат; dGTP – 2'-дезоксигуанозинтрифосфат; SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) – систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения.

Автор для связи: (тел.: +7 (499) 135-98-00; факс +7 (495) 135-14-05; эл. почта: chud@eimb.ru).

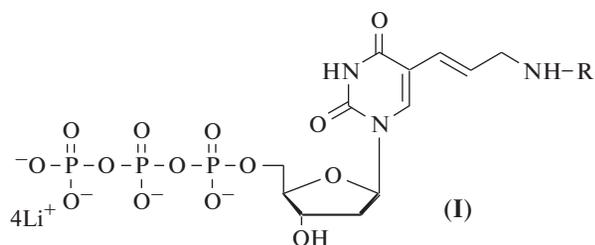


Рис. 1. Строение модифицированных 2'-дезоксидеозин-5'-трифосфатов (I): (а) $R = C_2H_5$; (б) $R = n-C_3H_7$; (в) $R = n-C_4H_9$, использованных в реакции элонгации праймера.

Несколько менее выраженный эффект проскальзывания наблюдался для двух других нуклеотидов (Iб, Iв). Природный dTTP достраивает праймер до размера матрицы с небольшой примесью $N + 1$ продукта в присутствии Taq ДНК полимеразы. Однако, при использовании Vent(exo-) полимеразы для природного нуклеотида также наблюдается заметный эффект проскальзывания.

Проскальзывание цепей при репликации часто наблюдается на микросателлитных участках ДНК, содержащих короткие повторы (1–6 п.о.). Это явление лежит в основе механизма возникновения коротких *indel* мутаций (insertions/dele-

tions). Исследования показывают, что увеличение длины повторяемого фрагмента или уменьшение количества повторов снижают вероятность проявления эффекта [3]. Важным фактором, способствующим проявлению проскальзывания, является стабилизация выпетленных конфигураций ДНК, способных к дальнейшей элонгации. Стабилизация может осуществляться за счет образования выпетливаний с классическими парами оснований, мисматчами или с неканонической структурой [4–6]. Эффект проскальзывания цепи для неприродных аналогов не обнаружен нами в литературе. Структура модифицированных нуклеотидов I (а–в) допускает участие амидных фрагментов в стабилизации выпетливаний на неприродном участке цепи. Обнаруженный эффект проявляется в условиях, заметно отличающихся от условий отбора аптамеров. В силу этого предполагается, что он не оказывает заметного влияния на результаты селекции с использованием неприродных трифосфатов. Однако проскальзывание может заметно исказить результаты оценки субстратной эффективности неприродных нуклеотидов, особенно в случае малоэффективных субстратов, когда наблюдаемая максимальная длина неприродной цепи не превышает размера матрицы.

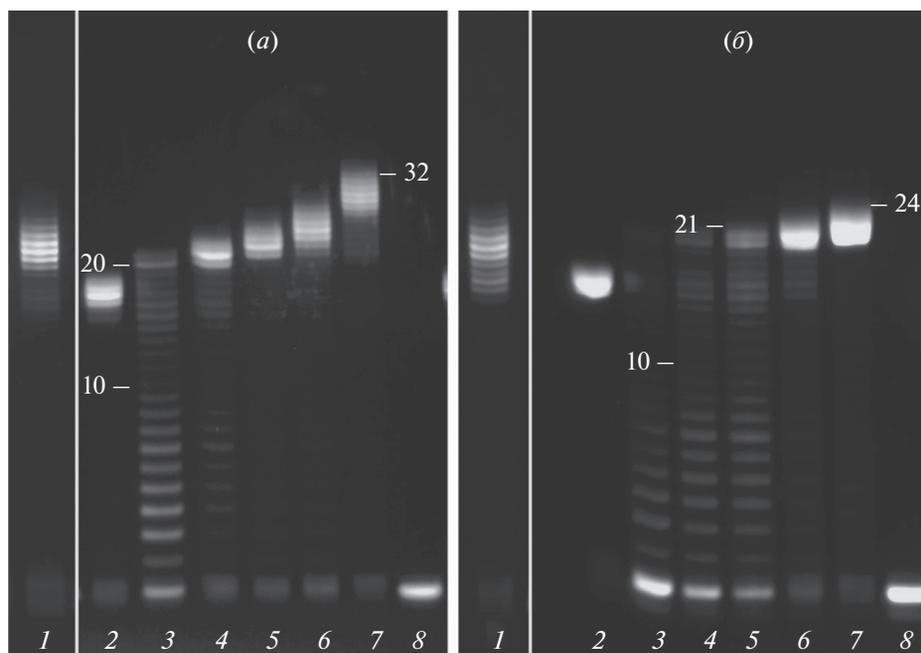


Рис. 2. Электрофоретическое разделение продуктов реакции элонгации праймера с dUTP (Ia) с Vent(exo-) ДНК-полимеразой при добавлении только модифицированного нуклеотида (а) или смеси модифицированного нуклеотида с dATP, dCTP и dGTP (б). Анализ выполнен в денатурирующем полиакриламидном геле (20%) при 50°C. Дорожки 1 и 2 – контроли с dTTP и Vent(exo-) (3 ч) и Taq (1 ч) ДНК полимеразой соответственно. Дорожки (3–7) соответствуют времени проведения реакции 10 с, 1 мин, 5 мин, 30 мин и 3 ч. Дорожка 8 – праймер. Цифрами отмечена разница длин выбранного фрагмента и праймера. Модифицированные цепи отличаются меньшей подвижностью при электрофорезе по сравнению с природной ДНК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Реакцию достраивания праймера проводили с использованием матрицы М и праймера А (приведены последовательности 5'-3'): (М): (А)₂₀-TTG-TCA-CTC-AGA-CCA-ACT-CCC-T; (Р): Су3-А-АСА-GTG-AGT-CTG-GTT-GAG-GGA. Реакцию элонгации праймера проводили в реакционной смеси (25 мкл), содержащей 4 мкМ праймера, 4 мкМ матрицы, модифицированный dUTP (**Ша-г**) в концентрации 200 мкМ и Vent(exo-) ДНК-полимеразу (НЕВ, США) в количестве 5 ед. акт. в буфере ThermoPol™ при температуре 72°C. Время элонгации варьировали от 10 с до 3 ч. Продукт реакции разделяли электрофорезом в денатурирующих условиях. Детекцию проводили в диапазоне флуоресценции красителя Су3 с возбуждением при 535 нм и регистрацией при 580 нм.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы" (соглашение № 14.576.21.0096, уникальный идентификатор проекта RFMEFI57617X0096).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lapa S.A., Chudinov A.V., Timofeev E.N. // Mol. Biotechnology. 2016. V. 58. P. 79–92.
2. Василисков В.А., Лана С.А., Кузнецова В.Е., Суржи-ков С.А., Шершов В.Е., Спицын М.А., Гусейнов Т.О., Мифтахов Р.А., Заседателева О.А., Лисица А.В., Радко С.П., Заседателев А.С., Тимофеев Э.Н., Чудинов А.В. // Биоорг. хим. 2019. Т. 45. С. 446–448. [Vasiliskov V.A., Lapa S.A., Kuznetsova V.E., Surzhikov S.A., Shershov V.E., Spitsyn M.A., Guseinov T.O., Miftahov R.A., Zasedateleva O.A., Lisitsa A.V., Radko S.P., Zasedatelev A.S., Timofeev E.N., Chudinov A.V. // Rus. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. p. 221–223.]
3. Liljegren M.M., de Muinck E.J., Trosvik P. // PLoS One. 2016. V. 11. P. e0159232.
4. Lo Y.-S., Tseng W.-H., Chuang C.-Y., Hou M.-H. // Nucl. Acids Res. 2013. V. 41. P. 4284–4294.
5. Hou M.-H., Robinson H., Gao Y.-G., Wang A.H.J. // Nucl. Acids Res. 2002. V. 30. P. 4910–4917.
6. Edwards S.F., Sirito M., Krahe R., Sinden R.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 3270–3275.
7. Huang T.Y., Chang C.K., Kao Y.F., Chin C.H., Ni C.W., Hsu H.Y., Hu N.J., Hsieh L.C., Chou S.H., Lee I.R., Hou M.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 114. P. 9535–9540.

Slippage of the Primer Strand in Primer Extension Reaction with Modified 2'-Deoxyuridine Triphosphates

V. A. Vasiliskov**, V. E. Shershov**, R. A. Miftahov**,
V. E. Kuznetsova**, S. P. Radko*, ***, A. V. Lisitsa***, S. A. Lapa**,
S. A. Surzhikov**, E. N. Timofeev**, A. C. Zasedatelev**, and A. V. Chudinov*, **, #

#Phone: +7 (499) 135-98-00; fax: +7 (495) 135-14-05; e-mail: chud@eimb.ru

*IBMC-EcoBioPharm Ltd., ul. Pogodinskaya 10, Moscow, 119121 Russia

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

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

An effect of primer strand slippage was observed in primer extension reaction due to replacement of thymidine triphosphate for modified analogues of dUTP. The effect was detected when using Vent(exo-) DNA polymerase. It is notably suppressed by adding to reaction mixture the natural nucleotides dATP, dCTP, and dGTP.

Keywords: modified nucleotides, primer extension, slippage



УДК 615.218.8

ПРОИЗВОДНЫЕ 5-(ПЕРИЛЕН-3-ИЛЭТИНИЛ)УРАЦИЛА ИНГИБИРУЮТ РЕПРОДУКЦИЮ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСОВ

© 2020 г. Ю. В. Николаева*, Е. А. Улащик**, Е. В. Чекерда*, А. В. Галочкина*,
Н. А. Слесарчук***, ****, *****, А. А. Чистов***, ****, *****, Т. Д. Никитин***, ****,
В. А. Коршун***, *****, *****, #, В. В. Шманай**, А. В. Устинов***, *****, А. А. Штро*

*Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева,
Россия, 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 15/17

**Институт физико-органической химии НАН Беларуси,
Беларусь, 220072, Минск, ул. Сурганова, 13

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

****Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,
Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, 1

*****Национальный исследовательский университет Высшая школа экономики, факультет биологии
и биотехнологии, Россия, 117312, Москва, ул. Вавилова, 7

***** Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе,
Россия, 119021, Москва, ул. Большая Пироговская, 11

Поступила в редакцию 13.11.2019 г.

После доработки 25.11.2019 г.

Принята к публикации 01.12.2019 г.

Синтезирован 5-(перилен-3-илэтинил)уридин и показана способность данного вещества, а также известных соединений (5-(перилен-3-илэтинил)-2'-дезоксидеокси-уридина, 5-(перилен-3-илэтинил)-арабино-уридина и 1-карбоксиметил-3-пивалоилоксиметил-5-(перилен-3-илэтинил)урацила) эффективно ингибировать репродукцию возбудителей респираторных заболеваний: вируса гриппа А, вируса парагриппа (тип 3) и респираторно-синцитиального вируса человека в культуре клеток.

Ключевые слова: периленилэтинилурацильные соединения, нуклеозиды, ненуклеозидные производные, противовирусная активность, вирус гриппа А, респираторные вирусы

DOI: 10.31857/S0132342320030215

ВВЕДЕНИЕ

Респираторные заболевания являются существенной проблемой, ухудшающей состояние здоровья населения земного шара. Наиболее опасен среди них вирус гриппа, который является причиной ежегодных эпидемий (около миллиарда заболевших, из них до 5 млн – в тяжелой форме, до 0.65 млн умерших) [1, 2]. В историческом прошлом он вызывал несколько глобальных пандемий, в том числе “испанку” 1918 года, ставшую причиной смерти около 50 миллионов человек [3]. Причина эпидемиологической опасности вируса гриппа кроется в его высокой мутационной изменчивости и разнообразии экологических путей его циркуляции [4].

Несмотря на то, что фармакологический рынок заполнен разнообразными средствами против

простуды и гриппа, большинство из них являются симптоматическими средствами и не оказывают ингибирующее воздействие непосредственно на возбудитель. Этиотропными противовирусными являются три группы препаратов – блокаторы М2-канала (амантадин и ремантадин), ингибиторы нейраминидазы (осельтамивир и занамивир), а также ингибиторы протеазы (балаксовир марбоксил и фавиперавир). Препараты первой группы в настоящее время утратили свой потенциал в качестве противогриппозных средств, в связи с высокой устойчивостью к ним циркулирующих штаммов [5]. Лекарства второй группы до сих пор остаются в основном эффективными, однако появление и распространение резистентных штаммов возможно. Например, в 2008 г. в Норвегии 68% изолятов вируса гриппа А (H1N1) оказались устойчивы к осельтамивиру [6]. Третья группа противогриппозных средств пока не зарегистрирована в России. Следует отметить, что все три

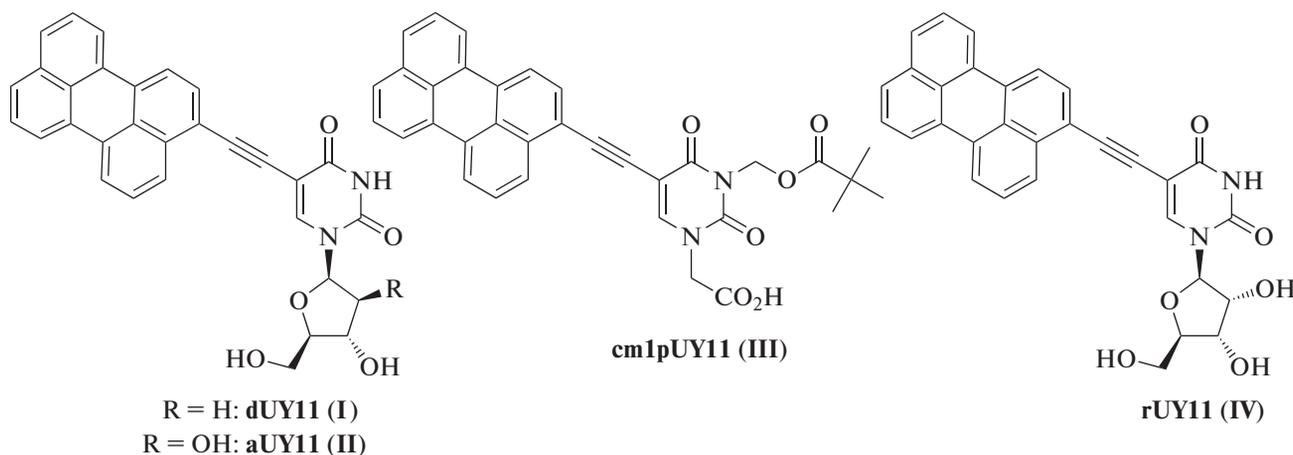
Автор для связи: (тел.: +7 (499) 724-67-15; эл. почта: v-kogshun@yandex.ru).

группы препаратов, а также молекулы новейшей разработки [7] направлены на мишени белковой природы.

Вирус парагриппа (PIV) и респираторно-синцитиальный вирус (RSV) хоть и не вызывают такой высокой летальности среди заболевших, как вирус гриппа, тем не менее представляют собой опасность, особенно для пациентов групп высокого риска — детей дошкольного возраста, пожилых людей и лиц с нарушениями работы иммун-

ной системы. Этиотропных лекарственных препаратов для лечения заболеваний, вызванных этими патогенами, не существует, лечение только симптоматическое.

Таким образом, имеется насущная необходимость разработки новых эффективных средств борьбы с респираторными вирусами. Особенно интересны могут быть препараты, принципиально отличающиеся от существующих по механизму действия.



Ранее мы обнаружили, что периленовые производные урацильных нуклеозидов dUY11 (I) и aUY11 (II) обладают высокой активностью в отношении широкого спектра оболочечных вирусов: простого герпеса 1 и 2 типа, Синдбиса, гепатита С, везикулярного стоматита [8–11], клещевого энцефалита [12], африканской чумы свиней [13], а также вируса гриппа А серотипов H1N1 и H3N2 [14]. Несмотря на формально нуклеозидную структуру, имеются данные в пользу “ненуклеозидного” механизма противовирусного действия веществ (I) и (II). Были предложены две основные гипотезы: 1) внедрение в липидную оболочку вириона, механическое нарушение ее реологических свойств, приводящее к ингибированию проникновения генетического материала вируса в клетку (акта слияния липидных мембран вириона и клетки) [9–11]; 2) фотосенсибилизация генерации синглетного кислорода, который окисляет ненасыщенные липиды в мембране вириона, не имеющего систем ее репарации [15]. Обе гипотезы объясняют широкий спектр активности периленовых производных в отношении оболочечных вирусов, имеют консенсус по поводу мишени (внешняя липидная оболочка вириона) и подразумевают фармакофорную сущность периленовой части молекулы. Действительно, углеводный фрагмент в таких соединениях не является необходимым условием противовирусной активности. Недавно мы продемонстрировали активность

ненуклеозидного производного cm1pUY11 (III) в отношении оболочечных вирусов — простого герпеса типа 1 [11] и клещевого энцефалита [14]. Таким образом, липидная природа предполагаемой мишени противовирусного действия периленовых производных кардинально отличает их от упомянутых выше трех групп препаратов для лечения гриппа.

Рибонуклеозид (IV) ранее не был описан. Также ранее не проводилось тестирование противовирусной активности периленосодержащих соединений по отношению к другим респираторным вирусам. Целью данной работы был синтез рибонуклеозидного производного (IV) и получение данных по противовирусной активности соединений (I)–(IV) для вируса гриппа А и двух других респираторных вирусов: парагриппа типа 3 и респираторно-синцитиального.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Соединение (IV) было получено в четыре стадии из уридина (V) (схема 1). Периленилэтинильные производные нуклеозидов обладают малой растворимостью в большинстве растворителей, что затрудняет их препаративную очистку с помощью колоночной хроматографии. Поэтому обычно применяют ацильные защиты для гидроксильных групп углеводного фрагмента, что позволяет повысить растворимость продукта *sp*–*sp*² сочетания

и проводить его хроматографическую очистку после этой стадии [8, 11, 15, 16]. В качестве такой защитной группы была выбрана изобутирильная. Ацилирование уридина изомасляным ангидридом привело к 2',3',5'-*O*-ацилзащищенному нуклеозиду (VI), который далее галогенировали в 5-йодпроизводное (VII). Последний алкинилировали 3-этинилпериленом в условиях реакции Соногаширы с образованием продукта (VIII), который имел достаточную растворимость для удобной очистки с помощью колоночной хроматогра-

фии на силикагеле. Для удаления защитных групп соединение (VIII) подвергали щелочному гидролизу в мягких условиях, получая целевой рибонуклеозид **rUY11** (IV). Как и другие периленилэтильные производные нуклеозидов, вещество (IV) весьма мало растворимо в воде, но достаточно растворимо в DMSO. Растворы вещества (IV) обладают яркой желто-зеленой флуоресценцией, характерной для периленилэтилурацильных производных.

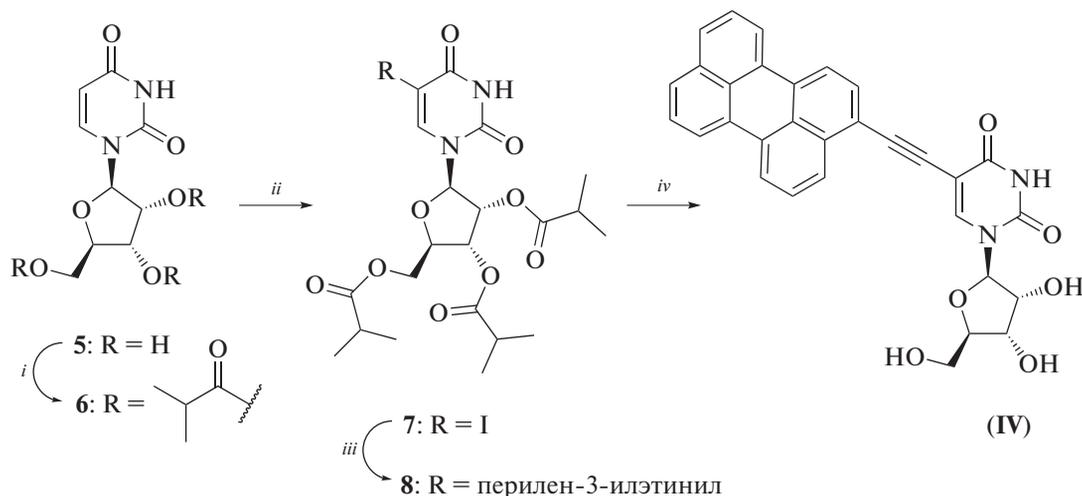


Схема 1. Реагенты и условия реакции: *i*) изомасляный ангидрид, 4-диметиламинопиридин (DMAP), пиридин, 83%; *ii*) иод, нитрат аммония-церия(IV) (CAN), ацетонитрил, 80°C, 93%; *iii*) 3-этинилперилен, тетракис(трифенилфосфин)палладий(0), иодид меди (I), триэтиламин, DMF, 78%; *iv*) карбонат калия, метанол, 85%.

Для соединений (I)–(IV) проводили тестирование противовирусной активности *in vitro* в отношении вирусов гриппа А, парагриппа человека типа 3 и респираторно-синцитиального вируса. Данные по их противовирусной активности и цитотоксичности приведены в табл. 1.

Из представленных в табл. 1 данных видно, что цитотоксичность препаратов на обеих культурах клеток оказалась в целом сходной. При этом три из четырех исследованных препаратов являются низкотоксичными для клеточной культуры (CC_{50} колебалось в пределах 492–998 мкМ), в то время как ненуклеозидное соединение **cm1pUY11** (III) проявило существенно более выраженные цитотоксические свойства, что, возможно, связано с наличием пивалоилоксиметильной группы, которая может распадаться до свободного пивалата и угнетать обмен L-карнитина в клетках [17].

Значения EC_{50} для всех препаратов оказались также сходными и колебались в пределах от 0.5 до 7.1 мкМ, что приводило к высоким значениям индекса селективности (SI). Для всех тестируемых соединений индекс селективности превысил пороговое значение 10, которое позволяет считать препарат перспективным для дальнейших

исследований, даже несмотря на высокие значения CC_{50} , как для препарата **cm1pUY11**.

Таким образом, все использованные в настоящей работе соединения можно охарактеризовать как имеющие высокие противовирусные свойства в отношении вирусов гриппа, парагриппа и респираторно-синцитиального вируса при исследовании *in vitro* на культурах клеток.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все растворители и реагенты использовались без дополнительной очистки. 3-Этинилперилен [8, 18], а также соединения (I) [8], (II) [9, 19] и (III) [14] синтезировали как описано ранее. 1H и ^{13}C ЯМР-спектры были получены на ЯМР-спектрометре Bruker Avance III 500 МГц с отнесением сигналов по пикам остаточных протонов в растворителях: $CDCl_3$ (7.26 м.д. для 1H и 77.16 м.д. для ^{13}C) и $DMSO-d_6$ (2.50 м.д. для 1H и 39.52 м.д. для ^{13}C). КССВ приведены в герцах (Гц) для соответствующих мультиплетов. УФ-спектры были получены на спектрофотометре Varian Cary 100. Спектры флуоресценции получены на спектрометре Perkin Elmer LS 55. Тонкослойная хроматография выпол-

Таблица 1. Противовирусная активность и цитотоксичность соединений **(I)–(IV)** на культурах клеток МДСК (для вируса гриппа) и НЕР-2 (для вируса парагриппа и RSV). SI – химиотерапевтический индекс (индекс селективности), равен отношению CC_{50}/EC_{50}

Соединение	Вирус гриппа А (IVA)			Вирус парагриппа человека типа 3 (PIV-3)			Респираторно-синцициальный вирус (RSV)		
	CC_{50} , мкМ	EC_{50} , мкМ	SI	CC_{50} , мкМ	EC_{50} , мкМ	SI	CC_{50} , мкМ	EC_{50} , мкМ	SI
dUY11 (I)	492 ± 56	2.7 ± 0.7	180	598 ± 44	2.2 ± 0.5	270	598 ± 44	1.8 ± 0.2	330
aUY11 (II)	894 ± 23	5.2 ± 0.4	170	998 ± 59	1.3 ± 0.3	770	998 ± 59	2.3 ± 0.1	430
cm1pUY11 (III)	34 ± 1.9	0.50 ± 0.02	68	45 ± 3.4	4.3 ± 0.2	10	45 ± 3.4	1.9 ± 0.1	24
rUY11 (IV)	658 ± 34	6.4 ± 1.2	100	599 ± 23	2.9 ± 0.4	210	599 ± 23	7.1 ± 0.2	84

нялась на алюминиевых пластинах TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck).

2',3',5'-О-триизобутирилуридин (VI). К раствору уридина (5.00 г, 20.48 ммоль) и 4-диметиламинопиридина (20 мг) в сухом пиридине (35 мл) одной порцией добавляли изомасляный ангидрид (10.2 мл, 61.43 ммоль), после чего перемешивали при комнатной температуре 24 ч, разбавляли метанолом (5 мл) и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в дихлорметане (200 мл), промывали насыщенным водным NaHCO₃ (2 × 150 мл) и насыщенным водным NaCl (150 мл). Органическую фазу сушили Na₂SO₄, фильтровали и упаривали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0 → 2% метанол в дихлорметане (об.)) и получали продукт VI (7.72 г, 83%) в виде белой пены. R_f 0.65 (*n*-гексан–этилацетат, 1 : 1 (об.)). ¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃): δ 9.26 (с, 1H), 7.42 (д, J 8.1, 1H), 6.13–6.04 (м, 1H), 5.77 (д, J 8.2, 1H), 5.33–5.28 (м, 2H), 4.42–4.26 (м, 3H), 2.67–2.49 (м, 3H), 1.26–1.08 (м, 18H). ¹³C ЯМР (126 МГц, CDCl₃): δ 176.44, 175.83, 175.81, 162.93, 150.29, 139.23, 103.47, 87.16, 80.53, 72.86, 70.23, 63.32, 34.11, 33.86, 33.79, 19.10, 19.05, 18.97, 18.88, 18.82, 18.80.

2',3',5'-О-триизобутирил-5-иодуридин (VII). К раствору соединения (VI) (7.60 г, 16.72 ммоль) в сухом ацетонитриле (210 мл) добавляли аммоний-церию(IV) нитрат (9.17 г, 16.72 ммоль) и иод (2.49 г, 10.03 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 80°C в течение 1 ч и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в этилацетате (200 мл) и промывали насыщенным водным NaCl (100 мл). Органическую фазу отделяли, промывали 5% водным NaHSO₃ (100 мл), сушили Na₂SO₄, фильтровали и упаривали досуха. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0 → 1% метанол в дихлорметане (об.)) и получали продукт (VII) (9.00 г, 93%) в виде белой пены. R_f 0.75 (*n*-гексан–этилацетат, 1 : 1 (об.)). ¹H ЯМР (CDCl₃): δ 9.16 (с, 1H), 7.86 (с, 1H), 6.10 (д, J 5.9, 1H), 5.35–5.25 (м, 2H), 4.44 (дд, J 12.5, 3.1, 1H), 4.36 (кв, J 3.0, 1H), 4.30 (дд, J 12.5, 2.4, 1H), 2.74 (п, J 7.0, 1H), 2.59 (дп, J 21.1, 7.0, 2H), 1.26 (дд, J 7.0, 0.8, 6H), 1.19 (дд, J 6.9, 0.9, 6H), 1.15 (д, J 7.0, 6H). ¹³C ЯМР (CDCl₃): δ 176.49, 175.84, 175.80, 159.69, 149.99, 143.63, 86.89, 80.96, 73.14, 70.28, 69.80, 63.22, 34.14, 33.87, 33.78, 19.36, 19.20, 18.97, 18.88, 18.81, 18.78.

2',3',5'-О-триизобутирил-5-(перилен-3-илэтинил)уридин (VIII). К раствору защищенного иодида (VII) (280 мг, 0.48 ммоль) и 3-этинилперилена (177 мг, 0.64 ммоль) в сухом DMF (13 мл) добавляли тетракис(трифенилфосфин)палладий (67 мг, 0.058 ммоль), иодид меди(I) (22 мг, 0.12 ммоль) и триэтиламин (268 мкл, 1.93 ммоль), после чего трижды попеременно дегазировали и продували аргоном. Реакционную смесь перемешивали при 35°C в течение 12 ч и упаривали досуха. Остаток растворяли в этилацетате (30 мл) и промывали во-

дой (20 мл), промывали насыщенным водным NaHCO₃ (20 мл) и насыщенным водным NaCl (20 мл). Органическую фазу сушили Na₂SO₄, фильтровали и упаривали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (толуол–этилацетат) и получали продукт (VIII) (273 мг, 78%) в виде коричневой пены. R_f 0.55 (*n*-гексан–этилацетат, 2 : 1 (об.)). ¹H ЯМР (DMSO-*d*₆): δ 11.96 (с, 1H), 8.51–8.33 (м, 4H), 8.33–8.23 (м, 2H), 7.90–7.78 (м, 2H), 7.75–7.64 (м, 2H), 7.57 (т, J 7.7, 2H), 5.98 (д, J 4.6, 1H), 5.63–5.51 (м, 1H), 5.43 (с, 1H), 4.37 (с, 3H), 2.69–2.54 (м, 3H), 1.15–1.04 (м, 18H). ¹³C ЯМР (DMSO-*d*₆): δ 175.79, 174.94, 161.38, 149.32, 143.73, 134.21, 133.84, 131.43, 131.06, 130.60, 130.09, 129.79, 128.76, 128.42, 127.93, 127.81, 127.62, 127.06, 127.02, 125.72, 121.74, 121.49, 121.38, 120.34, 119.19, 99.26, 91.13, 88.22, 88.01, 79.48, 72.50, 69.39, 62.71, 33.22, 33.07, 18.79, 18.69, 18.62, 18.54, 18.51.

5-(Перилен-3-илэтинил)уридин (IV). К раствору соединения (VIII) (250 мг, 0.34 ммоль) в пиридине (2 мл) добавляли одной порцией насыщенный водный K₂CO₃ (2 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 10 ч при 45°C, разбавляли водой (2 мл). Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой (5 мл), этанолом (2 мл) и диэтиловым эфиром (5 мл), сушили в вакууме и получали продукт (IV) (151 мг, 85%) в виде коричневого порошка. R_f 0.40 (CH₂Cl₂–MeOH, 1 : 1 (об.)). ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-*d*₆) δ 8.58–8.21 (м, 6H), 7.82 (д, J 7.7, 2H), 7.74–7.61 (м, 2H), 7.55 (т, J 7.8, 2H), 5.84 (д, J 4.2, 1H), 5.70–4.93 (м, 2H), 4.19–3.97 (м, 2H), 3.89 (д, J 4.5, 1H), 3.83–3.57 (м, 2H). ¹³C ЯМР (126 МГц, DMSO-*d*₆): δ 143.53, 134.15, 133.71, 130.81, 130.58, 130.14, 129.99, 129.89, 128.35, 128.15, 127.73, 127.67, 127.56, 126.90, 126.87, 126.04, 121.31, 121.26, 121.06, 120.24, 120.19, 98.81, 98.09, 89.76, 88.94, 84.44, 73.94, 69.28, 60.41. УФ (96% EtOH, λ_{max}, нм (ε, M⁻¹ см⁻¹)): 268 (27800), 291 (25000), 320 (16400), 339 (16000), 369 (12800), 457 (18200), 513 (1600). Флуоресценция (96% EtOH, λ_{max}, нм) (возб. для эм. на 560 нм): 239, 289, 363, 440, 514; (эм. при возб. на 490 нм): 552.

Измерение противовирусной активности в отношении вируса гриппа

Для исследования использовали клеточную культуру MDCK и штамм вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1). Препараты растворяли в DMSO (2000 мкг/мл), разбавляли культуральной средой до концентрации, соответствующей СС₅₀ (концентрация препарата, вызывающая гибель 50% клеток), после чего из данного раствора была приготовлена серия 3-кратных разведений. На поддерживающей среде готовили разведение вируса, соответствующее множественности заражения (m.o.i.) = 1.

Культуру клеток промывали средой и наносили на нее препарат в объеме 100 мкл на лунку в со-

ответствующей концентрации, инкубировали в течение 1 ч в темноте в CO_2 -инкубаторе при 37°C и 5% CO_2 , добавляли вирус в количестве 100 мкл после чего инкубировали в течение 24 ч в CO_2 -инкубаторе при 37°C и 5% CO_2 .

По окончании срока инкубации из каждой пробы готовили серию последовательных 10-кратных разведений (10^{-1} – 10^{-7}) в поддерживающей среде, которые наносили на суточный монослой культуры клеток, после чего инкубировали в течение 72 ч в CO_2 -инкубаторе при 37°C и 5% CO_2 .

Титр вируса определяли с помощью реакции гемагглютинации, для чего культуральную среду переносили в соответствующие лунки иммунологических планшетов с U-образным дном и добавляли равный объем 1% суспензии куриных эритроцитов в физиологическом растворе. По истечении 40 мин визуально оценивали наличие или отсутствие гемагглютинации в лунках. Титр вируса был рассчитан по методу Рида и Менча [20] и выражен в 50% тканевых инфекционных дозах (ТИД₅₀) на 100 мкл объема. Противовирусная активность препарата оценивали по снижению титра вируса в опыте по сравнению с контролем.

Измерение противовирусной активности в отношении вируса парагриппа и респираторно-синцитиального вируса

Для исследования были взяты клеточная культура HEp-2 и штаммы вируса парагриппа III v2932 и респираторно-синцитиального вируса A2. Препараты растворяли в DMSO (2000 мкг/мл) и далее в культуральной среде до концентрации, соответствующей CC_{50} , после чего из исходного раствора была приготовлена серия 3-кратных разведений. На поддерживающей среде готовили серию 10-кратных разведений вируса (10^{-1} – 10^{-7}).

Культуру клеток промывали средой, наносили препарат в объеме 200 мкл на лунку в соответствующей концентрации, инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C и 5% CO_2 , препараты удаляли и наносили снова по 100 мкл на лунку в двойной концентрации и сразу же добавляли по 100 мкл вируса, инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C и 5% CO_2 , смывали вирус, наносили препараты в исходной концентрации и инкубировали в течение 6 суток при температуре 37°C и 5% CO_2 .

Титр вируса определяли с помощью клеточно-иммуноферментного анализа (cell-ELISA). Для проведения анализа, клеточная культура фиксировалась холодным 80% ацетоном в течение 15 мин, промывалась с помощью буфера PBS-T. Затем на нее наносили раствор первичных мышечных антител к белку HN вируса парагриппа, инкубировали 2 ч при комнатной температуре при непрерывном перемешивании, промывали буфером, наносили вторичные антимышечные антитела и снова инкубировали в течение 2 ч при непрерыв-

ном перемешивании. Антитела отмывали и наносили субстрат-хромогенную смесь с 3,3',5,5'-тетраметилбензидином (ТМВ). Через 5 мин реакцию останавливали с помощью 0.1 М серной кислоты и оценивали оптическую плотность раствора при длине волны 450 нм. Наличие заражения определяли по превышению значения оптической плотности образца по сравнению с контролем. Титр вируса был рассчитан по методу Рида и Менча [20].

Измерение цитотоксичности

Для каждого вещества из исходного сток-раствора в DMSO (2000 мкг/мл) разбавлением культуральной средой готовили серию последовательных двукратных разведений. Культуру клеток промывали средой, наносили на нее препарат в объеме 100 мкл на лунку в соответствующей концентрации и инкубировали в течение 24 ч при температуре 37°C и 5% CO_2 . Клетки промывали раствором PBS и наносили раствор 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид (МТТ) на поддерживающей среде в концентрации 0.5 мкг/мл и инкубировали в течение 1.5 ч при температуре 37°C и 5% CO_2 , раствор МТТ удаляли, растворяли осадок в 96% этиловом спирте и определяли оптическую плотность раствора при длине волны 535 нм на планшетном ридере Wallas Perkin Elmer. На основании полученных данных с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 5.0 определяли CC_{50} .

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского Национального Фонда (РНФ), грант № 15-15-00053. А.А. Чистов поддержан стипендией Президента РФ, проект СП-4083.2018.4.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

За время подготовки статьи к печати (декабрь 2019 г – февраль 2020 г) человечество столкнулось с внезапной вспышкой острого респираторного заболевания со значительной летальностью, вызываемого оболочечным коронавирусом SARS-CoV-2. На данный момент (28.02.20) заболевание зарегистрировано во многих странах и существует угроза пандемии [21]. Неожиданное появление нового вируса и его быстрое распространение подтверждает актуальность разработки противовирусных терапевтических препаратов широкого спектра, мишенью которых являлся бы липидный бислой оболочечных вирусов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Krammer F., Smith G.J.D., Fouchier R.A.M., Peiris M., Kedzierska K., Doherty P.C., Palese P., Shaw M.L., Treanor J., Webster R.G., Garcia-Sastre A.* // *Nature Rev. Dis. Primers*. 2018. V. 4. Article 3.
2. *Iuliano A.D., Roguski K.M., Chang H.H., Muscatello D.J., Palekar R., Tempia S., Cohen C., Gran J.M., Schanzer D., Cowling B.J., Wu P., Kyncl J., Ang L.W., Park M., Redlberger-Fritz M., Yu H., Espenhain L., Krishnan A., Emukule G., van Asten L., da Silva S.P., Aungkulanon S., Buchholz U., Widdowson M.-A., Bresee J.S.* // *Lancet*. 2018. V. 391. P. 1285–1300.
3. *Monto A.S., Fukuda K.* // *Clin. Inf. Dis.* 2019. 2020. V. 70. P. 951–957.
4. *Long J.S., Mistry B., Haslam S.M., Barclay W.S.* // *Nature Rev. Microbiol.* 2019. V. 17. P. 67–81.
5. *Gubareva L.V., Besselaar T.G., Daniels R.S., Fry A., Gregory V., Huang W., Hurt A.C., Jorquera P.A., Lackenby A., Leang S.K., Lo J., Pereyaslov D., Rebelo-de-Andrade H., Siqueira M.M., Takashita E., Odagiri T., Wang D., Zhang W., Meijer A.* // *Antivir. Res.* 2017. V. 146. P. 12–20.
6. *Hauge S.H., Dudman S., Borgen K., Lackenby A., Hungnes O.* // *Emerg. Inf. Dis.* 2009. V. 15. P. 155–162.
7. *van Dongen M.J.P., Kadam R.U., Juraszek J., Lawson E., Brandenburg B., Schmitz F., Schepens W.B.G., Stoops B., van Diepen H.A., Jongeneelen M., Tang C., Vermont J., van Eijgen-Obregoso Real A., Blokland S., Garg D., Yu W., Coutier W., Lanckacker E., Klap J.M., Peeters D.C.G., Wu J., Buyck C., Jonckers T.H.M., Roymans D., Roevens P., Vogels R., Koudstaal W., Friesen R.H.E., Raboisson P., Dhanak D., Goudsmit J., Wilson I.A.* // *Science*. 2019. V. 363. eaar6221.
8. *Андропова В.Л., Скоробогатый М.В., Манасова Е.В., Берлин Ю.А., Коршун В.А., Галегов Г.А.* // *Биоорганическая химия*. 2003. Т. 29. С. 290–295. [*Andronova V.L., Skorobogatyi M.V., Manasova E.V., Berlin Y.A., Korshun V.A., Galegov G.A.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2003. V. 29. P. 262–266.]
9. *St. Vincent M.R., Colpitts C.C., Ustinov A.V., Muqadas M., Joyce M.A., Barsby N.L., Epand R.F., Epand R.M., Khramy-shev S.A., Valueva O.A., Korshun V.A., Tyrrell D.L.J., Schang L.M.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 17339–17344.
10. *Colpitts C.C., Ustinov A.V., Epand R.F., Epand R.M., Korshun V.A., Schang L.M.* // *J. Virol.* 2013. V. 87. P. 3640–3654.
11. *Speerstra S., Chistov A.A., Proskurin G.V., Aralov A.V., Ulashchik E.A., Streshnev P.P., Shmanai V.V., Korshun V.A., Shang L.M.* // *Antivir. Res.* 2018. V. 149. P. 164–173.
12. *Orlov A.A., Chistov A.A., Kozlovskaya L.I., Ustinov A.V., Korshun V.A., Karganova G.G., Osolodkin D.I.* // *Med. Chem. Commun.* 2016. V. 7. P. 495–499.
13. *Hakobyan A., Galindo I., Nañez A., Arabyan E., Karalyan Z., Chistov A.A., Streshnev P.P., Korshun V.A., Alonso C., Zakaryan H.* // *J. Gen. Virol.* 2018. V. 99. P. 148–156.
14. *Chistov A.A., Orlov A.A., Streshnev P.P., Slesarchuk N.A., Aparin I.O., Rathi B., Brylev V.A., Kutyakov S.V., Mikhura I.V., Ustinov A.V., Westman G., Palyulin V.A., Jain N., Osolodkin D.I., Kozlovskaya L.I., Korshun V.A.* // *Eur. J. Med. Chem.* 2019. V. 171. P. 93–103.
15. *Vigant F., Hollmann A., Lee J., Santos N.C., Jung M.E., Lee B.* // *J. Virol.* 2014. V. 88. P. 1849–1853.
16. *Chistov A.A., Ivanov N.M., Kutyakov S.V., Ustinov A.V., Glybin A.V., Streshnev P.P., Mikhura I.V., Korshun V.A.* // *Tetrahedron Lett.* 2016. V. 57. P. 4821–4823.
17. *Brass E.R.* // *Pharmacol. Rev.* 2002. V. 54. P. 589–598.
18. *Chistov A.A., Kutyakov S.V., Ustinov A.V., Aparin I.O., Glybin A.V., Mikhura I.V., Korshun V.A.* // *Tetrahedron Lett.* 2016. V. 57. P. 1003–1006.
19. *Chistov A.A., Kutyakov S.V., Guz A.V., Mikhura I.V., Ustinov A.V., Korshun V.A.* // *Org. Prep. Proced. Int.* 2017. V. 49. P. 377–381.
20. *Reed L.J., Muench H.* // *Am. J. Hygiene*. 1938. V. 27. P. 493–497.
21. *Cohen J., Kupferschmidt K.* // *Science*. 2020. V. 367. P. 962–963.

5-(Perylen-3-Ylethynyl)uracil Derivatives Inhibit Reproduction of Respiratory Viruses

Y. V. Nikolayeva*, E. A. Ulashchik**, E. V. Chekerda*,

A. V. Galochkina*, N. A. Slesarchuk***, ****, *****, A. A. Chistov***, *****, T. D. Nikitin***, ****, V. A. Korshun***, *****, *****, #, V. V. Shmanai**, A. V. Ustinov***, *****, and A. A. Shtro*

#Phone: +7 (499) 724-67-15; e-mail: v-korshun@yandex.ru

*Smorodintsev Research Institute of Influenza, ul. Professora Popova 15/17, St. Petersburg, 197376 Russia

**Institute of Physical Organic Chemistry of NAS Belarus, ul. Surganova 13, Minsk, 220072 Belarus

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

****Department of Chemistry Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1, Moscow, 119991 Russia

*****Department of Biology and Biotechnology, National Research University Higher School of Economics, ul. Vavilova 7, Moscow, 117312 Russia

*****Gause Institute of New Antibiotics, ul. Bolshaya Pirogovskaya 11, Moscow, 119021 Russia

5-(Perylen-3-ylethynyl)uridine has been synthesized and its ability to inhibit effectively the reproduction of respiratory disease pathogens influenza A virus, parainfluenza virus (type 3) and human respiratory syncytial virus in cell culture was shown, along with known compounds, 5-(perylene-3-ylethynyl)-2'-deoxy-uridine, 5-(perylene-3-ylethynyl)-arabino-uridine and 1-carboxymethyl-3-pivaloyloxymethyl-5-(perylene-3-ylethynyl)uracil.

Keywords: peryleneylethynyluracil compounds, nucleosides, non-nucleoside derivatives, antiviral activity, influenza A virus, respiratory viruses



С-ТЕРМИНАЛЬНЫЙ ДОМЕН ГЕМОЛИТИЧЕСКОГО ТОКСИНА II *Bacillus cereus* СПОСОБЕН ВЗАИМОДЕЙСТВОВАТЬ С ЭРИТРОЦИТАМИ

© 2020 г. Н. В. Руденко*, ***, #, А. П. Каратовская*, А. В. Замятина*, ***, А. В. Сиунов**,
Ж. И. Андреева-Ковалевская**, А. С. Нагель**, Ф. А. Бровко*, ***, А. С. Солонин**

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

**Федеральный исследовательский центр “Пушинский научный центр биологических исследований Российской
академии наук”, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина, РАН,
Россия, 142290, Пушкино, проспект Науки, 5

***Пушинский государственный естественно-научный институт, Россия, 142290, Пушкино, проспект Науки, 3

Поступила в редакцию 21.11.2019 г.

После доработки 09.12.2019 г.

Принята к публикации 16.12.2019 г.

Гемолизин II (HlyII) – один из патогенных факторов *Bacillus cereus*. Гемолизин II отличается от пороформирующих токсинов со структурой типа β -баррель наличием С-терминальной аминокислотной избыточности из 94 остатков (СТД). Роль СТД в формировании мембранной поры и лизисе клеток не ясна, хотя известно, что удаление этой части белка значительно уменьшает гемолитическую активность. Получена представительная панель моноклональных антител против рекомбинантного СТД, узнающих полноразмерный HlyII. Использование полученных моноклональных антител позволило показать, что СТД способен связываться с эритроцитами.

Ключевые слова: бактериальные цитоллизины, доменная структура, моноклональные антитела, порообразующие токсины

DOI: 10.31857/S013234232003029X

ВВЕДЕНИЕ

Bacillus cereus способен вызывать пищевые отравления и раневые инфекции чаще у людей с ослабленным иммунитетом и является одной из распространенных причин внутрибольничных инфекций. Секретируемые бактерией токсины, образуют наноразмерные поры в клеточных мембранах, что приводит к утечке клеточных компонентов. Одним из факторов вирулентности условно-патогенного микроорганизма *B. cereus* является порообразующий токсин гемолизин II (HlyII) [1]. Цитолитическая активность гемолизина II была изучена в клеточных культурах, эритроцитах [2], плоских бислоиных мембранах [3], гепатоцитах мыши [4], а также дафниях [5] и харовых водорослях [6]. В зрелом состоянии этот токсин является гомологом α -токсина *Staphylococcus aureus* с 38%-ной идентичностью на уровне аминокислот [1]. HlyII по сравнению с α -токсином *S. aureus* имеет

С-концевое удлинение из 94 аминокислотных остатков, обозначаемых как СТД (С-терминальный домен) [1, 7]. Делеционный вариант HlyII, лишенный СТД, обладает в 8 раз меньшей гемолитической активностью на эритроцитах кролика по сравнению с интактным HlyII [7]. Механизм, согласно которому этот домен влияет на активность HlyII, неизвестен. При поиске белков (BLAST), имеющих аминокислотную гомологию с С-концевым доменом, обнаружен лишь один участок плазмидной локализации у *Bacillus anthracis*, который является фрагментом гена с неизвестной функцией. Фрагмент, соответствующий остаткам 337–410 в HlyII, обнаружен в плазмиде ХО1 (ID последовательности: AJN43116.1, 29.73% идентичности последовательности гипотетического белка AW20_5667 *B. anthracis* str. Sterne) [8]. Этот факт может указывать на возможность горизонтального переноса генетической информации и его селективного закрепления в составе гемолизина [9]. Наличие С-концевой избыточности ранее описано для некоторых порообразующих белков *Vibrio species*. Характерные домены с лектин-подобной пространственной структурой, связывают гликановые рецепторы на поверхности

Сокращения: СТД – С-терминальный домен гемолизина II *Bacillus cereus*; МА – моноклональные антитела; тИФА – твердофазный иммуноферментный анализ; PBS – фосфатно-солевой буфер; PBST – PBS, содержащий 0.1% Tween 20.

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

клеток-мишеней [10, 11]. Подобное расположение STD в молекуле HlyII *B. cereus* позволяет предположить его важность при связывании с мембранами клеток инфицированного организма для обеспечения локального повышения концентрации токсина, обеспечивающего образование препоры. Однако, отсутствие гомологии аминокислотной последовательности в С-концевых доменах токсинов *B. cereus* и *V. species* [12] не позволяет предположить, что С-концевой домен HlyII функционирует по аналогичному механизму.

Данная работа посвящена, получению МА к STD, и выяснению с их помощью возможной роли STD во взаимодействии с эритроцитами кролика.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение моноклональных антител к STD. Для получения МА в качестве антигена был использован рекомбинантный препарат STD. При создании генетической конструкции вспомогательный His-tag был размещен на С-конце молекулы, предполагая, что данная последовательность не будет влиять на функции белкового домена. В работе [9] показано, что пространственная структура STD уникальна для пороформирующих токсинов и состоит из нескольких β -тяжей, организованных в бочкоподобную структуру с α -спиралями внутри. С-концевые аминокислоты молекулы STD не участвует в формировании общей структуры домена. Эта модель была получена с помощью ЯМР мутантной формы STD, в которой пролин в 405 положении заменен на метионин. Такая замена обеспечила существование только *транс*-изомера STD, что позволило создать его пространственную модель.

При иммунизации STD возникли проблемы. Длительная иммунизация животных STD не приводила к развитию значимого иммунного ответа, только одна особь из 4 экспериментальных групп после девятой иммунизации (группа № 2) демонстрировала высокое содержание специфических антител в сыворотке крови – около 1/1000000. Титр остальных при этом составлял не более 1/32000. Титры сывороток иммунных мышей определяли методом непрямого тИФА на планшетах с иммобилизованным STD. Высокий титр свидетельствовал о формировании достаточного пула плазматических клеток для получения гибридных клеточных линий, стабильно продуцирующих МА, как *in vitro*, так и *in vivo*. Спленоциты особи, демонстрирующей высокий уровень специфических антител в сыворотке крови, были использованы в качестве источника лимфоцитов для получения гибридом, секретирующих МА против STD, по методу Келлера и Мильтштейна [13]. Отбор гибридом, секретирующих специфические антитела, проводили непрямым тИФА по взаи-

модействию надклеточных супернатантов с иммобилизованным на иммунопланшеты STD. Отобраны 27 гибридом, которые были дважды клонированы методом лимитирующих разведений. По результатам оценки пролиферативной активности и стабильности продукции антител было отобрано 24 стабильных гибридных клона, секретирующих МА против STD. Все полученные антитела содержали в своем составе легкую цепь κ (каппа), 22 принадлежали к классу G, подклассу 1, тяжелая цепь HlyIIC-18 и HlyIIC-40–IgG2b. В иммуноблоттинге все МА взаимодействовали как с STD, так и с интактным HlyII (рис. 1).

Взаимодействие STD с эритроцитами. Несмотря на то, что в настоящее время нет информации о возможной функции STD, логично предположить наличие способности взаимодействовать с прокариотическими клетками. МА были использованы для подтверждения этого предположения. Эксперимент проводили с использованием в качестве модели эритроцитов кролика. Взаимодействие STD с эритроцитами определяли в составе иммунных комплексов STD-МА-био, схема эксперимента представлена на рис. 2. В качестве отрицательного контроля использовали не иммунные иммуноглобулины мыши биотинилированные так же, как и МА. Для эксперимента использовали биотинилированные МА: HlyIIC-15, HlyIIC-16, HlyIIC-23, HlyIIC-30, HlyIIC-34, HlyIIC-37. Иммунные комплексы (STD-МА-био) добавляли к суспензии эритроцитов. После часовой инкубации либо при 20°C, либо при 37°C эритроциты трижды отмывали избытком PBS, содержащим 5% бычьей сыворотки для удаления возможного неспецифического взаимодействия STD с эритроцитами. Комплексы эритроцитов со связавшимися иммунными комплексами разрушали обработкой 0.1 М Gly HCl, pH 2.5. После удаления дегрису центрифугированием супернатанты нейтрализовали 1 М Tris-HCl, pH 8.0. Наличие антител в супернатантах свидетельствовало о взаимодействии STD в составе иммунных комплексов с эритроцитами. Антитела в супернатантах выявляли методом тИФА по взаимодействию с иммобилизованными на иммунопланшеты антителами кролика против иммуноглобулинов мыши. Биотинилированные антитела детектировали стрептавидин-пероксидазой. Полученные результаты представлены в виде диаграммы на рис. 3. В лизатах эритроцитов выявлялись МА HlyIIC-16 и HlyIIC-23, следовательно, иммунные комплексы STD с этими антителами связывались с эритроцитами, а сами антитела не препятствовали связыванию STD с эритроцитами. Относительное содержание HlyIIC-23 было на 48% ниже, чем HlyIIC-16, что может указывать на взаимодействие с неидентичными эпитопами. Взаимодействие STD с мембранами эритроцитов носило температурно-зависимый характер. При комнат-

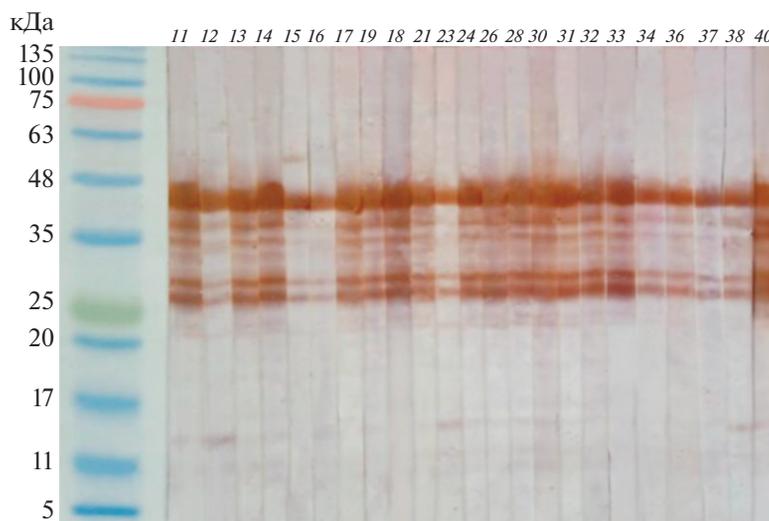


Рис. 1. Взаимодействие МА против STD с HlyII–His₆ в иммуноблоттинге. Над треками указаны названия МА. Левый трек – стандарты молекулярных масс.

ной температуре содержание антител в супернатантах падало на 29%, по сравнению с данными, полученными после инкубации при 37°C, что свидетельствовало о более низкой эффективности взаимодействия STD с эритроцитами при понижении температуры. МА HlyIIС-15, HlyIIС-30, HlyIIС-34 и HlyIIС-37 не детектировались в супернатантах. Этот результат позволяет предположить, что их эпитопы на поверхности белка расположены таким образом, что эти МА в составе иммунных комплексов не позволяют STD взаимодействовать с эритроцитами. Взаимодействие STD с эритроцитами наблюдали только при использовании определенных антител (HlyIIС-16 и HlyIIС-23), эпитопы которых на молекуле домена не влияли на его связывание с клетками. Этот факт указывает на то, что взаимодействие STD ориентировано относительно поверхности эритроцита.

Таким образом, экспериментально доказано, что STD способен взаимодействовать с эритроцитами, и это явление не связано со случайным налипанием STD на поверхность эритроцитов. Использование биотинилированных антител к STD позволило заключить, что гемолизин II обладает дополнительной функциональной активностью — адгезией к поверхности эукариотических клеток,

а сам STD играет существенную роль в этом процессе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы, плазмиды и ферменты. *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen, Германия) была использована для трансформации pET29b(+) (Novagen, Германия). Эндонуклеазы рестрикции KpnI и NdeI (Thermo Scientific, Waltham, MA США), T4-DNA лигаза (NEB, США), белковые маркеры (Abcam, Англия) и ДНК электрофорезные маркеры (Fermentas, Литва), TaqSE-ДНК полимеразы, (SibEnzyme, Россия), dNTP смесь (Thermo Scientific, Waltham, MA США). Encyclo-ДНК полимеразы (Evrogen, Россия). Эндотоксин экстрактор (Силекс, Россия). Конъюгат антител козла с пероксидазой хрена (Thermo Scientific, США). Конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена (Thermo Scientific, США). Тотальную ДНК *Bacillus cereus* ATCC 14579 использовали в качестве матрицы.

Экспрессия и очистка STD His₆. ПЦР-продукт, кодирующий STD был клонирован с использованием вектора pET29b (+) по сайтам NdeI и KpnI. Все конструкции были подтверждены секвенированием ДНК. Последовательность ДНК, кодирующая STD, была амплифицирована с помощью праймеров:

STD_KpnI_Rev: 5'-TTAGGTACCGATCTGTTTAATCTCGATA
 STD_NdeI_For: 5'-TTACATATGGATAACCAAAAAGCCSTT.

Используемые гены и праймеры были произведены коммерчески (Evrogen, Россия). Аминокислотная последовательность STD-His₆ состоя-

ла из С-концевой избыточности HlyII, тромбинового сайта, шести остатков гистидина и линкера. Экспрессию STD-His₆ *E. coli* BL21 (DE3) индуци-

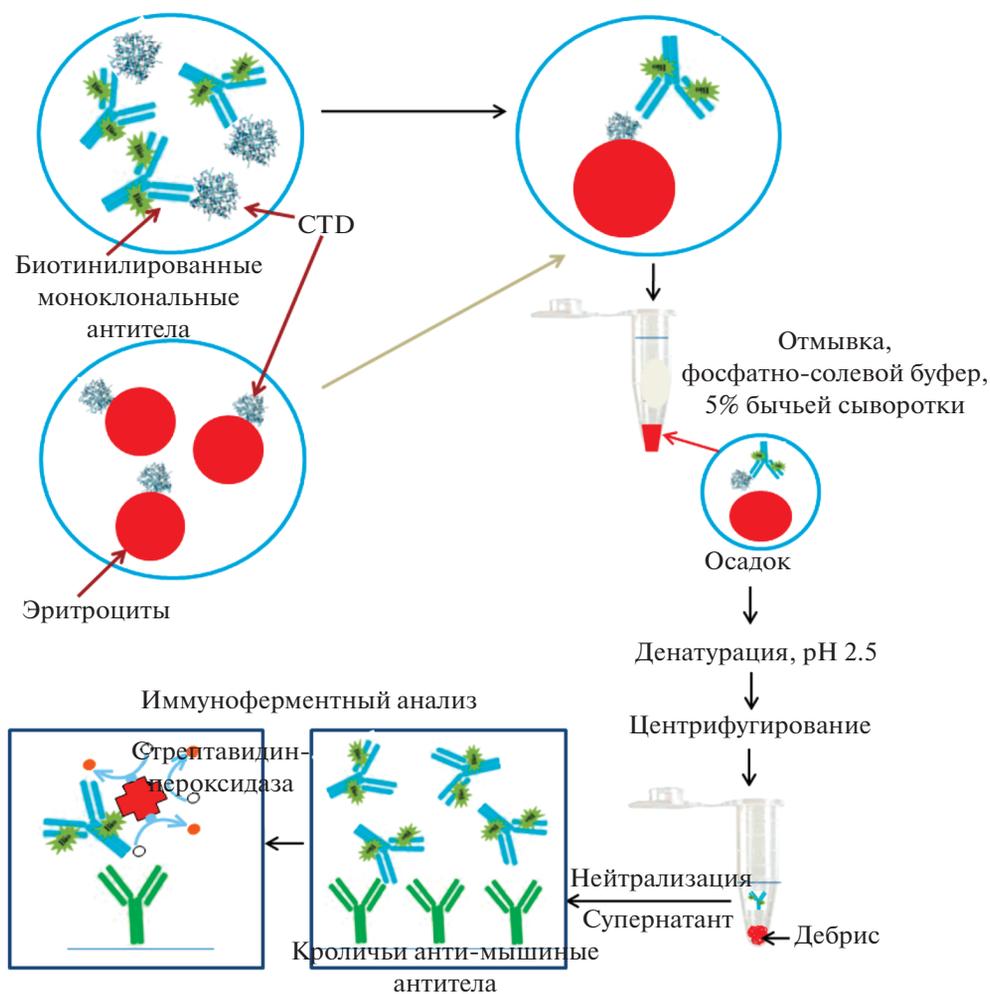


Рис. 2. Взаимодействие СТД с кроличьими эритроцитами, тИФА. Схема эксперимента.

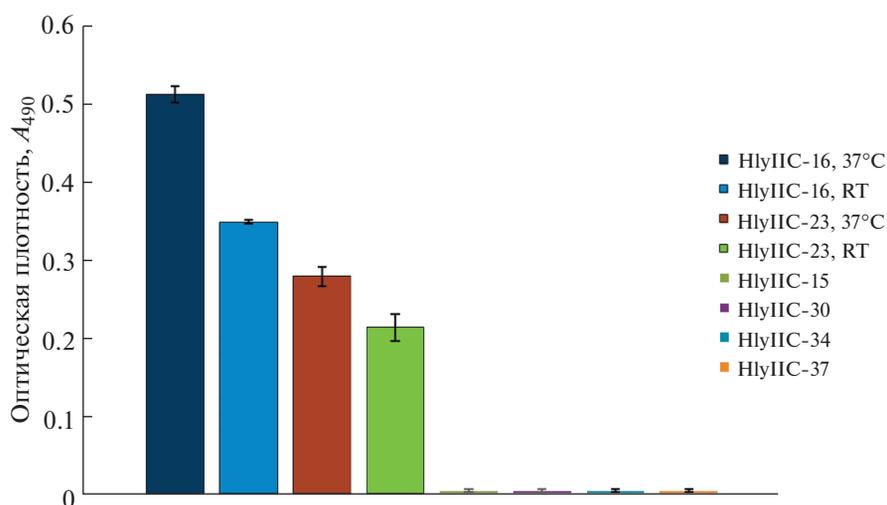


Рис. 3. Относительное содержание биотинилированных МА против СТД в лизатах эритроцитов после взаимодействия иммунных комплексов СТД-МА с мембранами эритроцитов. Результаты представлены за вычетом фоновых значений в присутствии биотинилированных нормальных иммуноглобулинов мыши.

ровали при достижении культурой оптической плотности при 600 нм 0.5–0.6, добавляя изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид до конечной концентрации 1 мМ при 37°C. Далее проводили культивирование с аэрацией в течение 3 часов. Очистку СТД проводили согласно [14]. Концентрации белков определяли согласно [15].

Непрямой твердофазный иммуноферментный анализ. Антиген СТД сорбировали в течение ночи при 4°C из концентрации 1 мкг/мл в 0.05 М карбонатном буфере (рН 9.6) на поверхность лунки планшетов для ИФА (Costar, США). Перед нанесением образцов свободные центры связывания пластика блокировали 30 мин 1% (w/v) раствором желатина в PBST, инкубацию антител с антигеном проводили 1 ч при 37°C. Добавляли конъюгат антител козла против иммуноглобулинов мыши с пероксидазой хрена в PBST, в разведении согласно инструкции производителя. После каждой стадии планшеты отмывали PBST не менее 6 раз. В качестве субстрата пероксидазы использовали 4 мМ раствор орто-фенилендиамина (Sigma, США) в цитрат-фосфатном буфере (26 мМ лимонная кислота, 50 мМ Na₂HPO₄, рН 5.0), содержащем 0.003% (v/v) H₂O₂. После развития окраски реакцию останавливали добавлением равного объема 10% (v/v) серной кислоты и определяли оптическое поглощение при 490 нм с помощью фотометра iMark для микропланшетов, BioRad. Значение оптического поглощения в лунках без добавления специфических антител, соответствующее неспецифическому связыванию конъюгата с иммобилизованным антигеном (отрицательный контроль) вычитали из оптического поглощения в экспериментальной лунке.

Получение моноклональных антител к СТД. 4 группы по 5 мышей линии BALB/c иммунизировали интраперитонеально. Первую иммунизацию проводили в полном адьюванте Фрейнда (Sigma, США), последующие – в неполном адьюванте, интервал между инъекциями составлял 2 недели. Дозы инъекции составляли: в первой группе 15 мкг/одно животное, во второй – 45, в третьей – 95, в четвертой – 45 с предварительной обработкой антигена 0.25% глутаровым альдегидом. Гибридизацию спленоцитов мыши и миеломы SP2/0 проводили с помощью полиэтиленгликоля по методу Келлера и Мильштейна [13].

Наработка и выделение моноклональных антител. МА выделяли аффинной хроматографией на белок А сефарозе [16] из культуральных жидкостей гибридом, секретирующих МА.

Изотипирование антител. Определение типов тяжелой и легкой цепи иммуноглобулинов проводили методом тИФА с помощью набора для изотипирования иммуноглобулинов мыши “Rapid ELISA mouse mAb Isotyping Kit” (Thermo scientific, США) согласно инструкции производителя.

Конъюгирование антител с биотином. Антитела биотинилировали, используя раствор N-гидроксисукцинимидного эфира биотина (Sigma, США) в диметилсульфоксиде с концентрацией 1 мг/мл. Эфир биотина добавляли с 20 кратным молярным избытком. Смесь инкубировали 4 часа при комнатной температуре. Для удаления непрореагировавшего реагента смесь диализовали против PBS в течение ночи. Определение активности биотинилированных МА проводили методом непрямого тИФА по взаимодействию с иммобилизованным на пластик антигеном. Реакцию проявляли стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена в разведении согласно инструкции производителя. Для визуализации реакции также использовали орто-фенилендиамина.

Иммуноблоттинг. Электрофоретическое разделение белков проводили в 12% полиакриламидном геле в присутствии β -меркаптоэтанола и SDS по методу Лэммли [17] в камере типа Bio-Rad MiniProtean Tetra System (Bio-Rad, США). В качестве маркеров молекулярной массы использовали “Prism Ultra Protein Ladder” (3.5–245 кДа). Электрофорез в концентрирующем геле проводили при силе тока 20 мА, в разделяющем – 100 мА. Для получения иммуноэлектрофореграммы содержимое геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond ECL RPN 203D (GE Healthcare, Швеция).

Взаимодействие СТД с эритроцитами, тИФА. СТД инкубировали в концентрации 0.4 мкМ с 0.13 мкМ каждого из биотинилированных МА и биотинилированных не иммунных IgG мыши в присутствии 5% бычьей сыворотки, в PBS. Инкубацию проводили либо в течение двух часов при комнатной температуре, либо 1 час при 37°C. К реакционным смесям добавляли эритроциты до концентрации 1% (v/v), инкубировали 1 час либо при 37°C, либо при комнатной температуре. Далее эритроциты трижды отмывали PBS, содержащим 5% бычьей сыворотки, центрифугируя 2500 об./мин в течение 4 минут. Осадки эритроцитов лизировали 100 мкл 0.1 М Gly HCl, рН 2.5 в течение 5 минут при перемешивании, затем центрифугировали 10000 об./мин в течение 5 мин. Супернатанты отбирали и нейтрализовали 7.5 мкл 1 М Трис-HCl, рН 8.0. рН контролировали универсальной индикаторной бумагой, в каждый из них вносили Tween 20 до концентрации 0.1%. Супернатанты вносили в лунки планшета для ИФА с предварительно иммобилизованными антителами кролика против иммуноглобулинов мыши из концентрации 8 мкг/мл. Далее реакцию проводили также как и тИФА. Связавшиеся антитела выявляли добавлением стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена, в разведении согласно инструкции производителя.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-04-00592.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе были соблюдены международные принципы ухода и использования животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baida G., Budarina Z. I., Kuzmin N.P., Solonin A.S. // FEMS Microbiol. Lett. 1999. V. 180. P. 7–14.
2. Andreeva Z.I., Nesterenko V.F., Yurkov I.S., Budarina Z.I., Sineva E.V., Solonin A.S. // Protein Expr. Purif. 2006. V. 47. P. 186–193.
3. Andreeva Z.I., Nesterenko V.F., Fomkina M.G., Ternovsky V.I., Suzina N.E., Bakulina A.Y., Solonin A.S., Sineva E.V. // Biochim. Biophys. Acta. 2007. V. 1768. P. 253–263.
4. Холодков О.А., Бударина Ж., Ковалевская Ж.И., Суинов А.В., Солонин А.С. // Прикл. биохим. и микробиол. 2015. Т. 51. С. 258–267.
5. Sineva E.V., Andreeva-Kovalevskaya Z.I., Shadrin A.M., Gerasimov Y.L., Ternovsky V.I., Teplova V.V., Yurkova T.V., Solonin A.S. // FEMS Microbiol. Lett. 2009. V. 299. P. 110–119.
6. Kataev A.A., Andreeva-Kovalevskaya Z.I., Solonin A.S., Ternovsky V.I. // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1818. P. 1235–1241.
7. Miles G., Bayley H., Cheley S. // Protein Sci. 2002. V. 11. P. 1813–1824.
8. Johnson S.L., Daligault H.E., Davenport K.W., Jaissle J., Frey K.G., Ladner J.T., Broomall S.M., Bishop-Lilly K.A., Bruce D.C., Gibbons H.S., Coyne S.R., Lo C.-C., Meincke L., Munk A.C., Koroleva G.I., Rosenzweig C.N., Palacios G.F., Redden C.L., Minogue T.D., Chain P.S. // Genome Announc. 2015. V. 3. P. e00151-15.
9. Kaplan A.R., Kaus K., De S., Olson R., Alexandrescu A.T. // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 3277.
10. Kaus K., Lary J.W., Cole J.L., Olson R. // J. Mol. Biol. 2014. V. 426. P. 2800–2812.
11. Levan S., De S., Olson R. // J. Mol. Biol. 2013. V. 425. P. 944–957.
12. Olson R., Gouaux E. // J. Mol. Biol. 2005. V. 350. P. 997–1016.
13. Köhler G., Milstein C. // Nature. 1975. V. 256. P. 495–497.
14. Kaplan A.R., Maciejewski M.W., Olson R., Alexandrescu A.T. // Biomol. NMR Assign. 2014. V. 8. P. 419–423.
15. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
16. Mole S.E., Lane D.P. in DNA Cloning, V. III. A Practical Approach / Ed. Glover D.M. 1989. P. 197–198.
17. Laemmly U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.

C-Terminal Domain of *Bacillus cereus* HlyII Is Able to Interact with Erythrocytes

N. V. Rudenko*, ***, #, A. P. Karatovskaya*, A. V. Zamyatina*, ***, A. V. Siunov**,
Zh. I. Andreeva-Kovalevskaya**, A. S. Nagel**, F. A. Brovko*, ***, and A. S. Solonin**

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

*Pushchino Branch, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
prospekt Nauki 6, Pushchino, Moscow, 142290 Russia

**G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, FSBI FRC Pushchino Scientific
Centre of Biological Research, Russian Academy of Sciences, prospekt Nauki 5, Pushchino, Moscow, 142290 Russia

***Pushchino State Institute of Natural Sciences, prospekt Nauki 3, Pushchino, Moscow, 142290 Russia

Hemolysin II (HlyII) is one of the pathogenic factors of *Bacillus cereus*. With respect to the prototype of β -barrel toxins, the α -toxin of *S. aureus*, this pore-forming protein has a C-terminal domain (CTD) of 94 amino acids. The role of CTD in membrane pore formation and cell lysis is not clear, although removal of this portion of the protein is known to significantly reduce hemolytic activity. A representative panel of monoclonal antibodies against recombinant CTD recognizing full-length HlyII was obtained. Using the obtained monoclonal antibodies, CTD was shown to bind to rabbit red blood cells.

Keywords: bacterial cytolysins, domain structure, monoclonal antibodies, pore-forming toxins



УДК 577.112.083

ПОЛУЧЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ЧАСТИ РЕЦЕПТОРА ErbB2 ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

© 2020 г. В. С. Рыбченко^{*,#}, Д. С. Балабашин^{**}, А. А. Панина^{**}, О. Н. Солопова^{***, ****},
С. А. Якимов^{**}, Т. К. Алиев^{****}, Д. А. Долгих^{*, **}, М. П. Кирпичников^{*, **}

^{*}Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
Россия, 119192, Москва, Ленинские Горы, 1/12

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

^{***}Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения,
Россия, 117638, Москва, Симферопольский бульвар, 8

^{****}Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет
Россия, 119234, Москва, Ленинские Горы, 1/3

^{*****}ФБГУ “НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина”, Россия, 115478, Москва, Каширское ш., 23

Поступила в редакцию 02.12.2019 г.

После доработки 09.12.2019 г.

Принята к публикации 10.12.2019 г.

Методом экспрессии в эукариотических клетках СНО получена внеклеточная часть рецептора ErbB2 (extracellular domain ErbB2), являющегося одним из онкологических маркеров, а также мишенью для терапевтических антител. Внеклеточная часть рецептора была выделена из культуральной жидкости с помощью металл-аффинной хроматографии и охарактеризована биохимическими и иммунохимическими методами. Было показано, что выделенный рецептор состоит из мономерной, димерной и тримерной форм. Олигомерные формы разделяли методом гель-фильтрации и характеризовали по способности связывания с терапевтическим препаратом “герцептин”, являющимся одним из основных препаратов терапии опухолей молочной железы. Полученный рецептор может быть использован *in vitro* для иммунохимических экспериментов.

Ключевые слова: ErbB2, СНО, трастузумаб, SK-OV-3

DOI: 10.31857/S0132342320030306

ВВЕДЕНИЕ

Рецептор ErbB2 является одним из 4 белков, входящих в семейство рецепторов эпидермального фактора роста. Рецепторы этого семейства играют важную роль в клеточной миграции, пролиферации и дифференцировке. Повышенный уровень экспрессии ErbB2, а также ErbB1 (EGFR) обычно связан со злокачественным перерождением клеток и канцерогенезом. Увеличение экспрессии ErbB2 наблюдают для клеток раковых опухолей молочной железы [1], легких [2, 3], шейки матки, почек, прямой кишки, уротелия [4] и других органов и тканей. У 32% пациентов с ErbB2-позитивными опухолями наблюдаются он-

когенные мутации, расположенные преимущественно в I–II доменах внеклеточной части рецептора [11] и тирозинкиназном домене [10]. Добавление к ErbB2-позитивным опухолевым клеткам антисмысловых малых интерферирующих РНК к мРНК гена ErbB2 приводит к уменьшению скорости их пролиферации, увеличению количества клеток, подверженных апоптозу, что, в свою очередь, ведет к уменьшению роста опухоли [12]. В связи с изложенными фактами, ErbB2 является перспективной мишенью для исследования и терапии ErbB2-позитивных опухолей. На данный момент существует несколько препаратов, нацеленных на этот рецептор. Одним из первых препаратов, одобренных FDA, является моноклональное антитело “Трастузумаб” (торговая марка “Герцептин”), которое взаимодействует с IV внеклеточным доменом ErbB2, препятствует димеризации рецептора [13] и функционированию его в качестве корецептора. Дополнительным механизмом действия антитела Трастузумаб

Сокращения: ScFv-HSA – single-chain variable fragment – human serum albumin; ecdErbB2 – внеклеточная часть рецептора ErbB2 (extracellular domain ErbB2); ФБС(Т) – фосфатно-солевой буфер (с добавлением Tween-20); ТБС(Т) – трис-солевой буфер (с добавлением Tween-20).

[#] Автор для связи: (тел: +7 (977) 272-87-63; эл. почта: vladislavrusia@yandex.ru).

является антителозависимая клеточная цитотоксичность [14]. Известен также другой препарат – Пертузумаб, являющийся моноклональным антителом, которое взаимодействует со II доменом рецептора ErbB2. Поскольку эпитопы для этих двух антител являются различными, то совместное использование препаратов этих двух антител оказывает более существенный эффект ингибирования роста опухоли, нежели при монотерапии [15]. Помимо упомянутых препаратов антител, существует несколько других полноразмерных антител и их фрагментов, связывающихся с рецептором ErbB2 и оказывающих противоопухолевое действие. Например, Маргетуксимаб является химерным антителом, связывающимся с тем же эпитопом, что и Трастузумаб, но имеющим более высокое сродство к Fc-рецепторам клеток иммунной системы, в результате чего противоопухолевый эффект, обусловленный антителозависимой клеточной цитотоксичностью, оказывается выше. На данный момент осуществляется активный поиск и разработка новых антител, нацеленных на рецептор ErbB2, с увеличенными цитотоксичностью и противоопухолевым действием по сравнению с существующими препаратами. Например, на 2-ой стадии клинических испытаний находится биспецифическое антитело MCLA-128. Данное антитело связывается с двумя рецепторами опухолевых клеток, ErbB2 и ErbB3 [22]. Существует также ряд препаратов, представленных фрагментами антител. На основе однодоменных антител лампы было получено химерное антитело C3 [20], содержащее вариабельный домен тяжелой цепи лампы и Fc-фрагмент человеческого антитела. Такой рекомбинантный белок лучше проникает в твердые опухоли, чем полноразмерные антитела, и обладает достаточным для терапевтического применения периодом полувыведения из организма. Для увеличения периода циркуляции в крови и доставки к опухолевым клеткам цитотоксических агентов, присоединенных к антителам химическим путем, могут быть использованы антитела формата ScFv-HSA (одноцепочечный вариабельный фрагмент – человеческий сывороточный альбумин) [21]. Еще одной группой препаратов, воздействующих на рецептор ErbB2, являются ингибиторы тирозинкиназы, которые препятствуют перекрестному транс-фосфорилированию и передаче сигнала внутрь клетки по PI3K и MAPK-путям [16], что также приводит к замедлению клеточной пролиферации и увеличению количества клеток, подверженных гибели через апоптоз.

Молекула ErbB2 состоит из 1225 аминокислот и обладает молекулярной массой в 134.9 кДа. Структурно рецептор ErbB2 разделен на три части: внеклеточную, внутриклеточную и трансмембранную. Трансмембранная часть представлена короткой α -спиралью, образованной аминокис-

лотами 653–675 [5]. Внутриклеточная часть (аминокислоты 676–1255) образует тирозинкиназный домен, играющий ключевую роль в передаче сигнала с рецептора внутрь клетки. Внеклеточная часть рецептора ErbB2 (ecdErbB2, аминокислоты 24–652) состоит из 4 доменов с большим числом (25) дисульфидных связей и содержит несколько участков гликозилирования [6]. У всех рецепторов семейства Erb, за исключением ErbB2, домены I и III образуют участок, связывающийся с лигандом. В отличие от остальных рецепторов семейства, лиганд для ErbB2 до сих пор неизвестен [7]. Согласно проведенным структурным исследованиям I и III домены у рецептора ErbB2 находятся в закрытой конформации, в которую остальные рецепторы семейства переходят, связавшись с лигандом. Такой переход из открытой в закрытую конформацию приводит к тому, что плотные контакты II и IV доменов нарушаются, высвобождая на поверхности IV домена участки, являющиеся ключевыми в димеризации рецептора [13]. Хотя ErbB2 не способен связываться с лигандами, известными для остальных рецепторов семейства ErbB, он может функционировать в качестве ко-рецептора, при этом увеличивая сродство к лигандам, что особенно важно для рецептора ErbB3, у которого отсутствует тирозинкиназная активность [8, 9].

В связи со сложной структурой рецептора ErbB2 его продукция с целью использования в иммунохимических экспериментах или для иммунизации животных является непростой задачей. Существует несколько подходов получения данного белка. Одним из них является использование бактериальных бесклеточных систем экспрессии. Такой способ позволяет получить очищенный препарат белка, однако продуктивность бесклеточной системы является низкой, около 2 мкг/мл реакционной смеси [18]. Другой подход описан в статье Франклина и соавторов [19], при котором сигнальные последовательности рецептора заменялись на аналогичные последовательности гликопротеина D вируса герпеса. Очистка рецептора из клеточных лизатов осуществлялась с помощью антител к гликопротеину D. Часть рецептора, состоящая из внеклеточных доменов, была получена после присоединения соматотропина для улучшения секреции рекомбинантного рецептора [13]. Такой подход потребовал отщепления соматотропина и дополнительного этапа очистки с помощью гель-фильтрации.

Вышеизложенные факты подтверждают, что получение рецептора ErbB2 является трудоемким процессом, а изучение его свойств является важной задачей для создания и разработки диагностических и терапевтических средств против ErbB2-позитивных опухолей.

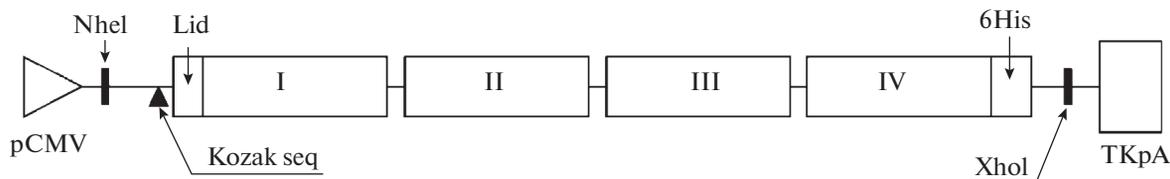


Рис. 1. Схематическое изображение экспрессионной кассеты ecdErbB2 в составе плазмиды pcDNA3.4/ecdErbB2. CMV – промотор цитомегаловируса, ТКрА – терминатор тимидинкиназы, содержащий сигнал полиаденилирования, 6His – гексагистидиновая последовательность, Lid – лидерный пептид рецептора ErbB2, Kozak seq – последовательность Козак, NheI, XhoI – участки узнавания эндонуклеаз рестрикции.

Целью нашей работы являлась разработка метода получения рекомбинантного белка внеклеточной части рецептора ErbB2 (ecdErbB2) в больших количествах, по сравнению с известными методами, без потери качества, необходимого для тестирования терапевтических и диагностических антител.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение рекомбинантного белка ecdErbB2

В представленной работе для получения гена ErbB2 использовали ErbB2-позитивные клетки цистаденокарциномы яичников человека линии SK-OV-3, из которых выделяли тотальную мРНК и осуществляли обратную транскрипцию для получения кДНК. На матрице кДНК с помощью ПЦР амплифицировали фрагмент нуклеотидной последовательности, кодирующий I–IV домены ecdErbB2. Олигонуклеотиды, использованные для амплификации фрагмента, были подобраны таким образом, что фланкировали начало 2-го и конец 15-го экзона гена ErbB2 (NCBI, Genome Data Viewer: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/>). Праймеры были проверены с помощью программы NCBI Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) на отсутствие неспецифических участков отжига в геноме человека и китайского хомячка, клетки которого (CHO) далее нами использовались для получения рекомбинантного белка ecdErbB2. Во фрагмент ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность ecdErbB2, мы вводили нуклеотидные последовательности собственного лидерного пептида (по N-концу рецептора для обеспечения секреции белка в культуральную жидкость) и шести гистидинов (по C-концу белка, после аминокислот PINCTHSCV, для очистки этого белка с помощью металл-аффинной хроматографии). Добавление лидерного пептида и гексагистидиновой последовательности осуществляли в ходе двухстадийной полимеразной цепной реакции без предварительного получения фрагментов, кодирующих лидерный пептид и гексагистидиновой последовательности, с помощью 5 праймеров (ERBB2LidF1, ERBB2LidF2,

ERBB2LidR1, ERBB2HisF1, ERBB2HisR1). Полученная конструкция была снабжена участками узнавания эндонуклеаз рестрикции NheI и XhoI и помещена в экспрессионный вектор pcDNA3.4 (Invitrogen, США) под контроль сильного промотора CMV и терминатора тимидинкиназы, содержащего сигнал полиаденилирования (ТКрА) (рис. 1). В результате была получена экспрессионная плаزمида pcDNA3.4/ecdErbB2.

Полученную таким образом нуклеотидную последовательность секвенировали по методу Сэнгера, сравнили с последовательностью транскрипта гена внеклеточной части ErbB2, находящуюся в базе данных NCBI (accession number NM_004448.3, NCBI Gene Bank), обнаружили ее полное совпадение этим с геном в составе конструкции pcDNA3.4/ecdErbB2. Для продукции белка ecdErbB2 была осуществлена транзientная трансфекция синхронизированной культуры клеток CHO. Клетки культивировали в течении 14 суток, после чего осаждали центрифугированием, добавляли к супернатанту азид натрия (1 мг/мл), PMSF (0.5 мг/мл) и выделяли белок ecdErbB2 на металл-аффинном носителе, уравновешенном ионами Co^{2+} . Концентрацию белка определяли по оптическому поглощению при 280 нм. Определенный уровень продукции составил 10–30 мг/л культуры.

Биохимическая и иммунохимическая характеристика рекомбинантного белка ecdErbB2. Состав белкового препарата, полученного на металл-аффинном носителе, оценивали методом гель-фильтрации на хроматографической колонке с носителем Superdex 200 GL. В ходе разделения препарата наблюдали, что он состоит из трех пиков, каждый из которых собирали в отдельную фракцию (рис. 2а) Анализ препарата белка методом ДСН-ПААГ электрофореза в невозстанавливающих условиях также показал наличие трех белков с молекулярными массами 90, 180 и, предположительно 270 кДа. При добавлении в 4х буфера для нанесения при подготовке проб для белкового электрофореза был использован 5% β-меркаптоэтанол. После этого вместо трех полос наблюдали одну полосу с молекулярной массой 90 кДа (рис. 2б), превышающей расчетную молекулярную массу рекомбинантного белка ecdErbB2 (72 кДа).

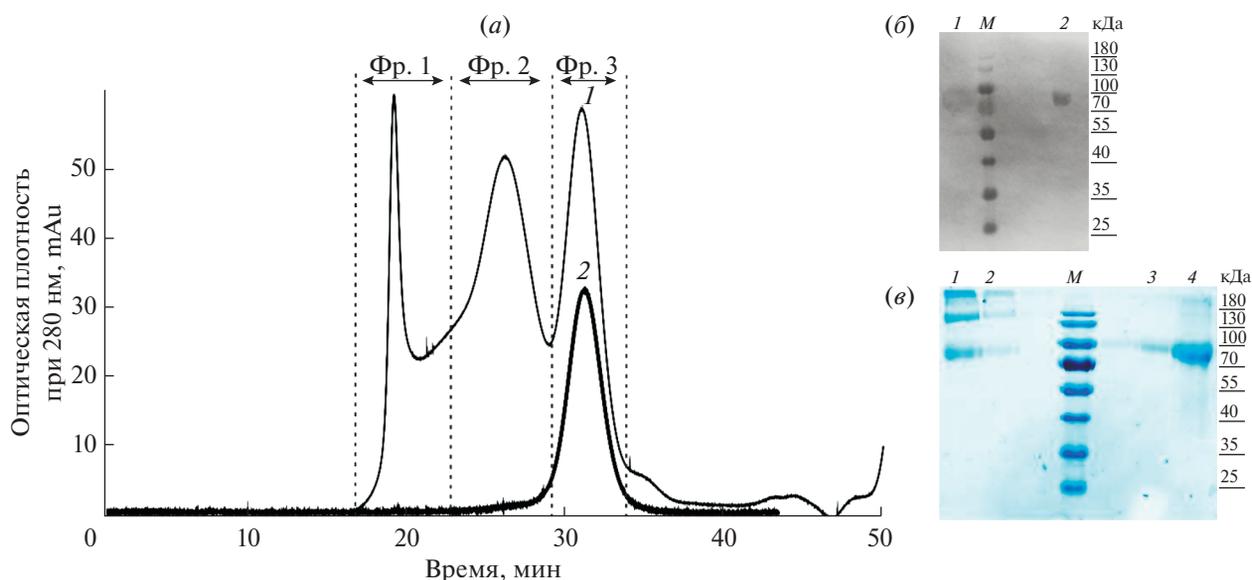


Рис. 2. Оценка чистоты белкового препарата ecdErbB2. (а) Хроматограмма гель-фильтрации: линия 1 – разделение препарата ecdErbB2 после металл-аффинной хроматографии, линия 2 – мономерная форма рекомбинантного белка ecdErbB2 (фракция пика 3); (б) иммуноблот 4 мкг белкового препарата ecdErbB2 с анти-гексагистидиновым конъюгатом, 1 – в невосстанавливающих условиях, 2 – в восстанавливающих условиях, М – маркеры молекулярных масс; (в) электрофореграмма ecdErbB2 в 10% ДСН-ПААГ: 1, 2 – 4 и 1 мкг ecdErbB2 в невосстанавливающих условиях, 3, 4 – 4 и 1 мкг ecdErbB2 в восстанавливающих условиях, М – маркеры молекулярных масс.

Отличия в расчетной и экспериментально определенной молекулярных массах полноразмерного рецептора ErbB2, отмеченные также в других работах [23, 24], могут быть связаны с гликозилированием внеклеточной части рецептора. Поскольку в нашей работе при добавлении β-меркаптоэтанола белки с мол. массами 180 и 270 кДа диссоциируют до белка с мол. массой 90 кДа, можно предположить, что данные белки являются димерной и тримерной формами ecdErbB2. Так как ecdErbB2 содержит большое количество дисульфидных связей, то наличие выявленных олигомерных форм, предположительно, вызвано их некорректным образованием в процессе фолдинга. Для доказательства подлинности белка ecdErbB2 мы провели иммуноблоттинг белка с антителами против гексагистидиновой последовательности, находящейся в составе рекомбинантной молекулы ecdErbB2. После электрофоретического разделения препарата белка ecdErbB2, полученного на металл-аффинном носителе, в 10% полиакриламидном геле белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану путем электрофоретического переноса (электроблота). Мембрану обрабатывали раствором БСА и инкубировали с раствором антител против гексагистидиновой последовательности, конъюгированных с пероксидазой хрена. Наличие окрашенной полосы с молекулярной массой 90 кДа как в восстанавливающих, так и в невосстанавливающих условиях подтверждает подлинность мономерной формы ecdErbB2 (рис. 2б).

Иммунохимическая характеристика рекомбинантного белка ecdErbB2

Полученные с помощью гель-фильтрации фракции белка ecdErbB2 анализировали на наличие способности связываться с препаратом “Герцептин”, представленного антителом Трастузумаб, методом непрямого ИФА. Было показано, что все три фракции (рис. 2а) способны связываться с этим антителом (рис. 3), что подтверждает наше предположение о том, что продукты с молекулярными массами 180 и 270 кДа являются димерной и тримерной формами ecdErbB2. Необходимо отметить, что олигомерные формы обладают более высокими значениями эффективной концентрации EC_{50} по сравнению с мономерной фракцией. Значения EC_{50} составили 1.23, 1.13 и 0.66 мкг/мл для тримерной, димерной и мономерной форм, соответственно. Можно предположить, что более низкая активность олигомерных форм рецептора по сравнению с мономерной формой вызвана тем, что часть эпитопов оказывается недоступной для связывания с антителом.

Принимая во внимание, что все 3 формы белка ecdErbB2, охарактеризованные гель-фильтрацией, присутствующие в препарате после выделения металл-аффинной хроматографией, показывают высокую активность связывания с антителом Трастузумаб, можно сделать вывод о том, что предложенный нами метод позволяет получать быстро, в одну стадию очистки, достаточные количества (10–30 мг/л культуры) активного ecdErbB2 для имму-

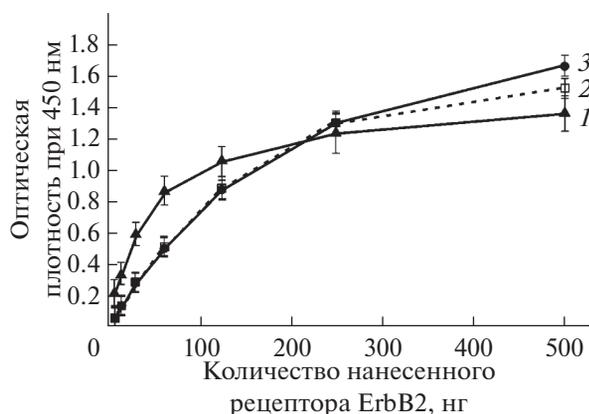


Рис. 3. Определение связывания белка еcdErbB2 с антителом трастузумаб, полученного во фракциях после разделения гель-фильтрацией (рис. 2а): 1 — соответствует фракции 1, 2 — фракции 2, 3 — фракции 3.

нохимических экспериментов. При этом дополнительный этап очистки методом гель-фильтрации позволяет получить мономерную форму еcdErbB2, обладающую более низким значением EC_{50} по сравнению с олигомерными формами.

ВЫВОДЫ

Для проведения иммунохимических экспериментов был получен рекомбинантный белок еcdErbB2 с уровнем продукции 10–30 мг/л, что значительно превышает уровень продукции описанный ранее [13, 18, 19]. Описанный в данной статье способ получения еcdErbB2 является более простым и удобным для получения данного рекомбинантного белка по сравнению с уже известными методами получения [13, 18, 19]. В работе была сконструирована экспрессионная плаزمида рсDNA3.4/ecdErbB2 для продукции еcdErbB2 в культуре эукариотических клеток CHO. В состав экспрессионной кассеты вводили нуклеотидные последовательности собственного лидерного пептида ErbB2 для обеспечения секреции в культуральную жидкость и гексагистидиновой последовательности для очистки рекомбинантного еcdErbB2 с помощью металл-аффинной хроматографии. Рекомбинантный белок еcdErbB2 получали путем транзientной трансфекции культуры клеток яичника китайского хомячка (CHO). Выделенный на металл-аффинном носителе препарат белка еcdErbB2 состоял из мономерной, димерной и тримерной форм, каждая из которых связывала антитело трастузумаб. Полученный рекомбинантный белок еcdErbB2 может быть использован для изучения свойств широкого спектра антител и их производных, направленных к рецептору ErbB2.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В представленной работе были использованы следующие реактивы и штаммы бактерий: питательная среда OptiCHO (Invitrogen, США), раствор пенициллин-стрептамицин-фунгизон (Anti-anti) (Invitrogen, США), реагент TRIzol (GibcoBRL, Шотландия), реагент для трансфекции lipofectamine 2000 (Invitrogen, США), однокомпонентный субстрат тетраметилбензидин (TMB) (НПО “Биотест Системы”, Россия), Tween-20, эндонуклеазы рестрикции (Thermo Scientific или Fermentas, Литва, США), ДНК-полимераза Tersus (Евроген, Россия), обратная транскриптаза M-MuLV (Thermo Scientific, США), вектор рAL-TA (Евроген, Россия), вектор рсDNA3.4 (Thermo Scientific, США), соосадиитель нуклеиновых кислот “satellite red” (Евроген, Россия), набор Plasmid Miniprep (Евроген, Россия), ФБС (10 мМ $Na(H_2PO_4)$ – $Na_2(HPO_4)$, 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, pH 7.2, Amresco, США), маркеры белковых масс для электрофореза (Fermentas, Литва), нитроцеллюлозная мембрана (ADVANTEC, Япония), антитело к гексагистидиновой последовательности, конъюгированное с пероксидазой хрена (ВНЦМДЛ, Россия), проявляющий субстрат тетраметилбензидин (ЗАО “НВО Иммунотех”, Россия), T4-ДНК-лигаза (Thermo Scientific, США), DMSO (Sigma), бактоагар, дрожжевой экстракт, триптон (BD, Франция), штамм *E. coli* XL1-Blue (a, b 3 recA1 endA1 gyrA96 thi₁ hsdR17 supE44 relA1 lac [F’ proABlacI-qZΔM15 Tn10 (Tetr)]) (Stratagene, США). Другие химические реактивы были получены из коммерческих источников и использованы без предварительной очистки.

Были использованы приборы: колонка (BioRad, 20 мл, объем носителя 1 мл) Co-NTA Chelating Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, Швеция); 0.22 мкм PVDF фильтр Millex GV (Millipore, Ирландия); планшеты для ИФА Nunc Maxisorp (Thermo Scientific, США); колонка Superdex 200 GL, объемом 23.5 мл (GE Healthcare); хроматограф Akta Pure 25 (GE Healthcare); система для вертикального электрофореза Bio-Rad Mini-Protean 3 cell (Bio-RAD, США); планшетный спектрофотометр Microplate Reader 680 (BioRad, США).

Получение кДНК из клеток SK-OV-3. Выделение тотальной РНК осуществляли из 10^5 клеток линии SK-OV-3 с помощью реагента TRIzol согласно протоколу производителя. Качество полученной мРНК определяли по соотношению коэффициентов поглощения A_{260}/A_{280} , принимая допустимыми значения 1.95–2, и с помощью метода электрофореза нуклеиновых кислот в 1% агарозном геле. Реакцию обратной транскрипции осуществляли с помощью обратной транскриптазы M-MuLV RT (Thermo Scientific, США) с Oligo(dT)₁₈ праймером согласно протоколу произво-

дителя. Полученную кДНК разделяли на аликвоты и хранили при -70°C .

Получение кодирующей последовательности ecdErbB2. Нуклеотидную последовательность, кодирующую I–IV внеклеточные домены рецептора ErbB2, амплифицировали на матрице кДНК, полученной из клеток SK-OV-3. Реакцию ПЦР осуществляли с помощью Tersus-полимеразы с праймерами ERBB2F2 GTGTGCACCGG-CACAGACATGAAG и ERBB2R2 GGAGTGG-GTGCAGTTGATGGGGC. При амплификации использовали следующие параметры реакции: денатурация 92°C , 20 с; отжиг 55°C , 20 с; элонгация 72°C , 2 мин; количество циклов – 35. Продукты реакции разделяли в агарозном геле методом электрофореза нуклеиновых кислот и выделяли фрагмент размером 1827 п. о. с помощью набора для выделения ДНК из агарозного геля “Cleanup Mini”. Выделенный фрагмент лигировали в pAL2-T вектор при 12°C в течение ночи. Лигазной смесью трансформировали приготовленные электрокомпетентные клетки *E. coli* штамма XL-1 blue, высевали клетки на LB-агар с ампицилли-

ном (150 мкг/мл) и культивировали в течение ночи при 37°C . Колонии анализировали с помощью бело-голубой селекции и ПЦР. Отобранные колонии культивировали в течение ночи в 10 мл LB-среды с добавлением ампициллина (150 мкг/мл) в 50 мл пробирках типа Фалькон при скорости агитации 250 об./мин и выделяли плазмидную ДНК с помощью набора Plasmid Miniprep. Нуклеотидную последовательность, кодирующую ecdErbB2, определяли секвенированием по методу Сэнгера.

Получение экспрессионной плазмиды для продукции ecdErbB2. В экспрессионный вектор pcDNA3.4 методом химико-ферментативного синтеза в нуклеотидную последовательность, кодирующую ecdErbB2, вводили последовательность лидерного пептида рецептора ErbB2 и участок узнавания эндонуклеазы рестрикции NheI на 5'-конец, а на 3'-конец вводили нуклеотидную последовательность гексагистидиновой последовательности и участок узнавания эндонуклеазы рестрикции XhoI. Фрагмент, кодирующий ecdErbB2, амплифицировали с праймерами

ERBB2LidF1 AGGGAAGCTAGCGCCACCATGGAGCTGGCGGCCTTGTGCCGCTGGGGG,
 ERBB2LidR1 GCTCGCGGCTCCGGGGGGCAAGAGGGGCGAGGAGGCCCCAGCGGCACAAGG,
 ERBB2LidF2 CCCCAGGAGCCGCGAGCACCAAGTGTGCACCGGCACAGACA,
 ERBB2HisF1 CCATCAACTGCACCCACTCCTGTGTGCATCATCACCATCATCACTGAGT,
 ERBB2HisR1 AAGGGACTCGAGTCGCACTCAGTGATGATGGTGATGAT.

Продукты реакции пересаждали этанолом, обрабатывали эндонуклеазами рестрикции FastDigest NheI и FastDigest XhoI, разделяли в агарозном геле методом электрофореза нуклеиновых кислот, выделяли фрагмент размером 1950 п. о., клонировали его в предварительно дефосфорилированный экспрессионный вектор и получили плазмиду pcDNA3.4/ecdErbB2.

Экспрессия рекомбинантного белка ecdErbB2 в клетках CHO и его очистка. Белок ecdErbB2 получали путем транзientной экспрессии в клетках CHO, культивирование которых проводили в колбах Эрленмейера в 30 мл среды CD DG44 (Invitrogen, США) в термостатируемом CO_2 -инкубаторе при 37°C , 8% CO_2 , при скорости ротации 135 об./мин в течение 14 суток. Трансфекцию клеток CHO осуществляли плазмидой pcDNA3.4/ecdErbB2 (18 мкг плазмидной ДНК на 30 мл культуры) при стартовой клеточной плотности 3×10^5 кл./мл с помощью трансфектанта Lipofectamine 2000.

Среду осветляли путем центрифугирования при 3000 g в течение 30 мин, добавляли 0.1 объема 10-кратного фосфатно-солевого буфера ФБС и 30 мл культуральной жидкости, наносили на колонку с носителем Co-NTA Chelating Sepharose Fast Flow, предварительно уравновешенную 10 мМ ФБС. Колонку промывали 3 мл раствора 50 мМ имидазо-

ла в ФБС, белок ecdErbB2 элюировали фракцией объемом 1 мл с помощью 500 мМ имидазола в ФБС и диализовали против ФБС. Выделенный белок рецептора стерилизовали с помощью 0.22 мкм PVDF фильтра Millex GV и хранили при 4°C . Концентрацию белка определяли по поглощению при $\lambda = 280$ нм. Гель-фильтрацию осуществляли на колонке Superdex 200 GL объемом 23.5 мл уравновешенной буфером ТБС (0.1 М Трис-НСl, 0.15 М NaCl, 5% iPrOH, pH 7.5) на хроматографе Akta Pure 25. На колонку наносили 200 мкг белка в 230 мкл буфера ТБС, разделение белков осуществляли при скорости потока 0.4 мл/мин. Детекцию разделения белков проводили по оптическому поглощению при $\lambda = 280$ нм. Получили 53 мкг белка во фракции 1 пика хроматограммы гель-фильтрации, 106 мкг белка во фракции 2 пика и 70 мкг белка во фракции 3 пика. Белок фракции 3 пика в количестве 50 мкг повторно наносили на колонку для доказательства его чистоты.

Аналитические методы. Определение концентрации белка осуществляли по поглощению при 280 нм на наноспектрофотометре Implen P300. Коэффициент молярной экстинкции рассчитывали при помощи сервиса ExPASy ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>). Чистоту препарата белка оценивали электрофорезом белков в денатурирующих условиях в 10% ПААГ по методу

Лэммли [17]. Для подготовки проб к ним добавляли 5× буфер для нанесения (250 мМ Tris-HCl pH 6.8, SDS 5%, 0.05% бромфеноловый синий, 40% глицерин) и инкубировали в течение 5 мин при 95°C. Электрофорез проводили в восстанавливающих и не восстанавливающих условиях. Для разделения компонентов смеси белков использовали систему для вертикального электрофореза Bio-Rad Mini-Protean 3 cell, окрашивание осуществляли красителем Coomassie brilliant blue R250.

Иммуноблоттинг и ИФА. После электрофоретического разделения препарата белка ecdErbB2 разделенные белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану с использованием буфера для переноса (25 мМ Tris, 192 мМ глицин, 20% метанол, pH 8.5). Неспецифическую сорбцию на мембране блокировали 5% раствором БСА при 4°C в течение ночи и промывали три раза буфером ТБСТ (20 мМ Tris, 150 мМ NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.6). После этого мембрану помещали в раствор антитела к гексагистидиновой последовательности, конъюгированного с пероксидазой хрена, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее мембрану пять раз промывали раствором ТБСТ и добавляли однокомпонентный преципитирующий субстрат тетраметилбензидин. Мембрану инкубировали в течение 5–10 минут, после чего реакцию останавливали, промывая мембрану дистиллированной водой.

Непрямой ИФА использовали для определения способности полученного белка ecdErbB2 взаимодействовать с препаратом “Герцептин” (антитело Трастузумаб). Все измерения осуществляли трижды. В первую лунку планшета вносили 0.5 мкг рецептора, далее делали двукратные разведения 7 раз. Лунки планшета блокировали 1% раствором БСА в 10 мМ фосфатно-солевом буфере при 37°C в течение часа, после чего добавляли раствор антитела против рецептора ErbB2 (5 мкг/мл). Лунки планшета промывали ФБС с добавлением детергента Tween-20, 0.05%, пять раз и инкубировали с раствором антивидовых поликлональных антител против человеческого иммуноглобулина класса IgG, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma, США). После этого лунки промывали 9 раз фосфатно-солевым буфером с добавлением Tween-20, 0.05%, и добавляли проявляющий субстрат тетраметилбензидин. Реакцию останавливали, добавляя 0.5 М фосфорную кислоту, до концентрации 0.25 М. Реакцию связывания определяли по оптическому поглощению при $\lambda = 450$ нм на планшетном спектрофотометре Microplate Reader 680. Для определения величины EC50 строили функцию зависимости оптической плотности (Y) от концентрации оптической плотности (X) в логарифмической системе координат

и использовали уравнение $Y = \frac{A - B}{1 + \frac{X}{EC50}}$, где A

– максимальное значение функции, B – минимальное значение.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнялась при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение № 075-15-2019-1385 от 19.06.2019, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60417X0189).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Eccles A. S.* // J. Mam. Gl. Biol. Neopl. 2001. V. 6. P. 393–406.
<https://doi.org/10.1023/A:1014730829872>
2. *Cappuzzo F., Varella-Garcia M., Shigematsu H., Domenichini I., Bartolini S., Ceresoli G.L., Rossi E., Ludovini V., Gregorc V., Toschi L., Franklin W.A., Crino L., Gazdar A.F., Bunn P.A., Jr., Hirsch F.R.* // J. Clin. Onc. 2005. V. 23. P. 5007–5018.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2005.09.111>
3. *Engelman J.A., Cantley L.C.* // Clin. Canc. Res. 2006. V. 12. P. 4372–4376.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0795>
4. The human protein atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000141736-ERBB2/pathology>.
5. *Mineev K.S., Bocharov E.V., Pustovalova Y.E., Bocharova O.V., Chupin V.V., Arseniev A.S.* // J. Mol. Biol. 2010. V. 400. P. 231–243.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.05.016>
6. UniProt database. <https://www.uniprot.org/uniprot/P04626>.
7. *Klapper L.N., Glathe S., Vaisman N., Hynes N.E., Andrews G.C., Sela M., Yarden Y.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 4995–5000.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.9.4995>
8. *Sierke S.L., Cheng K., Hong-Hee K., Koland J.G.* // Biochem. J. 1997. V. 322. P. 757–763.
<https://doi.org/10.1042/bj3220757>
9. *Fitzpatrick V.D., Pisacane P.I., Vandlen R.L., Sliwkowski M.X.* // FEBS Letters. 1998. V. 431. P. 102–106.
[https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00737-6](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00737-6)
10. *Hyman D.M., Piha-Paul S.A., Won H., Rodon J., Saura C., Shapiro G.I., Juric D., Quinn D.I., Moreno V., Doger B., Mayer I.A., Boni V., Calvo E., Loi C., Lockhart A.C., Er-injeri J.P., Scaltriti M., Ulaner G.A., Patel J., Tang J.,*

- Beer H., Selcuklu S.D., Hanrahan A.J., Bouvier N., Melcer M., Murali R., Schram A.M., Smyth L.M., Jhaveri K., Li B.T., Drilon A., Harding J.J., Iyer G., Taylor B.S., Berger M.F., Cutler R.E., Xu F., Butturini A., Eli L.D., Mann G., Farrell C., Lalani A.S., Bryce R.P., Arteaga C.L., Meric-Bernstam F., Baselga J., Solit D.B. // *Nature*. 2018. V. 554. P. 189–194. <https://doi.org/10.1038/nature25475>
11. Ross J.S., Fakhri M., Ali S.M., Elvin J.A., Schrock A.B., Suh J., Vergilio J.-A., Ramkissoon S., Severson E., Daniel S., Fabrizio D., Frampton G., Sun J., Miller V.A., Stephens P.J., Gay L.M. // *Cancer J*. 2018. V. 124. P. 1358–1373. <https://doi.org/10.1002/cncr.31125>
12. Yang G., Cai K.Q., Thompson-Lanza J.A., Bast R.C., Liu J. // *The Journal of Biological Chemistry*. 2004. V. 279. P. 4339–4345. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311153200>
13. Hyun-Soo C., Mason K., Ramyar K.X., Stanley A.M., Gabelli S.B., Denney D.W., Leahy D.J. // *Nature*. 2003. V. 421. P. 757–760. <https://doi.org/10.1038/nature01392>
14. Mimura K., Kono K., Hanawa M., Kanzaki M., Nakao A., Ooi A., Fujii H. // *Clin. Cancer Res*. 2005. V. 11. P. 4898–4903. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2476>
15. Scheuer W., Friess T., Burtscher H., Bossenmaier B., End J., Hasmann M. // *Cancer Res*. 2009. V. 69. P. 9330–9337. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4597>
16. Tai W., Mahato R., Cheng K. J. // *Control Release*. 2010. V. 146. P. 264–275. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.04.009>
17. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
18. He W., Scharadin T.M., Saldana M., Gellner C., Hoang-Phou S., Takanishi C., Hura G.L., Tainer J.A., Carraway K.L., Henderson P.T., Coleman M.A. // *Scientific Reports*. 2015. 5. P. 12896. <https://doi.org/10.1038/srep12896>
19. Franklin M.C., Carey K.D., Vajdos F.F., Leahy D.J., de Vos A.M., Sliwkowski M.X. // *Cancer Cell*. 2004. V. 5. P. 317–328. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(04\)00083-2](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(04)00083-2)
20. Wu X., Chen S., Lin L., Liu J., Wang Y., Li Y., Li Q., Wang Z. // *Translational Oncology*. 2018. V. 11. P. 366–373. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.01.024>
21. Ceran C., Cokol M., Cingoz S., Tasan I., Ozturk M., Yagci T. // *BMC Cancer*. 2012. V. 12. P. 450–465.
22. Pernas S., Tolaney S.M. // *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2019. V. 11. P. 1–16. <https://doi.org/10.1177/1758835919833519> <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-450>
23. Duarte H.O., Balmaña M., Mereiter S., Osório H., Gomes J., Reis C.A. // *Int. J. Mol. Sci*. 2017. V. 18. P. 2262–2281. <https://doi.org/10.3390/ijms18112262>
24. Peiris D., Spector A.F., Lomax-Browne H., Azimi T., Ramesh B., Loizidou M., Welch H., Dwek M.V. // *Scientific Reports*. 2017. V. 7. 43006–43017. <https://doi.org/10.1038/srep43006>

Production of Extracellular Part of Receptor ErbB2 for the Study of Immunobiologicals

V. S. Rybchenko*, #, D. S. Balabashin**, A. A. Panina**, O. N. Solopova***, ****, S. A. Yakimov**, T. K. Aliev****, D. A. Dolgikh*, **, and M. P. Kirpichnikov*, **

#Phone: +7 (977) 272-87-63; e-mail: vladislavrusia@yandex.ru

*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Leninskie gory 1/1, Moscow, 119192 Russia

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

***Russian Research Center for Molecular Diagnostics and Therapy, Simpheropolskii bul. 8, Moscow, 117638 Russia

****Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Leninskie gory 1/3, Moscow, 119234 Russia

*****Federal State Budgetary Institution “Blokhin National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kashirskoe sh. 23, Moscow, 115478 Russia

In present work, we expressed in CHO cell culture the extracellular part of ErbB2 receptor (extracellular domain ErbB2), which is one of oncological markers and a target for therapeutic antibodies. The extracellular part of the receptor was recovered from culture broth by metal-affinity chromatography and was characterized using biochemical and immunochemical methods. The receptor was produced in monomer, dimer and trimer forms. Oligomer forms were separated by size-exclusion chromatography and we proved by ELISA their ability to bind “Herceptin”, which is one of the basic drugs approved for breast cancer treatment. The obtained receptor can be used for immunochemical experiments *in vitro*.

Keywords: ErbB2, CHO, trastuzumab, SK-OV-3



ВЛИЯНИЕ ЭТАНОЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ *Silene roemerii*, *S. sendtneri* НА ПЕРВИЧНЫЕ МОНОЦИТЫ/МАКРОФАГИ ЧЕЛОВЕКА

© 2020 г. Е. С. Филоненко*, #, Л. Н. Зибарева*

*Национальный исследовательский Томский государственный университет, Сибирский ботанический сад, Россия, 634050, Томская область, Томск, просп. Ленина, 36

Поступила в редакцию 16.09.2019 г.

После доработки 21.10.2019 г.

Принята к публикации 25.10.2019 г.

Иммуномодулирующая и иммунокорректирующая терапии являются важными подходами в укреплении иммунитета. Биологически активные вещества растений, проявляющие широкий спектр фармакологической активности, могут действовать как агенты, мобилизующие иммунную систему. Растения, принадлежащие к семейству Гвоздичных (Caryophyllaceae Juss.), включая виды *Silene roemerii* Friv., *S. sendtneri* Boiss, богаты экидистероидами и флавоноидами, которые характеризуются большим разнообразием биологических активностей, потенциально влияющих на иммунную систему. В настоящем исследовании изучали влияние действия нативных и бесхлорофильных экстрактов растений *S. roemerii*, *S. sendtneri* на макрофаги человека. Оценивали влияние экстрактов на продукцию цитокинов (с помощью ИФА), а также экспрессию дифференциально регулируемых генов (с помощью микрочипов и полимеразной цепной реакции в реальном времени с реакцией обратной транскрипции). Результаты экспериментов показали, что все исследуемые виды повышают продукцию M2-ассоциированного хемокина CCL18, кроме того, представители рода *Silene* L., индуцируют продукцию провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-6). Выявленное действие обнаружено как для нативных, так и бесхлорофильных экстрактов. Кроме того, экстракты исследуемых растений влияли на экспрессию генов *CCL2*, *MMP9*, *VEGFA* и *S100A9* в макрофагах человека. В целом, результаты показывают, что растительные экстракты видов *Silene* проявляют иммуномодулирующее действие, влияя на активацию макрофагов *in vitro*.

Ключевые слова: *Silene*, Гвоздичные, макрофаги, противовоспалительные и провоспалительные цитокины

DOI: 10.31857/S0132342320020098

ВВЕДЕНИЕ

В здоровом организме врожденная иммунная система обеспечивает первую линию обороны против внешних или внутренних сигналов опасности. Система мононуклеарных фагоцитов, включающая циркулирующие моноциты, резидентные макрофаги и дендритные клетки, играет главные роли в воспалении и антипатогенной защите, а также в прямой ликвидации чужеродных агентов [1].

Макрофаги активируются в ответ на сигналы, присутствующие в пораженной ткани или связанные с патогенами, увеличивают производство цитокинов, хемокинов и других активных молекул. Поляризованные макрофаги имеют M1- или M2-фенотип. Макрофаги M1, или “классически

активированные” провоспалительные макрофаги, индуцируются отдельно IFN- γ или в сочетании его с липополисахаридом (эндотоксин) или TNF- α . В противоположность этому, “альтернативно активированные” макрофаги M2 индуцируются под воздействием различных сигналов, включая цитокины IL-4, IL-13, IL-10, иммунные комплексы, глюкокортикоиды [2].

Выступая в качестве первой линии защиты организма от разнообразных патогенов, мононуклеарные фагоциты сами становятся их мишенями, что приводит к нарушению их функций. В связи с этим остро стоит вопрос об изучении возможностей иммунокорректирующей терапии, иммуномодуляции функций мононуклеарных фагоцитов [3]. В качестве возможных агентов, мобилизующих иммунитет, могут выступать растения, богатые вторичными метаболитами различных классов.

Виды рода *Silene* (Caryophyllaceae) характеризуются большим разнообразием входящих в них химических структур, особенно экидистероидов [4]. Растения этого рода проявляют широкий спектр фармакологических активностей [5–9] и исполь-

Сокращения: БАВ – биологически активные вещества; ОТ-кПЦР – полимеразная цепная реакция в реальном времени с реакцией обратной транскрипции; ИФА – иммуноферментный анализ; MF – макрофаги; TNF- α – фактор некроза опухоли α ; IFN- γ – интерферон- γ ; IL – интерлейкин; CCL – CC хемокин.

Автор для связи: (тел.: +7 (3822) 529-724; эл. почта: filonenkoelenaserg@mail.ru).

Таблица 1. Содержание БАВ в нативных и бесхлорофильных экстрактах (в процентах на абсолютно сухое сырье)

Вид рода <i>Silene</i>	Соединения	Нативный экстракт, % ($m \pm SEM$)	Бесхлорофильный экстракт, % ($m \pm SEM$)
<i>S. sendtneri</i>	Фитоэкдистероиды	1.18 \pm 0.01	1.02 \pm 0.01
	Флавоноиды	4.84 \pm 0.03	5.24 \pm 0.10
<i>S. roemerii</i>	Фитоэкдистероиды	1.52 \pm 0.01	1.18 \pm 0.01
	Флавоноиды	2.87 \pm 0.01	2.37 \pm 0.03

зуются в медицине разных стран для лечения гинекологических, кожных и желудочно-кишечных, онкологических и других заболеваний [10].

Фармакологические свойства видов семейства гвоздичных недостаточно изучены и представляют очевидный интерес. В течение долгого времени в лаборатории фитохимии Сибирского ботанического сада Томского государственного университета изучаются виды семейства гвоздичных. Более 100 новых продуцентов фитоэкдистероидов рекомендовано, десятки видов интродуцированы в Западную Сибирь, выделены и установлены структуры ряда индивидуальных вторичных метаболитов из растений, в том числе новых [4, 11], исследованы биологические активности экстрактов растений видов *Silene* [6, 11–13].

Благодаря разнообразному составу, высокому содержанию вторичных метаболитов и биологическим активностям, возможно использование экстрактов видов рода *Silene* в качестве модуляторов активации и функций макрофагов.

Целью данного исследования является изучение действия растительных экстрактов видов *S. sendtneri* и *S. roemerii* на продукцию цитокинов и генную экспрессию в дифференциально активированных первичных макрофагах человека.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Хроматографический анализ растительных экстрактов

В связи с тем, что имеются данные [14, 15] о проявлении хлорофиллами противовоспалительной активности, сделана попытка исключить их вклад в суммарную биологическую активность исследуемых растений. Предварительно проведено селективное их извлечение из сырья с целью оценки биологической активности БАВ исследуемых видов в составе бесхлорофильного комплекса. Удаление хлорофилла из экстрактов с помощью *n*-гексана позволило провести более точный ВЭЖХ-анализ состава флавоноидов и экдистероидов и исключить вклад пигментов в биологическую активность. Хроматографический профиль исследованных растительных экстрактов приведен в табл. 1.

Состав и содержание БАВ в нативных и бесхлорофильных экстрактах были одинаковыми. В экстрактах *S. sendtneri* были обнаружены: поли-

подин В, 20-гидроксиэкдизон (20Е), виценин-2; в *S. roemerii* идентифицированы 20Е, экдизон, 2-дезоксид-20Е, виценин-2. Большее содержание фитоэкдистероидов в нативных и бесхлорофильных экстрактах наблюдается у *S. roemerii*, тогда как преобладание флавоноидов — у *S. sendtneri*. 20Е является мажорным компонентом фитоэкдистероидов, его количество в исследуемых экстрактах составляет 0.76–1.18% в пересчете на абсолютно сухое сырье. Во всех исследованных экстрактах наблюдали флавоноид с T_R 13.8–14.3 мин (ВЭЖХ), содержание которого составляло 1.39–3.72%.

Продукция про- и противовоспалительных цитокинов макрофагами при действии исследуемых растительных экстрактов

Моноциты/макрофаги способны продуцировать и секретировать более 100 различных эффекторных и регуляторных молекул. Среди продуктов секреции макрофагов главное место занимают провоспалительные и противовоспалительные цитокины [3]. Чтобы охарактеризовать действие растительных экстрактов растений рода *Silene*, анализировали продукцию цитокинов TNF- α , IL-1 β , IL-6, и CCL-18. Нестимулированные макрофаги (MF_{NS}) и макрофаги, дифференцированные в присутствии IFN- γ (MF_{IFN- γ}) или IL-4 (MF_{IL-4}) инкубировали в среде с добавлением растительных экстрактов *Silene sendtneri* или *S. roemerii* (табл. 2) или этанола (контроль). Виды *Silene* индуцируют продукцию TNF- α , IL-1 β , IL-6 в MF_{NS}, MF_{IFN- γ} и небольшое накопление IL-1 β , IL-6 в MF_{IL-4}. Все исследуемые виды индуцируют продукцию CCL-18 в MF_{IL-4}, кроме того, виды *Silene* индуцируют небольшую продукцию CCL-18 в MF_{NS}, MF_{IFN- γ} . Так *S. sendtneri* повышает содержание TNF- α в MF_{IFN- γ} в 16.2 раза по сравнению с контролем (этанол), IL-1 β в MF_{IFN- γ} в 10.9 раза, CCL-18 в MF_{NS} в 95.8 раза, CCL-18 в MF_{IL-4} в 2.2 раза. *S. roemerii* повышает содержание TNF- α в MF_{IFN- γ} в 13.5 раза; IL-1 β в MF_{IFN- γ} в 9.5 раза, CCL-18 в MF_{NS} в 5 раз, CCL-18 в MF_{IL-4} в 2.5 раза.

Установлено, что после извлечения хлорофиллов из сырья экстракты *S. sendtneri* и *S. roemerii* сохраняют вызванный ими повышенный уровень продукции TNF- α , IL-1 β , IL-6 в MF_{NS}, MF_{IFN- γ} , а также CCL-18 в MF_{IL-4}. Кроме того, наблюдалось небольшое накопление IL-6 в MF_{IL-4} и CCL-18 в

MF_{NS} , $MF_{IFN-\gamma}$. Так, бесхлорофильный экстракт *S. sendtneri* повышает содержание $TNF-\alpha$ в $MF_{IFN-\gamma}$ в 9 раз по сравнению с контролем, CCL-18 в MF_{NS} в 27.8 раза, CCL-18 в $MF_{IFN-\gamma}$ в 1.6 раза, CCL-18 в MF_{IL-4} в 3 раза. Бесхлорофильный экстракт *S. roemerii* повышает содержание $TNF-\alpha$ в $MF_{IFN-\gamma}$ в 5.5 раза, CCL-18 в MF_{NS} в 18.7 раза, CCL-18 в $MF_{IFN-\gamma}$ в 1.5 раза, CCL-18 в MF_{IL-4} в 2.6 раза.

Попарное сравнение с помощью критерия Тьюки показало, что нативный экстракт *S. sendtneri* вызывает достоверное увеличение продукции $TNF-\alpha$ и $IL-1\beta$ в $MF_{IFN-\gamma}$, $IL-6$ в MF_{NS} и $MF_{IFN-\gamma}$, а также CCL-18 в MF_{NS} по сравнению с контролем ($P < 0.05$). При действии бесхлорофильного экстракта *S. sendtneri* попарное сравнение с помощью критерия Тьюки установило достоверное увеличение продукции $TNF-\alpha$ и $IL-1\beta$ в $MF_{IFN-\gamma}$, $IL-6$ в MF_{NS} и $MF_{IFN-\gamma}$, а также CCL-18 в MF_{NS} и MF_{IL-4} по сравнению с контролем ($P < 0.05$). В остальных случаях достоверной разницы в продукции цитокинов между исследуемыми группами не было обнаружено из-за ограниченного числа доноров.

Поскольку фитоэкдистероиды и флавоноиды являются основными БАВ семейства Гвоздичных, по всей вероятности, выявленный эффект экстрактов перспективных видов обусловлен комплексом этих вторичных метаболитов.

Влияние экстрактов на экспрессию генов в первичных макрофагах человека

Для более детального анализа эффектов растительных экстрактов растений рода *Silene* на макрофаги, анализировали их действие на экспрессию генов. MF_{NS} , $MF_{IFN-\gamma}$, MF_{IL-4} инкубировали в среде с добавлением этанола (контроль) или растительных экстрактов *S. sendtneri*, *S. roemerii*; на 6-й день из клеток выделяли тотальную РНК.

С помощью использования микрочипов было выявлено 3988 генов, статистически значимо дифференциально регулируемых под влиянием экстрактов. Из всего массива генов в 157 наблюдается изменение экспрессии с уровнем экспрессии $\geq 2 \left(\begin{matrix} FC \geq 2 \\ < 2 \end{matrix} \right)$, хотя бы в одной стимуляции. В табл. 3 и 4 представлены функциональные группы генов макрофагов, наиболее важных с иммунологической и онкологической точки зрения, экспрессия которых изменяется при действии экстрактов.

В MF_{NS} при действии растительных экстрактов *S. sendtneri*, *S. roemerii* наблюдалось статистически значимое повышение экспрессии генов *CCL2*, *CCL18*, *S100A9*, небольшое повышение экспрессии *MMP14*, *TNFAIP3*, *PLAUR*, *SERPINB2*, в остальных случаях статистически значимых различий в MF_{NS} не обнаружено.

В отличие от этого, в $MF_{IFN-\gamma}$ при действии растительных экстрактов *S. sendtneri* и *S. roemerii*

наблюдалось значимое повышение экспрессии *CCL2*, *IL1R2*, *VEGFA*, *MMP9*, *MMP14*, *TNFAIP3*, *S100A9*, *PLAUR*, в остальных случаях статистически значимых различий в $MF_{IFN-\gamma}$ не обнаружено.

Повышение экспрессии *CCL2*, *CCL18*, *IL1R2*, *VEGFA*, *MMP9*, *MMP14* ассоциировано с активацией ангиогенеза, миграции макрофагов при воспалении, а также увеличением антимикробной активности [16].

Повышение экспрессии *TNFAIP3*, *S100A9*, *PLAUR*, *SERPINB2* ассоциировано с активацией воспалительного ответа, бактерицидной активности и процессами свертывания крови [16].

В MF_{NS} при действии растительных экстрактов *S. sendtneri*, *S. roemerii* наблюдалось статистически значимое снижение экспрессии генов: *PDGFC*, *HGF*, *TNFSF8*, *FLT3*, значимое снижение экспрессии *STAB1* обнаружено только при действии *Silene sendtneri*.

В $MF_{IFN-\gamma}$ при действии растительных экстрактов *S. sendtneri*, *S. roemerii* значимое снижение экспрессии наблюдалось у генов: *HGF*, *TNFSF8*, *FLT3*, *STAB1*.

Снижение экспрессии *PDGFC*, *HGF*, *TNFSF8*, *FLT3*, *STAB1* связано с модуляцией процессов заживления ран, ангиогенеза, регенерации тканей и бактерицидной активности [16].

Для подтверждения данных, полученных в эксперименте с микрочипами, среди идентифицированных генов были выбраны *CCL2*, *CCL18*, *VEGFA*, *MMP9* и *S100A9*. Данные представлены на рис. 1.

Согласно экспериментальным данным (рис. 1), под действием растительных экстрактов статистически значимое увеличение экспрессии *CCL2* и *MMP9* наблюдалось в MF_{NS} . Экспрессия *CCL2* в присутствии экстракта *S. sendtneri* увеличилась в 6.4 раза, а в присутствии *S. roemerii* в 7 раз, экспрессия *MMP9* увеличилась под действием *S. roemerii* в 4.3 раза. Экспрессия *VEGFA* была значительно повышена в присутствии растительных экстрактов в $MF_{IFN-\gamma}$. Экспрессия *VEGFA* в присутствии экстракта *S. sendtneri* увеличилась в 2.1 раза, в присутствии *S. roemerii* — в 2.2 раза.

В присутствии растительных экстрактов статистически значимое увеличение экспрессии *S100A9* наблюдалось в MF_{NS} и $MF_{IFN-\gamma}$. Экспрессия *S100A9* в присутствии *S. sendtneri* усиливалась в 5.1 раза в MF_{NS} и в 3.2 раза в $MF_{IFN-\gamma}$. В присутствии *S. roemerii* экспрессия *S100A9* увеличилась в 6.6 раза в MF_{NS} и в 2.6 раза в $MF_{IFN-\gamma}$. В ходе эксперимента для *CCL18* не наблюдалось статистически значимых изменений экспрессии в присутствии растительных экстрактов. В целом результаты ОТ-кПЦР подтвердили дифференциальную экспрессию *CCL2*, *VEGFA*, *S100A9* в присутствии растительных экстрактов.

Среди цитокинов, которые были исследованы с помощью ИФА, в списке дифференциально экспрессированных генов обнаружен ген хемоки-

Таблица 2. Влияние растительных экстрактов на содержание цитокинов в супернатанте

Экстракты		Содержание цитокинов, пг/мл Me (LQ; UQ)											
		TNF- α			IL-6			IL-1 β			CCL-18		
		ns	IFN- γ	IL-4	ns	IFN- γ	IL-4	ns	IFN- γ	IL-4	ns	IFN- γ	IL-4
Нативные		EtOH	0.00 (0.00; 50.66)	25.01 (0.00; 50.66)	0.00	0.00	0.00	0.00 (0.00; 10.66)	9.39 (0.00; 30.74)	0.00 (0.00; 12.09)	59.25 (44.55; 75.77)	0.00 (0.00; 17.91)	434560.27 (308104.23; 590532.78)
		S.s.	69.97 (0.00; 174.04)	405.81 (109.87; 727.98)	0.00	1181.50 (99.42; 11094.15)	647.48 (89.29; 6728.80)	24.45 (11.96; 273.74)	102.06 (19.22; 429.96)	4.04 (0.00; 17.00)	5676.45 (549.34; 34768.04)	49.92 (29.51; 246.64)	946619.79 (686169.81; 1505746.02)
		S.r.	62.13 (0.00; 140.31)	338.41 (83.48; 585.03)	0.00	649.51 (47.59; 8408.90)	582.44 (49.23; 6599.58)	0.00 (0.00; 224.53)	89.39 (15.46; 428.10)	4.17 (0.00; 16.13)	293.14 (228.08; 4130.43)	58.79 (24.26; 97.99)	1081398.51 (714279.90; 1739761.70)
		P	0.508	0.002*	1.00	≤0.001*	≤0.001*	0.242	0.003*	0.754	0.006*	0.019*	0.105
Бесхлорофильные		EtOH	0.00	37.47 (0.00; 81.81)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 (0.00; 11.00)	0.00	66.46 (51.14; 167.97)	17.35 (0.00; 54.95)	470856.10 (370268.81; 525546.60)
		S.s.	19.70 (0.00; 40.03)	337.50 (242.70; 572.55)	0.00	682.35 (330.95; 945.95)	950.37 (580.55; 1126.39)	28.41 (0.00; 64.85)	112.51 (77.61; 210.74)	0.00	1844.23 (771.55; 3347.87)	27.24 (12.19; 38.29)	1419930.05 (1060132.31; 1779229.02)
		S.r.	0.00	207.56 (160.56; 247.27)	0.00	161.60 (69.99; 348.01)	196.08 (92.89; 513.48)	36.24 (31.66; 48.45)	39.11 (32.13; 48.59)	0.00	1243.08 (423.02; 1853.86)	26.22 (11.68; 39.76)	1211310.42 (763866.18; 1636170.27)
		P	0.653	0.005*	1.00	0.005*	0.005*	0.273	0.005*	1.00	0.005*	0.931	0.042*

Примечание. S.s. – *S. sendtneri*, S.r. – *S. roemerii*; стимуляции: ns (без стимуляции), Me – медиана значений, LQ; UQ – нижний и верхний квартили, P – значение достоверности (критерий Фридмана); * существует достоверная разница между исследуемыми группами (критерий Тьюки) ($n = 4$).

Таблица 3. Функциональные группы генов, экспрессия которых повышается при действии экстрактов

Функциональная группа	Ген	Оценка экспрессии (FC \geq 2)			
		NS: S.r. vs Ctrl	NS: S.s. vs Ctrl	IFN- γ : S.r. vs Ctrl	IFN- γ : S.s. vs Ctrl
Цитокин-цитокиновый рецептор	<i>CCL2</i>	12.162*	12.555*	5.598*	5.116*
	<i>IL1R2</i>	2.386	1.875	5.265*	7.212*
	<i>CCL18</i>	1.866	7.428*	0.940	0.912
Ангиогенез	<i>VEGFA</i>	0.912	1.061	2.777*	3.134*
Металлопептидазная активность	<i>MMP9</i>	4.480	3.674	5.696*	6.588*
	<i>MMP14</i>	2.022*	2.051*	4.503*	4.698*
Заживление ран	<i>TNFAIP3</i>	2.487*	1.722	3.482*	3.295*
	<i>S100A9</i>	9.225*	8.005*	3.353*	4.774*
	<i>PLAUR</i>	2.449*	2.732*	2.737*	3.154*
	<i>SERPINB2</i>	3.380*	2.512	1.007	1.017

Примечание. S.s. – *S. sendtneri*, S.r. – *S. roemerii*, Ctrl – контроль (этанол); стимуляции: ns (без стимуляций), * существует достоверная разница между исследуемыми группами ($P < 0.05$).

Таблица 4. Функциональные группы генов, экспрессия которых снижается при действии экстрактов

Функциональная группа	Ген	Оценка экспрессии (FC < 1)			
		NS: S.r. vs Ctrl	NS: S.s. vs Ctrl	IFN- γ : S.r. vs Ctrl	IFN- γ : S.s. vs Ctrl
Цитокин-цитокиновый рецептор	<i>PDGFC</i>	0.414*	0.346*	0.849	0.808
	<i>HGF</i>	0.292*	0.239*	0.526*	0.499*
	<i>TNFSF8</i>	0.333*	0.269*	0.437*	0.362*
	<i>FLT3</i>	0.175*	0.145*	0.283*	0.251*
Ангиогенез	<i>STAB1</i>	0.411	0.290*	0.138*	0.163*

Примечание. Обозначения см. табл. 3.

на CCL18, что указывает на регуляцию этого фактора экстрактами на генетическом уровне. В то время как регуляция продукции других исследованных цитокинов (TNF- α , IL-1 β и IL-6) экстрактами, вероятно, осуществляется на уровне трансляции или пост-трансляционном уровне. Также нельзя исключить, что изменения в экспрессии TNF- α , IL-1 β и IL-6 могут наблюдаться на более ранних временных точках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Нативные экстракты *S. sendtneri*, *S. roemerii* оказывают стимулирующее влияние на продукцию TNF- α , IL-1 β и IL-6, увеличивая их продукцию в 1.2–16.2 раза. Все изученные виды рода *Silene* увеличивают продукцию CCL18 в 2.2–95.8 раза по сравнению с контролем в первичных макрофагах человека.

2. Бесхлорофильные растительные экстракты *S. sendtneri*, *S. roemerii* сохраняют высокую биологическую активность и, подобно нативным экстрактам, увеличивают продукцию TNF- α , IL-1 β и IL-6 в 5.5–9 раз, а CCL18 в 1.5–27.8 раза по сравнению с контролем. Таким образом, экстракты способствуют активации макрофагов.

3. Растительные экстракты *S. sendtneri*, *S. roemerii* влияют на экспрессию нескольких функциональных генов, кодирующих белки (цитокины, рецепторы, факторы роста), которые регулируют

ангиогенез (образование новых кровеносных сосудов) и заживление ран.

Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что экстракты *S. sendtneri*, *S. roemerii* проявляют иммуномодулирующую активность.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Растительный материал

Растительный материал *S. sendtneri*, *S. roemerii* был выращен и собран на коллекционном участке лаборатории фитохимии Сибирского ботанического сада, г. Томск. Растения были идентифицированы ботаниками Н.А. Ивановой, Л.П. Гашковой, А.Л. Эбелем. Ваучеры (ТК-004020, ТК-004016) были сданы на хранение в гербарий им. П.Н. Крылова Биологического института Томского государственного университета. Надземные части отобранных растений (в 3 повторностях) были собраны в фазу цветения.

Приготовление экстрактов

Навеску воздушно-сухого сырья массой 1 г трехкратно экстрагировали 70% этиловым спиртом (15 мл \times 3, время экстракции 24 ч) на водяной бане при температуре 55 $^{\circ}$ C. Полученные экстракты фильтровали и объединяли.

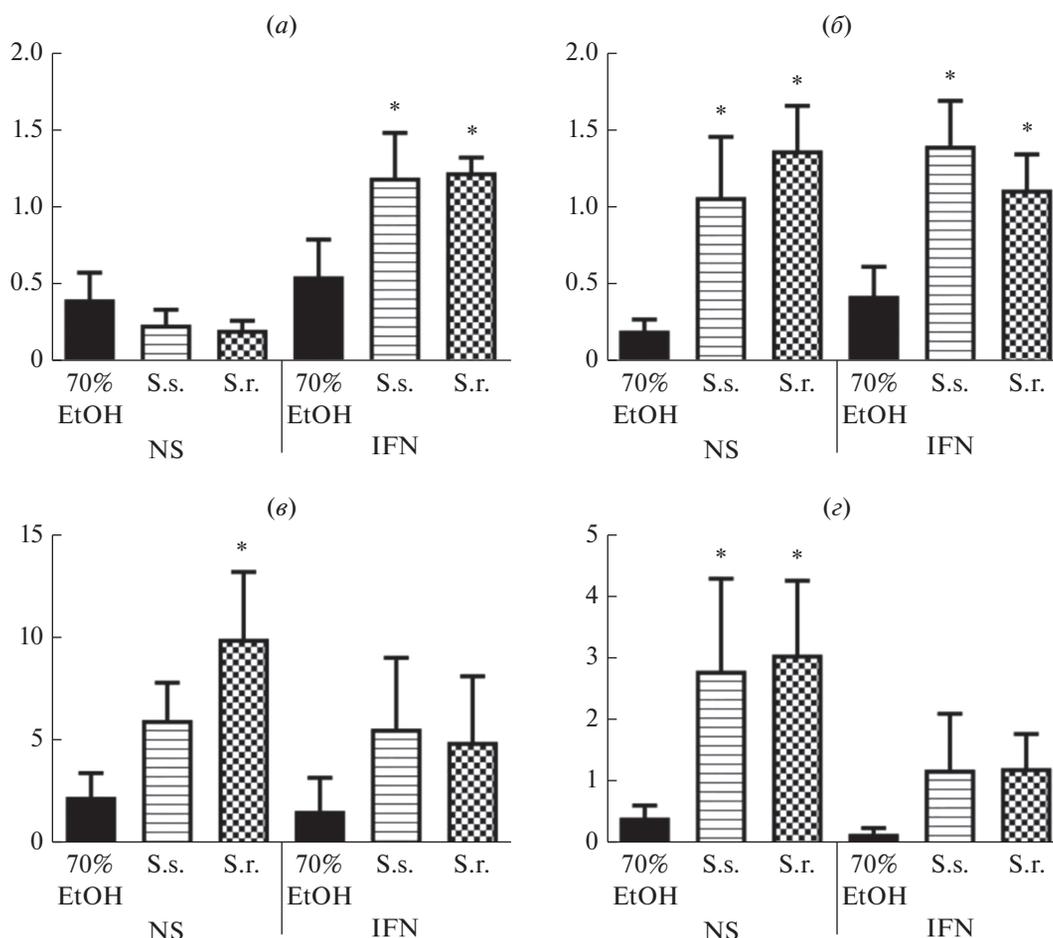


Рис. 1. Уровень экспрессии мРНК генов VEGFA (а), S100A9 (б), MMP9 (в), CCL2 (г) в макрофагах, культивируемых в течение 6 сут в присутствии растительных экстрактов. Примечание: EtOH – этанол (контроль), S.s. – *S. sendtneri*, S.r. – *S. roemeri*; NS – без стимуляции цитокинами, IFN – стимуляция интерфероном γ , * – статистически значимо по сравнению с контролем ($P < 0.05$, $n = 4$, тест Тьюки).

Приготовление бесхлорофильных экстрактов

Воздушно-сухое сырье массой 1 г заливали 10 мл *n*-гексана, затем гексановое извлечение фильтровали. Экстрагирование хлорофиллов *n*-гексаном производили до полного обесцвечивания растворителя. Контроль за полнотой экстракции хлорофиллов осуществляли с помощью спектрофотометра Shimadzu 1800 до отсутствия их максимумов поглощения, которые детектируются в области λ 662–665 нм. Затем сырье сушили и экстрагировали 70% водным этанолом по схеме, описанной выше.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Анализ БАВ проводился с использованием ВЭЖХ, жидкостной хроматограф с диодно-матричным детектором “Shimadzu LC20” (Япония). Хроматографическая колонка Perfect Sil Target ODS-3; 4.6×250 мм, с размером зерна сорбента 5 мкм. Элюент А: смесь ацетонитрила, изопропилового спирта (5 : 2 по объему), элюент В: 0.1% трифторуксусная кислота. Время анализа 60 мин.

Скорость элюирования 1 мл/мин. Режим элюирования: градиент низкого давления; программа градиента: 0–40 мин 15–35% элюент А, 40–60 мин 35% элюент А. Объем пробы 10 мкл. Используются аналитические длины волн 272 нм для регистрации флавоноидов, 254 нм – фитоэктистероидов. Фенольные соединения были идентифицированы с использованием стандартов (Sigma-Aldrich, США; HWI group, Германия; чистота $\geq 95.0\%$). Выделенные фитоэктистероиды из других растительных объектов идентифицированы с помощью масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии [4] и использованы в качестве стандартов. Содержание БАВ рассчитывали по площадям пиков образца и соответствующих стандартов с помощью калибровочной кривой, построенной с использованием программного обеспечения LC Postrun Calibration Curve.

Выделение моноцитов

Моноциты выделяли из лейкоцитарной пленки как описано в работе [17]. Моноциты выделя-

Таблица 5. Олигонуклеотиды, использованные для анализа ОТ-кПЦР

Гены	Последовательность праймеров (5' > 3')
<i>CCL2</i>	F: TCAAAGCTGAAGCTCGCACTC R: ATTGATTGCATCTGGCTGAG Probe: TCTCTGCCGCCCTTCTGTGC
<i>CCL18</i>	F: ATACCTCCTGGCAGATTCCAC R: GCTGATGTATTTCTGGACCCAC Probe: CAAGCCAGGTGTCATCCTCCTAACCAAGAGAG
<i>GAPDH</i>	F: CATCCATGACAACCTTTGGTATCGT R: CAGTCTTCTGGGTGGCAGTGA Probe: AAGGACTCATGACCACAGTCCATGCC

ли в градиенте плотности с последующей положительной магнитной селекцией с использованием шариков CD14 + MACS (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Германия). Клетки ресуспендировали в бессывороточной среде Macrophage (GIBCO) в концентрации 2×10^6 клеток на мл с добавлением дексаметазона (Sigma) при 1×10^{-8} М и М-CSF 5 нг/мл (Peprotech). Клетки стимулировали с использованием следующих цитокинов: INF- γ (Peprotech) в концентрации 100 нг/мл, IL-4 (Peprotech) в концентрации 10 нг/мл. Клетки инкубировали при 37°C и 7.5% CO₂ в течение 6 сут в среде в присутствии растительных экстрактов или этанола (контроль) в соотношении 1 мкл образца на 500 мкл среды. На 6-е сут собирали супернатант и выделяли РНК. Кровь для выделения моноцитов получена от здоровых доноров *Службой крови Немецкого Красного Креста Баден-Вюртемберг-Гессен*. (German Red Cross Blood Service Baden-Württemberg-Hessen).

Анализ продукции цитокинов

Продукцию цитокинов анализировали в супернатанте с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), используя наборы для ИФА из R&D systems (Wiesbaden, Germany). ИФА проводили согласно рекомендациям производителя. Использовали Human TNF- α DuoSet Elisa (DY210), Human IL-1 β DuoSet Elisa (DY201), Human IL-6 DuoSet Elisa (DY206), Human CCL 18/PARC DuoSet Elisa (DY394).

Анализ микрочипами

Тотальную РНК выделяли из клеток, используя набор E.Z.N.A.® Total RNA Kit (Omega Bio-Tek, США), в соответствии с рекомендациями производителя, на 6-й день культивирования. Мечение, гибридизация и сканирование GeneChip Human Gene 1.0 ST Array было выполнено в Медицинском исследовательском центре Медицинского факультета Мангейма (Medical Research Center of Medical Faculty Mannheim, Германия). Функциональные группы генов были выбраны с использованием базы данных Molecular Signatures Database, v5.2 (Broad Institute, США).

Полимеразная цепная реакция в реальном времени с реакцией обратной транскрипции (ОТ-кПЦР)

Относительную количественную оценку экспрессии генов проводили с помощью ОТ-кПЦР с использованием предварительно разработанных анализов генов *TaqMan* для *MMP9* (идентификатор анализа Hs00234579_m1), *VEGFA* (Hs00900055_m1) и *S100A9* (Hs00610058_m1) (ThermoFisher Scientific, Дармштадт, Германия), самоанализ *CCL2*, *CCL18*, в качестве гена-рефери использовали ген “домашнего хозяйства” *GAPDH* и уровень экспрессии каждого целевого гена нормализовали по отношению к экспрессии *GAPDH* (последовательности праймеров указаны в табл. 5).

Статистический анализ

Обработка данных по содержанию цитокинов выполнялась с использованием программы SigmaPlot 13.0. Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха. Значение *P* статистической значимости определяли по критерию Фридмана. Тест Тьюки проводили для парных сравнений с контролем ($P < 0.05$).

Анализ экспрессии генов выполнялся в Microsoft Excel 2007, уровень экспрессии (FC) рассчитывали как log₂. Сравнительный анализ уровней экспрессии проводили между (vs) экстрактами и контролем.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность за помощь в выполнении настоящей работы сотрудникам Института трансфузионной медицины и иммунологии (г. Мангейм, Германия) В. Рябову, А. Гудима, руководителю отдела врожденного иммунитета и толерантности Ю.Г. Кжышковой, а также сотрудникам Медицинского исследовательского центра Медицинского факультета Мангейма: техническим ассистентам М. Мусик и К. Де Ла Торре за анализ микрочипами, доктору К. Штихту за статистический анализ данных микрочипов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Программы повышения международной конкурентоспособности Томского государственного университета на 2013–2020 гг. Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства образования и науки России, проект № 37.7810.2017/8.9.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Italiani P., Boraschi D.* // *Front. Immunol.* 2014. V. 5. P. 514.
2. *Brown B.N., Ratner B.D., Goodman S.B., Amar S., Badylak S.F.* // *Biomaterials.* 2012. № 33. P. 3792–3802.
3. *Фрейдлин И.С., Толоян А.А.* Клетки иммунной системы. В 2 т. СПб.: Наука, 2000. Т. 2. Моноциты. 231 с. ISBN 5-02-026131-9.
4. *Zibareva L., Yeriomina V.I., Munkhjargal N., Girault J.-P., Dinan L., Lafont R.* // *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 2009. V. 72. № 4. P. 234–248.
5. *Абубакиров Н.К.* // *Химия природных соединений.* 1981. № 6. С. 685–702.
6. *Зибарева Л.Н., Алиев О.И., Колтунов А.А., Плотников М.Б.* Гемореологическое средство: пат. 2160592 Рос. Федерация : МПК⁷ А61К 31/575, А61Р 7/00, 7/02; заявитель и патентообладатель Научно-исследовательский институт фармакологии ТНЦ РАМН, Сибирский ботанический сад ТГУ. № 96118150/14; заявл. 11.09.96; опубл. 20.12.00, Бюл. № 35. 5 с.
7. *Zibareva L., Volodin V., Saatov Z., Savchenko T., Whiting P., Lafont R., Dinan L.* // *Phytochemistry.* 2003. V. 64. № 2. P. 499–517.
8. *Kim H.P., Son K.H., Chang H.W., Kang S.S.* // *J. Pharmacol. Sci.* 2004. V. 96. № 3. P. 229–245.
9. *Дармограй С.В., Фурса Н.С., Ерофеева Н.С.* // *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова.* 2013. № 1. С. 123–132.
10. *Смолякова И.М., Калинин Г.И., Березовская Т.П., Дмитрук С.Е., Зибарева Л.Н., Свиридова Т.П.* // *Фармация.* 2004. № 5. С. 20–22.
11. *Зибарева Л.Н.* Фитоэктистероиды растений семейства *Caryophyllaceae* / Л.Н. Зибарева. Саарбрюккен: Lambert Academic Publishing GmbH&Co, 2012. 195 с. ISBN 978-3-8473-1785-2.
12. *Krylova S.G., Zueva E.P., Zibareva L.N., Amosova E.N., Razina T.G.* // *Bulletin Experiment. Biology and Medicine.* 2014. V. 158. № 2. P. 225–228. <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2728-1>
13. *Chandra S., Rawat D.S.* // *Integrative Medicine Research.* 2015. V. 4. № 3. P. 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2015.06.004>
14. *Subramoniam A., Asha V.V., Nair S.A., Sasidharan S.P., Sureshkumar P.K., Rajendran K.N., Karunagaran D., Ramalingam K.* // *Inflammation.* 2012. V. 35. № 3. P. 959–966.
15. *Park S., Choi J.J., Park B.-K., Yoon S.J., Choi J.E., Jin M.* // *Life Sciences.* 2014. V. 103. № 2. P. 59–67.
16. GeneCards®: The Human Gene Database [Электронный ресурс]. URL: <http://www.genecards.org>.
17. *Kzhyshkowska J., Gratchev A., Martens J.H., Pervushina O., Mamidi S., Johansson S., Schledzewski K., Hansen B., He X., Tang J., Nakayama K., Goerdts S.* // *J. Leukocyte Biology.* 2004. V. 76. № 6. P. 1151–1161. <https://doi.org/10.1189/jlb.0504300>

Assessment of the Effects *Silene roemerii*, *S. sendtneri* Ethanol Extracts on Human Monocytes/Macrophages

E. S. Filonenko*, # and L. N. Zibareva*

*Phone: +7 (3822) 529-724; e-mail: filonenkoelenaserg@mail.ru

* *Siberian Botanical Garden, Tomsk State University, pr. Lenina 36, Tomsk, 634050 Russia*

Immunomodulatory and immunocorrective therapies are important approaches to foster immunity. Biologically active substances (BAS) of plants, exhibiting a wide spectrum of pharmacological activity, can act as agents mobilizing immune system. Plants belonging to the family *Caryophyllaceae*, including *S. sendtneri*, *S. roemerii*, are rich in ecdysteroids and flavonoids, the compounds characterized by large variety of biological activities with potential impact on human immune system. In this study the influence of native and chlorophyll-free plant extracts of *S. sendtneri*, *S. roemerii* on human monocyte-derived macrophages was examined. The production of cytokines was assessed using ELISA. Gene expression microarrays and RT-qPCR analysis were used to determine differentially expressed genes under the influence of extracts. The results of the experiments showed that analyzed species increased production of M2-associated chemokine CCL18 in macrophages. In addition, the species *Silene* induced the production of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6). The identified activity was detected both in native and chlorophyll-free extracts. Furthermore, plant extracts of *S. sendtneri*, *S. roemerii* influenced the expression of *CCL2*, *MMP9*, *VEGFA*, and *S100A9* genes in human macrophages. Overall, our results indicate that plant extracts of the species *Silene* reveal immunomodulatory effects by influencing macrophage activation in vitro.

Keywords: Silene, Caryophyllaceae, macrophages, proinflammatory and anti-inflammatory cytokines



УДК 577.112.4

СИНТЕЗ КОНЬЮГАТОВ ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА С АЛЕНДРОНОВОЙ КИСЛОТОЙ И ИХ СВОЙСТВА

© 2020 г. Т. И. Есина^{*,#}, Е. А. Волосникова^{*},
Л. Р. Лебедев^{*}, Г. В. Кочнева^{**}, А. А. Гражданцева^{**}

^{*}Институт медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора,
Россия, 633010, Новосибирская обл., г. Бердск, ул. Химзаводская, 9

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

Поступила в редакцию 25.07.2019 г.

После доработки 24.12.2019 г.

Принята к публикации 24.12.2019 г.

С целью создания препарата направленного действия изучены процессы конъюгации рекомбинантного человеческого гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) с алендроновой кислотой. Реакции конъюгирования проводили в растворе и на твердом носителе. Показано, что GM-CSF в составе конъюгатов сохраняет свои биологические свойства. Конъюгаты GM-CSF с алендроновой кислотой проявляют более высокое сродство к гидроксипатиту, аналогу минерального матрикса кости, чем исходный белок.

Ключевые слова: гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, конъюгаты с алендроновой кислотой, синтез, свойства

DOI: 10.31857/S0132342320030112

ВВЕДЕНИЕ

Природный человеческий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) является важнейшим регуляторным фактором – цитокином, обеспечивающим рост, созревание и функциональную активность многих клеток крови, в частности гранулоцитов и макрофагов. Лекарственные средства на основе GM-CSF активно применяют как стимуляторы кроветворения для восстановления числа нейтрофилов и лейкоцитов у больных нейтропенией, у онкологических больных, проходящих химиотерапию и лучевую терапию, при пересадках костного мозга, органов, тканей, для лечения тяжелых инфекционных заболеваний, в том числе ВИЧ. Применение GM-CSF при онкологических заболеваниях способствует стабилизации состояния больных и уменьшению метастатических опухолей, но его применение затруднено большой токсичностью препарата [1]. Создание адресных средств доставки GM-CSF в костный мозг позво-

лит уменьшить дозу препарата и увеличить эффективность терапии.

Известны и описаны методы ковалентного присоединения молекул белков цитокинов к различным носителям (монометоксиполиэтиленгликоль, полиглюкин, поливинилпирролидон, дивиниловый эфир) [2–4]. В качестве средств, направляющих в костную ткань (клетки костного мозга), в ряде работ используются бифосфонаты (бифосфонаты, BPs), которые соединяются с кальцием костных клеток, что объясняет их высокую аффинность к костной ткани. Доказанным свойством бифосфонатов является быстрое и массивное накопление в костной ткани (около 55% от введенной дозы после однократного внутривенного введения) [5]. Исследованы также некоторые методы получения конъюгатов BPs с лекарственными средствами [6–9]. Результатом работ по созданию конъюгатов BPs с биологически активными соединениями разной природы и спектра биологического действия является увеличение длительности лекарственного воздействия в костном матриксе, времени полужизни активного вещества, повышение фармакологической эффективности и снижение системных побочных эффектов [10–13].

Целью исследования являлась разработка способов получения конъюгатов лекарственного

Сокращения: GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; ALN – алендроновая кислота; BPs – бифосфонаты; EDC – 1-этил-3-[3-диметиламинопропил] карбодимид; HAP – гидроксипатит; ПААГ – полиакриламидный гель.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (383) 363-80-14; факс: +7 (383) 363-80-16; эл. почта: esina_ti@vector.nsc.ru).

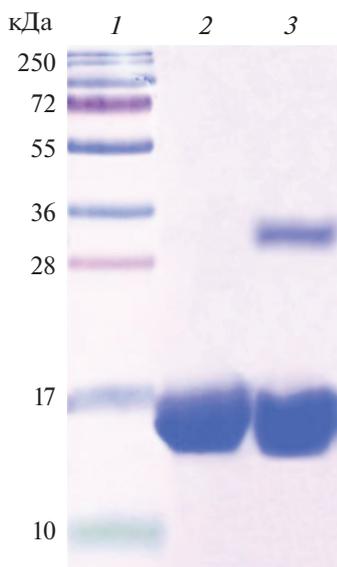


Рис. 1. Анализ продуктов реакции конъюгирования GM-CSF и ALN в растворе с помощью EDC (3), 1 – маркеры молекулярных масс 10–250 кДа, 2 – GM-CSF, 20 мкг/лунка (контроль.) Электрофорез в 15% ПААГ в восстанавливающих условиях, окрашивание Кумасси R-250.

препарата GM-CSF с представителем ВРs – алендроновой кислотой для их направленной доставки к клеткам-мишеням костного мозга и определение их биологической активности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее, на примере конъюгатов ФНО-альфа с алендроновой кислотой ((4-амино-1-гидроксибутилиден)дифосфоновая кислота, ALN), было показано их повышенное сродство к костному матриксу при сохранении биологической активности [14]. Необходимо было выбрать параметры реакций конъюгирования GM-CSF с ALN, позволяющие сохранять активность GM-CSF. При проведении реакции конъюгации для минимизации конформационных изменений молекул белка, способных влиять на их связывание с рецепторами, были использованы эквимольные количества компонентов.

Синтез конъюгатов в растворе

Синтез конъюгата аминоксифосфоната с GM-CSF через карбоксильную группу белка с использованием 1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимида (EDC). Субстанцию GM-CSF смешивали с раствором сшивающего агента в пропорции 1 : 1 (моль/моль) и инкубировали при перемешивании (6 ± 2)°C, 1 ч. Затем в реакционную среду вносили эквимольное количество ALN и продолжали инкубацию при тех же условиях в течение

1 ч. По завершении инкубации полученный конъюгат диализовали против физиологического раствора.

При анализе продуктов синтеза с использованием EDC в образце с помощью электрофоретического анализа [15] в 15% ПААГ регистрировали две белковые фракции, с молекулярными массами 15.4 и 31.5 кДа, что соответствует молекулярной массе исходного GM-CSF и его димера соответственно (рис. 1). Гомогенность полученного препарата мономера составила 79.4%.

В случае коротких белков, таких как GM-CSF, подобные модификации в виде ди- и тримера могут быть критичны для сохранения специфической активности белка.

Синтез конъюгата аминоксифосфоната с GM-CSF через аминоксифосфонатную группу белка с использованием в качестве сшивающего агента молекулы декстрана с помощью реакции Маллапрада [16]. В раствор вносили декстран с молекулярной массой 40 кДа (“Appli-Chem” (Германия) и периодат натрия в соотношении 1 : 40 (моль/моль) перемешивали и инкубировали (22–24°C, 1 ч). Затем активированный декстран отделяли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25 и вносили растворы белка и ALN в эквимольных соотношениях, на 1 моль декстрана 1 моль белка и 1 моль ALN, инкубировали 3 ч при 22–24°C, после чего полученный конъюгат отделяли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25.

На денситограмме продукты синтеза регистрируются рядом перекрывающихся пиков (рис. 2a). При проведении электрофоретического анализа полученного конъюгата в 15% ПААГ на электрофореграмме видно, что препарат гетерогенный, визуализируется в виде белковой фракции соответствующей GM-CSF (15.4 кДа, содержание которой – 57.5%) и спектра полос с молекулярными массами 16, 32, 80, 120, 250 кДа (рис. 2б).

Синтез конъюгатов на твердой фазе

В качестве твердой фазы использовали гидроксилпатит (НАР). Синтез конъюгатов с помощью EDC осуществляли двумя способами: методом прямой (белок → EDC → ALN) и обратной (ALN → EDC → белок) последовательности нанесения компонентов на сорбент.

При проведении синтеза методом прямой последовательности на колонку с НАР, уравновешенную 2 мМ калий-фосфатным буфером, pH 7.0, наносили GM-CSF в объеме, соответствующем 1/3 объема колонки. После нанесения перекрывали выход раствора из колонки на 2 часа для сорбции GM-CSF на НАР. Затем сорбент отмывали 2 мМ калий-фосфатным буфером, pH 7.0 и наносили раствор сшивающего агента EDC в объеме, соответствующем 1/3 объема колонки.

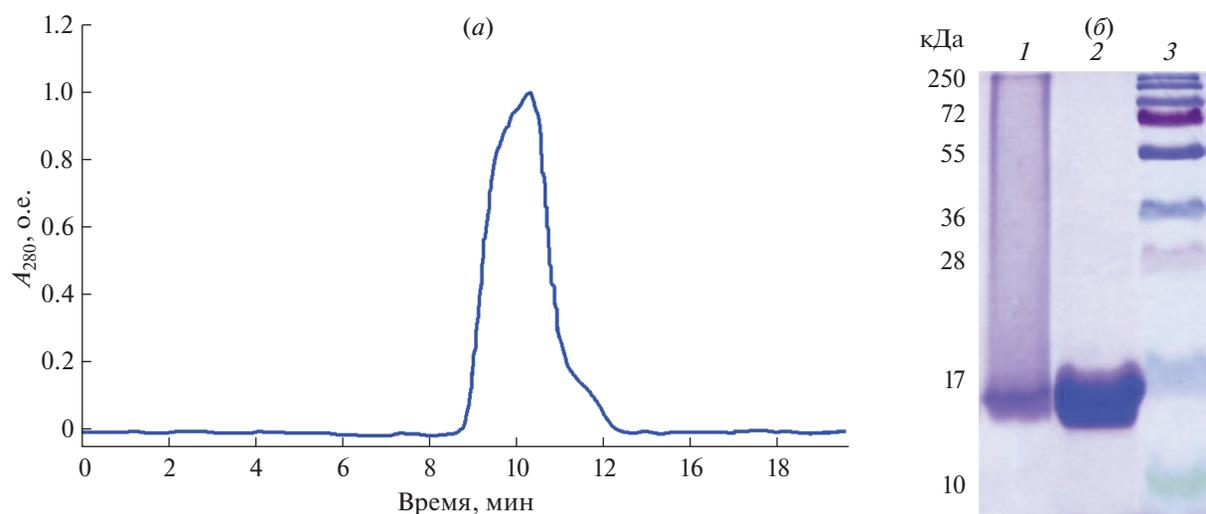


Рис. 2. Профиль гель-фильтрации конъюгата GM-CSF и ALN, полученного с использованием активированного декстрана, на колонке с сефадексом G-25 (а), на оси ординат: оптическое поглощение раствора при 280 нм, о.е., на оси абсцисс – время элюции, мин. Электрофореграмма образцов конъюгата в 15% ПААГ в восстанавливающих условиях, окрашивание Кумасси R-250 (б): конъюгат GM-CSF и ALN, полученный с использованием декстрана, 20 мкг (1); GM-CSF, 20 мкг (2); белковый маркер 10–250 кДа (3).

Выход раствора из колонки вновь перекрывали на 2 ч для проведения реакции, после чего на колонку отмывали тем же буфером и наносили раствор ALN в объеме, соответствующем 1/3 объему колонки. Длительность реакции на этой стадии составляла 2 часа. Элюцию конъюгатов проводили 0.2 М калий-фосфатным буфером, pH 7.0. Полученный конъюгат диализовали против физиологического раствора.

При проведении синтеза методом обратной последовательности на колонку с НАР, уравновешенную 2 мМ калий-фосфатным буфером, pH 7.0, первым наносили раствор ALN, вторым – EDC и последним – раствор белка GM-CSF. В остальной процедуре проведения синтеза соответствовала описанной выше.

На рис. 3 приведены профиль хроматографии конъюгата GM-CSF с ALN на колонке с НАР и электрофореграмма хроматографических фракций. Видно, что конъюгат элюируется с колонки в виде одного узкого пика (рис. 3а). При прямой последовательности синтеза в полученном конъюгате присутствует основная белковая фракция соответствующая GM-CSF (15.4 кДа) и дополнительная фракция на уровне 32 кДа, что соответствует молекулярной массе его димера, гомогенность полученного препарата мономера – 86.5% (рис. 3б). При обратной последовательности синтеза дополнительные белковые фракции в составе образца отсутствуют, гомогенность полученного препарата – 98.1% (рис. 3б). Определение содержания неконъюгированного GM-CSF показало, что количество элюируемого 0.01 М ка-

лий-фосфатным буфером, pH 7.0, белка не превышало 5% от нанесенного на колонку. После снятия конъюгата с целью определения остаточных количеств белка колонку промывали 1–2 М калий-фосфатным буфером, pH 7.0. Дополнительной элюции белка при этом не наблюдали. Таким образом, выход конъюгата в реакции синтеза составлял около 95%.

В табл. 1 представлены характеристики конъюгатов GM-CSF с ALN, полученных разными методами. Для определения активности препаратов были взяты идентичные количества конъюгатов.

Из результатов, приведенных в табл. 1 видно, что метод с использованием фиксации активных компонентов на твердой фазе позволяет получать конъюгаты высокой степени гомогенности (86.5–98.1%) и с высокой специфической активностью (0.24–0.38 нг/мл), что свидетельствует о сохранности структуры белка в их составе и возможности использования для создания лекарственных препаратов. Конъюгаты, полученные методом синтеза в растворе с использованием EDC обладает меньшей гомогенностью (79.4%) и активностью (0.41 нг/мл) и не представляют интереса для дальнейших исследований. Конъюгаты, полученные в растворе с использованием декстрана, несмотря на их гетерогенность (57.5%), являются перспективными для изучения, так как демонстрируют высокую специфическую активность (0.24 нг/мл).

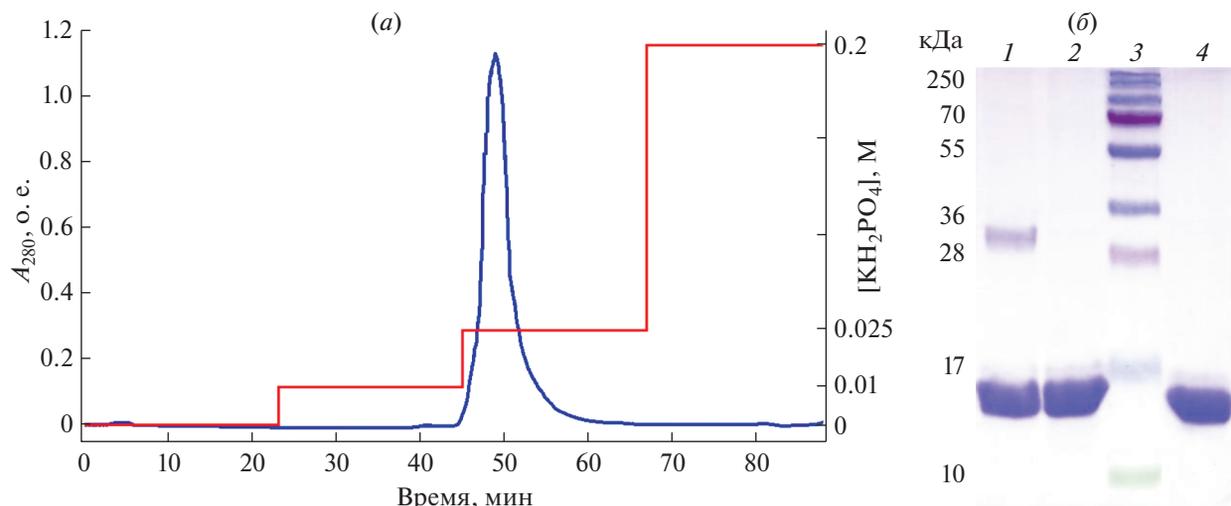


Рис. 3. Профиль элюции конъюгата GM-CSF-ALN, полученного EDC-методом, на колонке с HAP (а), на оси ординат: оптическое поглощение раствора при 280 нм, о.е. (левая ось), молярность элюирующего буфера, М (справа); на оси абсцисс – время элюции, мин. Электрофореграмма образцов конъюгатов, полученных прямой (белок → EDC → ALN) и обратной (ALN → EDC → белок) последовательности нанесения компонентов на сорбент в 15% ПААГ в восстанавливающих условиях, окрашивание Кумасси R-250 (б). Конъюгат GM-CSF с ALN, прям., 20 мкг/лунка (1); конъюгат GM-CSF с ALN, обратн., 20 мкг/лунка (2); белковый маркер 10–250 кДа (3); контроль, GM-CSF, 20 мкг/лунка (4).

Данные об уровне связывания конъюгатов GM-CSF и ALN с HAP in vitro

На примере конъюгатов ФНО-альфа с ALN было показано их накопление в костной ткани *in vivo* [17].

При проведении экспериментов по изучению тропности образцов конъюгатов к костномозго-

вому окружению использовали HAP – аналог минерального вещества кости млекопитающих [18].

Определение сродства конъюгатов GM-CSF с ALN к HAP проводили методом хроматографии на колонке с HAP в сравнении со свободным GM-CSF. Было установлено, что все полученные образцы конъюгатов GM-CSF с ALN, также как GM-CSF, обладали способностью сорбироваться на HAP.

Таблица 1. Характеристики конъюгатов GM-CSF и ALN, полученных разными методами

Исследуемый образец	Активность GM-CSF, нг/мл	Гомогенность препарата, %	Молекулярные массы фракций, кДа	Сродство к гидроксиапатиту (концентрация буфера для элюции, моль/л)
Исходный GM-CSF	0.28	98.2	15.4	0.010 ± 0.002
Конъюгаты, полученные на твердой фазе				
Конъюгат, полученный методом прямой последовательности (белок → EDC → ALN)	0.38	86.5	15.4; 32	0.025 ± 0.002
Конъюгат, полученный методом обратной последовательности (ALN → EDC → белок)	0.28	98.1	15.4	0.025 ± 0.002
Конъюгаты, полученные в растворе				
Конъюгат, полученный с использованием декстрана	0.24	57.5	15.4; 16; 32; 80; 120; 250	0.025 ± 0.002
Конъюгат, полученный с использованием EDC	0.41	79.4	15.4; 31.5	0.025 ± 0.002

В ходе работы показано, что количественная десорбция свободного GM-CSF может быть достигнута с помощью элюирующего раствора калия фосфата с концентрацией соли 0.010 ± 0.002 М. Для конъюгата GM-CSF с ALN, полученных методом твердофазного синтеза, эта концентрация была в 2.5 раза выше (0.025 ± 0.002 М калия фосфата). Профили десорбции, представленные на рисунке (рис. 4а и 4б), подтверждают факт более прочного удержания гидроксиапатитом конъюгата GM-CSF с ALN в сравнении с GM-CSF.

Конъюгаты, полученные с использованием в качестве сшивающего агента декстрана, также отличались повышенной способностью к связыванию с НАР (рис. 4в).

Таким образом, в ходе работы исследованы методы синтеза конъюгатов GM-CSF и ALN через карбоксильную и аминокислотную группу белка с помощью сшивающих агентов разных типов. Показано, что при проведении реакции конъюгирования в растворе, получаемые конъюгаты гетерогенны, тогда как метод с использованием фиксации активных компонентов на НАР позволяет получать конъюгаты высокой степени гомогенности (до 98.1%). Выход конъюгата по белку в реакции синтеза на твердой фазе составлял около 95%. Исследование специфической активности GM-CSF в составе конъюгатов подтвердило сохранность биологических свойств белка. Результаты исследования показали, что конъюгаты GM-CSF с ALN, полученные с помощью EDC и декстрана, обладают большим сродством к НАР – аналогу минерального матрикса кости, чем исходный белок. Полученные данные демонстрируют возможность создания препаратов на основе GM-CSF с повышенной тропностью к клеткам-мишеням кровяной ткани, расположенной в костном мозге, что позволит снизить вводимые дозы препарата и его побочные эффекты.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы фирм “Appli-Chem” (Германия), “Sigma-Aldrich” (США), “Bio-Rad” (США), “Sample” (Япония), “Gerbu” (Германия). Для отработки методов синтеза использовали препарат рекомбинантного GM-CSF человека (субстанция) с концентрацией белка 1.15 мг/мл и удельной специфической активностью 0.28 нг/мл производства ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” [19].

Процесс получения конъюгатов проводили с помощью ковалентного присоединения аллендроновой кислоты к молекуле GM-CSF двумя способами: через карбоксильную группу белка с использованием EDC и через аминокислотную группу белка с помощью реакции Малапрада с использованием в качестве сшивающего агента молекулы декстрана.

Синтез конъюгата аминокислотного фосфоната с GM-CSF через карбоксильную группу белка с использованием EDC. Для проведения синтеза брали эквимолярные количества субстанции GM-CSF, растворов EDC и ALN. Полученные конъюгаты диализовали против физиологического раствора, стерильно разливали и замораживали при минус 20°C.

Синтез конъюгата аминокислотного фосфоната с GM-CSF через аминокислотную группу белка с помощью реакции Малапрада. Для проведения синтеза декстран (40 кДа) активировали периодатом натрия в соотношении 1 : 40 (моль/моль) и отделяли на колонке с сефадексом G-25, используя для гель-фильтрации 25 мМ натрий карбонатный буфер, pH 8.3. К активированному декстрану добавляли субстанцию белка GM-CSF и ALN в эквимолярных количествах. Реакцию проводили 3 ч при 22–24°C. Затем полученный конъюгат отделяли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25 в изотоническом растворе.

Синтез конъюгатов на твердой фазе

В качестве твердой фазы для конъюгирования использовали колонку с НАР. Компоненты реакционной смеси наносили на колонку последовательно. Элюцию конъюгатов проводили 0.2 М калий-фосфатным буфером, pH 7.0. Полученный раствор конъюгата стерильно разливали и замораживали при минус 20°C.

Для оценки гомогенности и молекулярной массы белковых компонентов конъюгатов GM-CSF с ALN использовали метод вертикального гель-электрофореза в 15% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях с последующим окрашиванием красителем Кумасси R-250 [15]. Результаты электрофореза анализировали с помощью компьютерной программы GelPro 3.2.

Биологическую активность GM-CSF в конъюгатах оценивали *in vitro* по уровню стимуляции пролиферации цитокин-зависимых клеток эритролейкоза человека TF-1. Данный тест основан на способности клеток линии TF-1 пролиферировать в присутствии GM-CSF. Пролиферативную активность оценивали микрометодом на 96-луночных культуральных планшетах с использованием реагента ХТТ (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфо-фенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксанилид). Метод основан на способности митохондриальных дегидрогеназ конвертировать водорастворимый ХТТ в формазан, который кристаллизуется внутри клетки. Перевод формазана в раствор с помощью фенозин-метасульфата (PMS) и последующая фотометрия позволяют точно соотносить изменение оптической плотности раствора с изменением количества жизнеспособных клеток. Для калибровки активности GM-CSF в исследуемых субстанциях использовали очищенный и охарактеризованный препарат рекомбинантного GM-CSF,

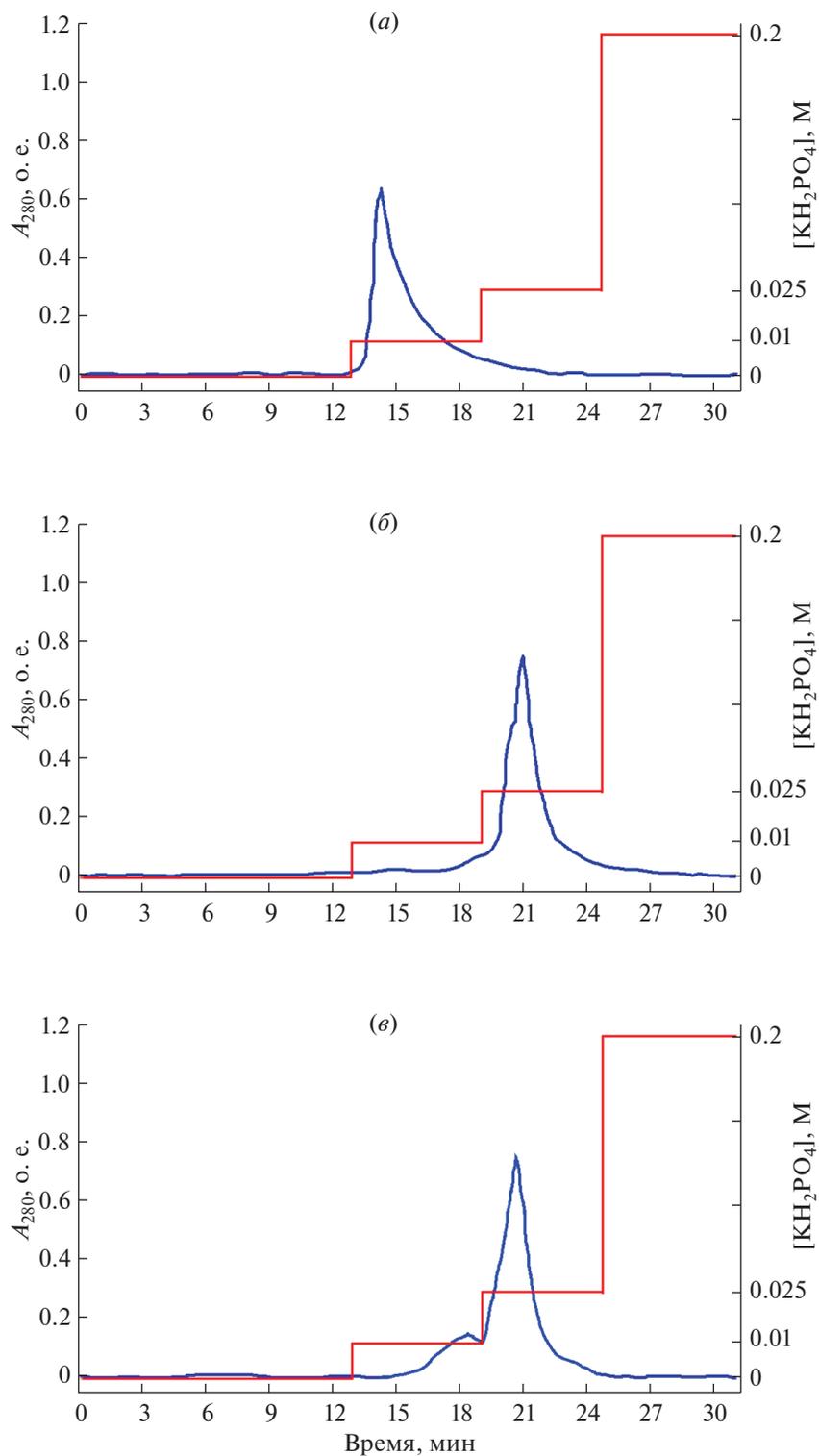


Рис. 4. Кривая десорбции с NAR свободного GM-CSF (а) GM-CSF в составе конъюгата, полученного с помощью EDC (б) и GM-CSF в составе конъюгата, полученного с помощью активированного декстрана (в). На оси ординат: оптическое поглощение раствора при 280 нм, о.е. (левая ось), молярность элюирующего буфера, М (справа); на оси абсцисс – время элюции, мин.

полученный в клетках *E. coli* [20, 21]. Для проведения эксперимента в среде RPMI (Invitrogen) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки готовили 2-кратные разведения исследуемого и контрольного препаратов (калибровка) в диапазоне 8.0–0.25 нг/мл. В качестве контроля использовали среду RPMI (Invitrogen) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone). В лунки 96-ти луночного планшета вносили 50 мкл вышеуказанных разведений или контрольных образцов и добавляли 50 мкл суспензии клеток TF-1 в среде RPMI с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки по 104 клеток/лунка. Планшеты помещали в термостат при температуре 37°C, 5% CO₂, влажности 85% и инкубировали 72 часа. После инкубации в каждую тестируемую лунку добавляли 50 мкл реагента ХТТ (Sigma) и PMS (Fluka), который получали добавлением к рабочему раствору с содержанием ХТТ 1 мг/мл раствора PMS 1.25 мМ из расчета: на каждый мл ХТТ – 20 мкл PMS. Планшет инкубировали еще 4 часа и определяли оптическую плотность ОП490/620 на планшетном спектрофотометре SpectraCount (Packard). Каждую точку делали в пяти повторностях, определяли среднее значение и дисперсию для различных концентраций GM-CSF, строили гистограмму зависимости ОП от разведений и концентрации. Стимуляцию пролиферации TF-1 клеток рассчитывали в процентах по отношению к контролю. За 100% принимали количество живых клеток в отрицательном контроле. Все расчеты проводили с использованием программного обеспечения LabView.

Накопление конъюгатов GM-CSF и ALN на модели костного матрикса (НАР) в условиях *in vitro* проводили методом хроматографии на НАР, как описано в [22]. Десорбцию проводили линейным градиентом соли 0.01–0.2 М калий фосфатный буфер, pH 7.0.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального государственного бюджетного учреждения “Российский фонд фундаментальных исследований” (РФФИ), проект в рамках конкурса “Мой первый грант”, заявка № 18-315-00236\18.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Steward W.P., Scarffe J.H., Austin R., Bonnem E., Thatcher N., Morgenstern G., Crowther D. // Br. J. Cancer. 1989. V. 59. № 1. P. 142–145.
2. Kamada H., Tsutsumi Y., Yamamoto Y., Kihira T., Kaneda Y., Mu Y., Tsunoda S., Nakagawa S., Mayumi T. // Cancer Res. 2000. V. 60. № 22. P. 6416–6420.
3. Li Y.P., Pei Y.Y., Zhang X.Y., Gu Z.H., Zhou Z.H., Yuan W.F., Zhou J.J., Zhu J.H., Gao X.J. // J. Control. Release. 2001. V. 71. № 2. P. 203–211.
4. Шмелев В.А. // Интерферон-гамма, фактор некроза опухолей, тимозин-альфа1 – противоинфекц. и противоопух. цитокины и препарат. Медпрактика-М, 2008.
5. Caraglia M., Marra M., Naviglio S., Botti G., Addeo R., Abbruzzese A. // Expert Opin. Pharmacother. 2010. V. 11. № 1. P. 141–154.
6. Herczegh P., Buxton T.B., McPherson J.C., Kovács-Kulyassa A., Brewer P.D., Sztaricskai F., Stroebel G.G., Plowman K., Farcasiu D., Hartmann J.F. // J. Med. Chem. 2002. V. 45. № 11. P. 2338–2341.
7. Doschak M.R., Kucharski C.M., Wright J.E., Zernicke R.F., Uludag H. // Mol. Pharm. 2009. V. 6. № 2. P. 634–640.
8. Hirabayashi H., Takahashi T., Fujisaki J., Masunaga T., Sato S., Hiroi J., Tokunaga Y., Kimura S., Hata T. // J. Control. Release. 2001. V. 70. № 1–2. P. 183–191.
9. Ora M., Lonnberg T., Florea-Wang D., Zinnen S., Karpeisky A., Lonnberg H. // J. Org. Chem. 2008. V. 73. № 11. P. 4123–4130.
10. Giger E.V., Puigmartí-Luis J., Schlatter R., Castagner B., Dittrich P.S., Leroux J.C. // J. Control. Release. 2011. V. 150. № 1. P. 87–93.
11. Yewle J.N., Puleo D.A., Bachas L.G. // Biomaterials. 2013. V. 34. № 12. P. 3141–3149.
12. Cheng T.L., Wang Y.U. // J. Colloid Interface Sci. 2013. V. 402. P. 267–278.
13. Даниленко Е.Д., Белкина А.О. // Биофарм. Ж. 2014. Т. 6. № 6. С. 44–53.
14. Волосникова Е.А., Демин И.Ф., Левагина Г.М., Лебедев Л.Р., Закабунин А.И., Даниленко Е.Д. // Биоорг. химия. 2016. Т. 42. № 6. С. 704–711. [Volosnikova E.A., Demin I.F., Levagina G.M., Lebedev L.R., Zakabunin A.I., Danilenko E.D. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2016. V. 42. № 6. P. 638–645.]
15. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
16. Мамаева С.А., Крупна И.С., Дятлов В.А., Кутергина И.Ю., Рустамов И.Р., Гумникова, В.И. // Успехи в химии и хим. технологии. 2014. Т. 28. № 3. С. 45–48.
17. Закабунин А.И., Даниленко Е.Д., Волосникова Е.А., Левагина Г.М., Демин И.Ф. // Патент РФ 2609871, заявл. 10.08.1994, опубл. 06.02.2017. Бюл. № 4.
18. Кирилова И.А., Садовой М.А., Подорожная В.Т. // Хирургия позвон. 2012. № 3. С. 72–83.
19. Есина Т.И., Лебедев Л.Р., Волосникова Е.А., Гилева И.П., Гогина Я.С., Терещенко, Т.А., Кочнева Г.В., Гражданцева А.А., Даниленко Е.Д. // Биотехнология. 2019. Т. 35. № 3. С. 68–73.
20. Гилева И.П., Бондарь Т.С., Коробко В.Г., Кравченко В.В., Сандахчиев Л.С. // Патент РФ 2091488, заявл. 16.03.1994, опубл. 27.09.1997. Бюл. № 27.
21. Топоркова Л.Б., Орловская И.А., Сенников С.В., Сахно Л.В., Козлова Ю.Н., Лебедев Л.Р., Гилева И.П. // Иммунология. 2009. № 4. С. 203–206.
22. Скоупс Р. // Методы очистки белков. М.: Мир, 1985.

Study on the Methods for Synthesis of GM-CSF Conjugates with Alendronic Acid

T. I. Esina^{*,#}, E. A. Volosnikova^{*}, L. R. Lebedev^{*}, G. V. Kochneva^{**}, and A. A. Grazhdantseva^{**}

[#]Phone: +7 (383) 363-80-14; e-mail: esina_ti@vector.nsc.ru

^{*}Institute of Medical Biotechnology FBRI SRC VB "Vector" Rospotrebnadzor,
ul. Himzavodskaya 9, Berdsk, Novosibirsk, 633010 Russia

^{**}FBRI SRC VB "Vector" Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk, 630559 Russia

With a purpose to develop a target preparation we studied the process of conjugation of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and alendronic acid (ALN). The conjugation reactions were performed both in solution and on solid phase. The results of the examination of the specific activity of the conjugated GM-CSF confirmed the preservation of biological properties of the protein. The experimental data obtained indicate a higher affinity of GM-CSF-ALN conjugates to hydroxyapatite, an analogue of the bone mineral matrix, than of the intact protein.

Keywords: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, conjugates with alendronic acid, synthesis, properties



СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО РОДАМИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ НА ОСНОВЕ ДИГИДРОХИНОЛИНА ДЛЯ АНАЛИЗА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

© 2020 г. И. В. Матвиенко*, **, #, В. М. Байрамов*,
Н. А. Парыгина*, **, В. Е. Курочкин***, Я. И. Алексеев**, ***

*ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии,
Россия, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, 42

**ООО "Синтол", Россия, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, 42

***ФГБУН Институт аналитического приборостроения РАН,
Россия, 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31/33

Поступила в редакцию 13.08.2019 г.

После доработки 02.09.2019 г.

Принята к публикации 15.11.2019 г.

Разработана оптимизированная схема синтеза производных ксантенового флуоресцентного красителя на основе дигидрохинолина. Впервые продемонстрирована возможность их использования в качестве эффективных флуорофоров в составе гибридизационных зондов для ПЦР в реальном времени с детекцией на индивидуальном спектральном канале прибора для ПЦР в реальном времени.

Ключевые слова: флуоресцентные родаминовые красители, полимеразная цепная реакция в реальном времени, нуклеиновые кислоты, хинолины

DOI: 10.31857/S0132342320030203

ВВЕДЕНИЕ

Благодаря своим хорошим фотохимическим и фотофизическим спектральным характеристикам, а именно высоким коэффициенту экстинкции и квантовому выходу, родаминовые флуоресцентные красители находят широкое применение для визуализации биологических макромолекул [1]. По сравнению с флуоресцентными красителями флуоресцеинового ряда, родаминовые красители более фотостабильны, их спектр флуоресценции не зависит от pH в диапазоне от 4 до 10 [2]. По этим причинам они находят широкое применение не только в биотехнологии для введения в со-

став белков и нуклеиновых кислот, но также и в медицине для диагностической визуализации живых клеток или живых организмов в доклинических исследованиях [3]. За последние годы большое разнообразие родаминовых красителей было выведено на рынок для конъюгирования с биомолекулами [2]. Тем не менее задача синтеза эффективных красителей, флуоресцирующих в спектральном диапазоне от 610 до 665 нм остается актуальной, так как наиболее распространенные красители, используемые для введения в состав нуклеиновых кислот, белков и других биологических макромолекул, флуоресцируют либо в более коротковолновой области спектра (5-карбоксиродамин 6Ж (5-R6G, $\lambda_{em} = 562$ нм), тетраметилкарбоксиродамин (5-TAMRA, $\lambda_{em} = 583$ нм), карбокси-X-родамин (6-ROX, $\lambda_{em} = 610$ нм), либо в близкой ИК области (3,3,3',3'-тетраметил-индокарбоцианин (Cy5, $\lambda_{em} = 669$ нм).

Ранее Liu Jixiang и др. [4] синтезировали флуоресцентные красители, содержащие в своей структуре фрагмент 2,2-диметил-1,2-дигидрохинолина, аннелированного с тиофеном, бензтиофеном или нафталином.

Целью данной работы было разработать метод синтеза красителей родаминовой природы, со-

Сокращения: BHQ2 – 4'-(4-нитрофенилазо)-2',5'-диметокси-4''-(N,N-диэтаноламино)азобензол, гаситель флуоресценции; ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; s – синглет; d – дублет; dd – дублет дублетов; t – триплет; q – квадруплет; qt – квинтет; m – мультиплет; b – уширенный сигнал; J – константа спин-спинового взаимодействия, Гц; Tos – тозилат; p-TsOH – *p*-толуолсульфокислота; DSC – дисукцинимидилкарбонат; DMAP – 4-диметиламинопиридин; TBTA – трис(бензтриазолилметил)амин; TCEP – трис(2-карбоксиэтил)фосфин; TSTU – *N,N,N',N'* – тетраметил-О-(*N*-сукцинимидил)мочевинный тетрафторборат; p-TsOEt – этилтозилат.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 984-69-93 доб. 118; эл. почта: storz@mail.ru).

держащих аналогичный по структуре аннелированный дигидрорхинолиновый фрагмент с улучшенными спектральными характеристиками, а также изучить его свойства в составе гибридных зондов для ПЦР в реальном времени.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве целевой была выбрана структура (V), синтез которой приведен на схеме 1. Последовательность синтеза соединений I–IV, изображенная на верхней части схемы 1, описана впервые.

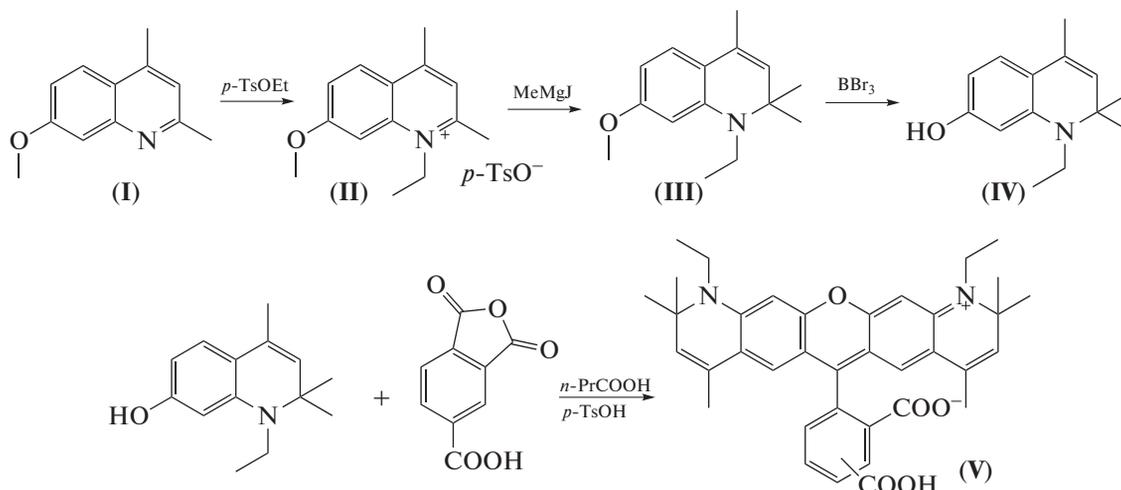


Схема 1. Синтез целевого красителя (5(6)-карбокси-2-(1,11-диэтил-2,2,4,8,10,10-гексаметил-10,11-дигидро-2H-пирано[3,2-g:5,6-g']дигидрохинолинийм-6-ил)бензоата, (5/6-Sy630).

При кипячении замещенных хинолинов с этилтозилатом в хлорбензоле были получены соответствующие четвертичные аммониевые соли, которые при обработке избытком реактива Гриньяра давали производные 1-этил-1,2-дигидрохинолина. Метоксигруппу удаляли обработкой трехбромистым бором при комнатной температуре. В связи с тем, что производные 7-гидрокси-1,2-дигидрохинолина чувствительны к действию минеральных кислот и кислот Льюиса, ядро красителя синтезировали кипячением их с тримеллитовым ангидридом в масляной кислоте с добавлением каталитических количеств *n*-толуолсульфокислоты.

Полученную смесь изомеров разделяли при помощи хроматографии.

N-Гидроксисукцинимидные эфиры (VI) получали взаимодействием соответствующих карбоксипроизводных с дисукцинимидилкарбонатом в сухом хлористом метиле с добавлением 1.5 эквивалентов основания Хюнига и 0.5 эквивалентов 4-диметиламинопиридина. Также были синтезированы их пропилазидные производные взаимодействием активированных эфиров (VI) с 3-аминопропилазидом, как изображено на схеме 2.

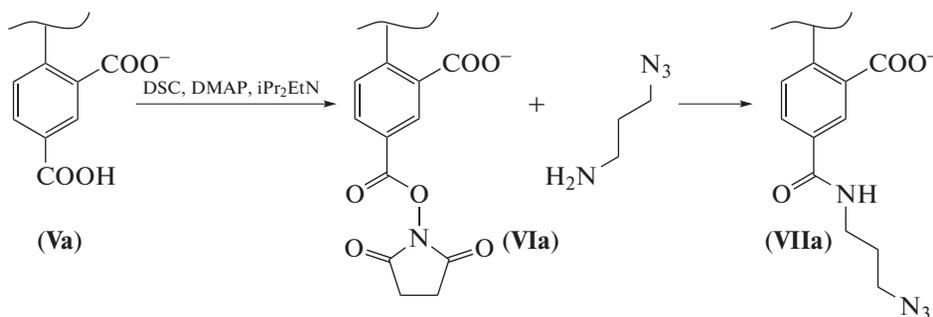


Схема 2. Получение N-гидроксисукцинимидного эфира и пропилазида красителя 5-карбокси-Sy630.

2-Аминофенилкетоны, такие как 2-аминобензофенон и 2-аминоацетофенон и их замещенные производные являются удобными исходными соединениями для получения хинолинов [5]. 4-Метокси-2-аминоацетофенон был получен по

методу Tsutomu Sugawara и др. [6] путем взаимодействия *m*-анизида с ацетонитрилом в присутствии треххлористого бора и хлорида алюминия и последующим гидролизом полученного 2-аминофенилкетимина, как это показано на

схеме 3. Синтез хинолинов, основанный на конденсации α -замещенного анилина с кетонами, впервые описан Фридлиндером в 1882 г. [7]. В даль-

нейшем были разработаны многочисленные вариации этого метода с использованием различных катализаторов [8–20].

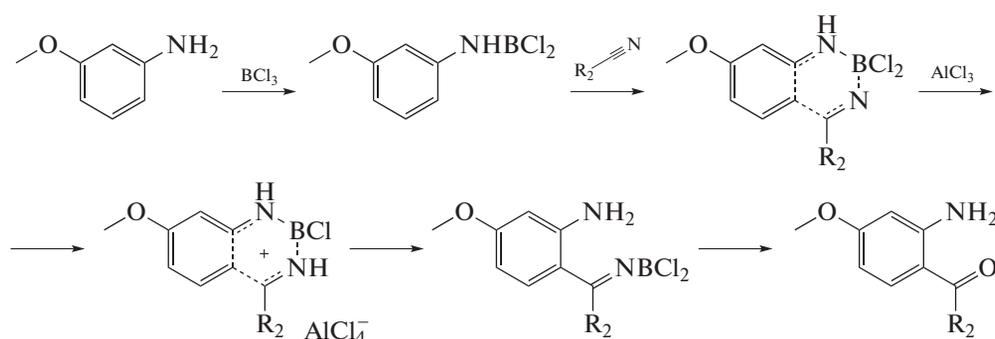


Схема 3. Получение 4-метокси-2-амиоацетофена.

Перспективной казалась идея получить и 2,4-диметил-7-метоксихинолин по этому же способу реакцией 2-амино-4-метоксиацетофена с ацетоном, но по сообщению E. Roberts и E.E. Turner [21] взаимодействие 3,4-дихлор-2-амиоацето-

фена с ацетоном протекает лишь при нагревании в запаянном сосуде при 185°C в течение 6 ч. Тогда была получена 2,4-диметил-7-метоксихинолин-3-карбоновая кислота (схема 4).

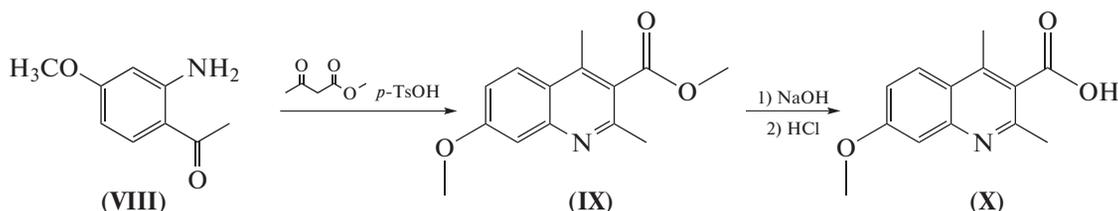


Схема 4. Получение 2,4-диметил-7-метоксихинолин-3-карбоновой кислоты.

Однако эта кислота весьма устойчива к декарбоксилированию, эффективно удалить карбоксильную группу удастся лишь разложением ее серебряной соли. Более рациональным представляется получение 2,4-диметил-7-ме-

токсихинолина путем нагревания с концентрированной серной кислотой продукта конденсации *m*-анизидина с ацетилацетоном (схема 5), в работе [21] так были получены различные хлорпроизводные хинолина.

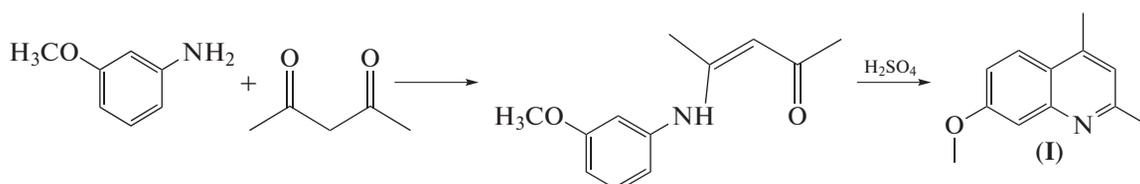


Схема 5. Получение 2,4-диметил-7-метоксихинолина.

Спектральные характеристики 5(6)-изомеров карбокси-Sy630 **Va** и **Vb**, а также их производных **VIa**, **VIb**, **VIIa** и **VIIb** приведены в табл. 1. Значения квантовых выходов и коэффициентов экстинкции были получены аналогично [22].

Синтезированные N-гидроксисукцинимидные производные 5 и 6 изомеров красителя Sy630 (**VIa**, **VIb**) были присоединены на 5'-концы олигонуклеотидов, путем конденсации с 5'-терми-

альной аминогруппой (Aminolink-C6) олиготимидилатов T₂₀. Соответствующие азидные производные (**VIIa**, **VIIb**) были присоединены на 5'-концы олиготимидилатов T₂₀, путем конденсации с 5'-терминальной алкильной группой (Alkyn). Результаты масс-спектрометрического анализа MALDI-TOF и спектральные характеристики синтезированных олигонуклеотидов приведены в табл. 2 и 3 соответственно.

Таблица 1. Спектральные характеристики изомеров новых флуоресцентных красителей (**Va** и **Vb**) и их производных (**VIa**, **VIb**, **VIIa** и **VIIb**) в системе этанол–вода (1 : 1)

Название	Обозначение	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$, нм	Квантовый выход, %	ϵ , М ⁻¹ см ⁻¹
5-Карбокси-Sy630	5-Sy630 (Va)	589/615	70 ± 8	101900 ± 1100
6-Карбокси-Sy630	6-Sy630 (Vb)	586/612	88 ± 12	90300 ± 4600
5-Азидопропил-Sy630	5-Sy630-N ₃ (VIIa)	592/619	66 ± 8	71300 ± 2000
6-Азидопропил-Sy630	6-Sy630-N ₃ (VIIb)	592/617	97 ± 3	107800 ± 3900

Таблица 2. Результаты MALDI-TOF анализа модифицированных олигонуклеотидов

Олигонуклеотид, 5' → 3'	Обозначение	Молекулярная масса	m/z [M + H] ⁺
5-Sy630-Aminolink-C6-t-ttt-ttt-ttt-ttt-ttt-t	5-Sy630-Aminolink-C6-T20	6775.9	6780.1
6-Sy630-Aminolink-C6-t-ttt-ttt-ttt-ttt-ttt-t	6-Sy630-Aminolink-C6-T20	6775.9	6781.3
5-Sy630-Alkyn-t-ttt-ttt-ttt-ttt-ttt-t	5-Sy630-Alkyn-T20	6930.0	6942.6
6-Sy630-Alkyn-t-ttt-ttt-ttt-ttt-ttt-t	6-Sy630-Alkyn-T20	6930.0	6927.7
5-Sy630-Aminolink-C6-a-gcg-gct-cct-act-tct-gca-ggg-g-BHQ2	5-Sy630-Aminolink-C6-Fc	8382.0	8371.6
6-Sy630-Aminolink-C6-a-gcg-gct-cct-act-tct-gca-ggg-g-BHQ2	6-Sy630-Aminolink-C6-Fc	8382.0	8372.1
5-Sy630-Alkyn-a-gcg-gct-cct-act-tct-gca-ggg-g-BHQ2	5-Sy630-Alkyn-Fc	8536.1	8521.2
6-Sy630-Alkyn-a-gcg-gct-cct-act-tct-gca-ggg-g-BHQ2	6-Sy630-Alkyn-Fc	8536.1	8517.1
6-ROX-ag-cgg-ctc-cta-ctt-ctg-cag-ggg-BHQ2	FC_Pr_up_ROX	8310.8	8308.8
Cy5-ag-cgg-ctc-cta-ctt-ctg-cag-ggg-BHQ2	FC_Pr_up_Cy5	8300.6	8303.8
cac-ata-ttt-aca-gaa-tgg-caa-agg	Fc-up	7393.8	7395.1
ctg-aag-aca-cat-ttt-tac-tcc-caa	Fc-low	7255.7	7256.5

Как видно из данных, приведенных в табл. 3, максимумы длин волн эмиссии у 5-ого и 6-ого карбокси изомеров красителя Sy630 отличаются на 4–5 нм, что также характерно для 5-ых и 6-ых карбокси изомеров других красителей ксантенового ряда (FAM, R6G, TAMRA, ROX). Однако, эта разница исчезает при введении 5-ого или 6-ого карбокси изомера красителя Sy630 в гибридные зонды, видимо, из-за влияния гете-

рогенной по составу, по сравнению олиготимидилатом, последовательности зондов.

Максимумы спектров поглощения и флуоресценции производных красителя Sy630 в составе олигонуклеотидов имеют промежуточные значения по сравнению с максимумами поглощения и флуоресценции красителей 6-ROX и Cy5 (рис. 1, 2). Для обеспечения возможности детектировать новый флуоресцентный краситель Sy630 в инди-

Таблица 3. Спектральные характеристики модифицированных олигонуклеотидов

Олигонуклеотид, 5' → 3'	Обозначение	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$, нм
5-Sy630-Aminolink-C6-t-ttt-ttt-ttt-ttt-ttt-t	5-Sy630-Aminolink-C6-T20	602/628
5-Sy630-Alkyn-t-ttt-ttt-ttt-ttt-ttt-t	5-Sy630-Alkyn-T20	602/629
6-Sy630-Aminolink-C6-t-ttt-ttt-ttt-ttt-ttt-t	6-Sy630-Aminolink-C6-T20	602/625
6-Sy630-Alkyn-t-ttt-ttt-ttt-ttt-ttt-t	6-Sy630-Alkyn-T20	601/624
5-Sy630-Aminolink-C6-a-gcg-gct-cct-act-tct-gca-ggg-g-BHQ2	5-Sy630-Aminolink-C6-Fc	604/629
6-Sy630-Aminolink-C6-a-gcg-gct-cct-act-tct-gca-ggg-g-BHQ2	6-Sy630-Aminolink-C6-Fc	603/626
5-Sy630-Alkyn-a-gcg-gct-cct-act-tct-gca-ggg-g-BHQ2	5-Sy630-Alkyn-Fc	602/626
6-Sy630-Alkyn-a-gcg-gct-cct-act-tct-gca-ggg-g-BHQ2	6-Sy630-Alkyn-Fc	603/626
6-ROX-ag-cgg-ctc-cta-ctt-ctg-cag-ggg-BHQ2	FC_Pr_up_ROX	588/613
Cy5-ag-cgg-ctc-cta-ctt-ctg-cag-ggg-BHQ2	FC_Pr_up_Cy5	648/668

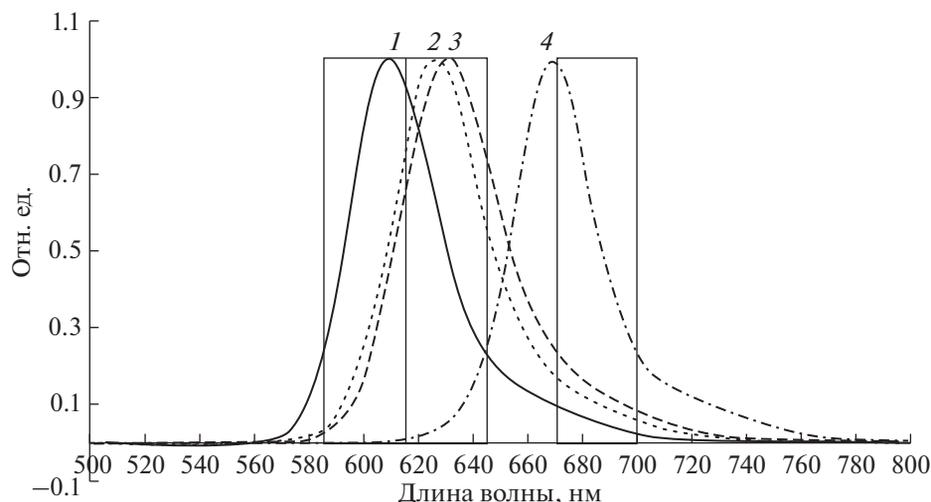


Рис. 1. Нормализованные спектры возбуждения олиготимидилатов, содержащих на 5'-конце красители 6-ROX (1), 6-Sy630 (2), 5-Sy630 (3) и Cy5 (4). Прямоугольниками выделены спектральные диапазоны пропускания интерференционных светофильтров, использованных для постановки ПЦР-РВ.

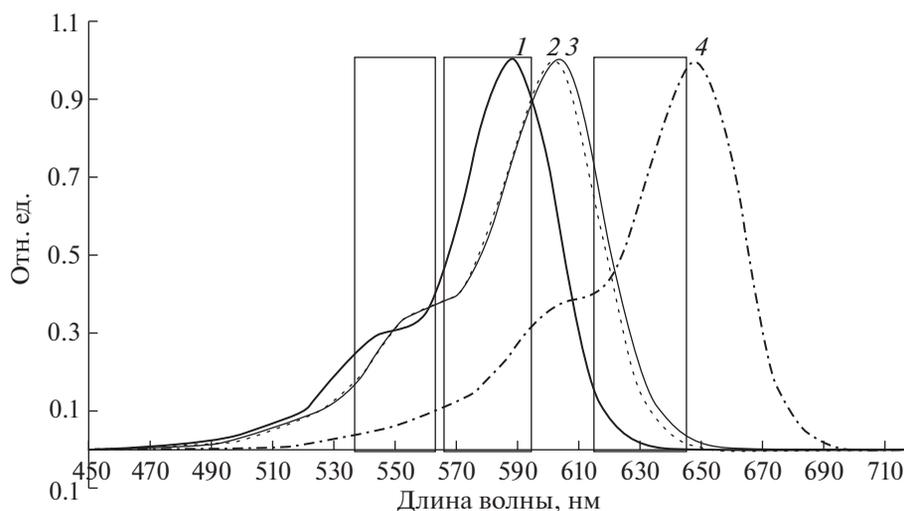


Рис. 2. Нормализованные спектры эмиссии олиготимидилатов, содержащих на 5'-конце красители 6-ROX (1), 6-Sy630 (2), 5-Sy630 (3) и Cy5 (4). Прямоугольниками выделены спектральные диапазоны пропускания интерференционных светофильтров, использованных для постановки ПЦР-РВ.

видуальном спектральном канале, в прибор для ПЦР-РВ АНК-М [23] была установлена пара светофильтров 580 нм (30 нм)/630 нм (30 нм), где 30 нм – значение полной ширины пропускания на половине амплитуды. Для того, чтобы снизить перекрестное свечение сигнала флуоресценции красителя Sy630 в спектральный канал, соответствующий красителю 6-ROX, имеющему в составе гибридационных зондов (см. табл. 3) характеристики длин волн возбуждения – 587–588 нм и длин волн эмиссии – 613–614 нм, для его детекции использовали не стандартную пару светофильтров с характеристиками возбуждения/эмиссии 550 нм (25 нм)/600 нм (30 нм). Для детекции сигнала флуоресценции красителя Cy5 использовали

стандартную пару светофильтров 630 нм (30 нм)/685 нм (25 нм).

На рис. 3 приведены результаты постановок ПЦР-РВ с одновременной детекцией красителей 6-ROX, 5-Sy630-NHS (**VIa**), 6-Sy630-NHS (**VIb**) и Cy5 в составе гибридационных зондов на индивидуальных спектральных каналах.

На рис. 4 приведены результаты постановок ПЦР-РВ с одновременной детекцией красителей 6-ROX, 5-Sy630-N₃ (**VIIa**), 6-Sy630-N₃ (**VIIb**) и Cy5 в составе гибридационных зондов на индивидуальных спектральных каналах.

Как видно из приведенных на рис. 3 и 4 данных, системы праймеров и зондов, меченных производными нового флуоресцентного красителя Sy630, обеспечивают высокую (выше 97%) эф-

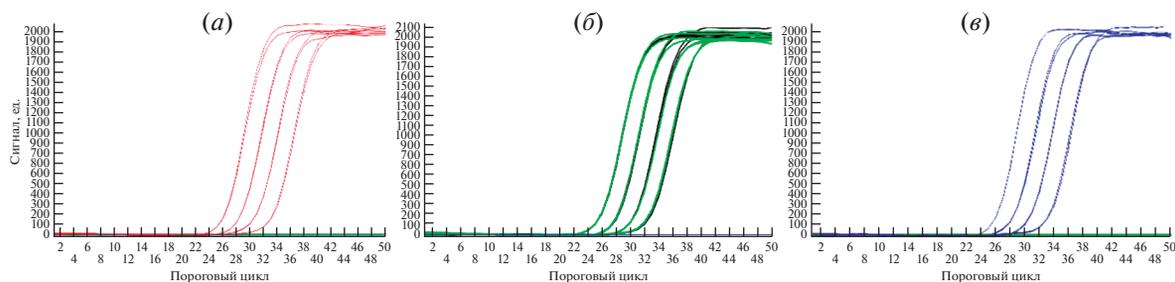


Рис. 3. Результаты ПЦР-РВ (данные нормированы к нулю и по максимуму) серии из четырех 10-кратных разведений ДНК человека с концентрациями 5, 1, 0,2, 0,04 нг/мкл в двух повторах, полученные с использованием гибридационных зондов. (а) FC_Pr_up_ROX, ($R^2 = 1.0$, $E = 97\%$); (б) 5-Sy630-Aminolink-C6-Fc, ($R^2 = 1.0$, $E = 98\%$) и 6-Sy630-Aminolink-C6-Fc ($R^2 = 0.999$, $E = 100\%$); (е) FC_Pr_up_Cy5 ($R^2 = 0.997$, $E = 98\%$).

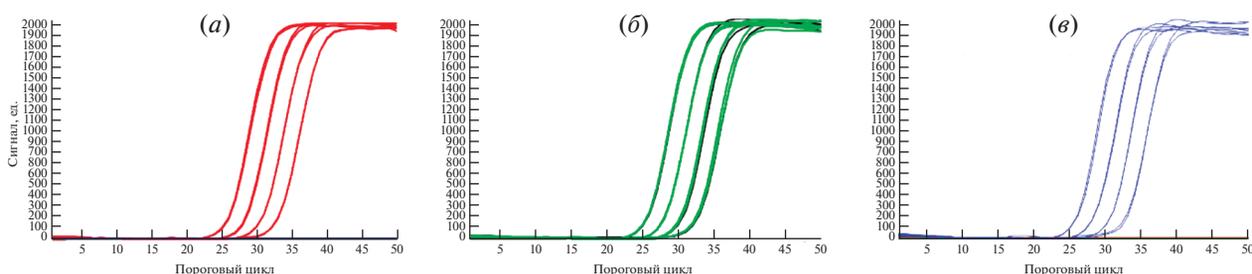


Рис. 4. Результаты ПЦР-РВ (данные нормированы к нулю и по максимуму) серии из четырех 10-кратных разведений ДНК человека с концентрациями 5, 1, 0,2, 0,04 нг/мкл в двух повторах, полученные с использованием гибридационных зондов. (а) FC_Pr_up_ROX, ($R^2 = 1.0$, $E = 97\%$); (б) 5-Sy630-Alkyn-Fc, ($R^2 = 0.998$, $E = 100\%$) и 6-Sy630-Alkyn-Fc ($R^2 = 1.0$, $E = 97\%$); (е) FC_Pr_up_Cy5 ($R^2 = 0.999$, $E = 101\%$).

эффективность ПЦР в реальном времени в широком диапазоне концентраций ДНК. Рассчитанные значения R^2 , близкие к 1 и значения эффективности ПЦР-РВ, близкие к 100% для зондов, в которые красители вводили либо в виде N-гидроксисукцинимидных эфиров, либо в виде азидопропильных производных, свидетельствуют о том, что оба типа производных нового красителя могут быть использованы для введения в состав гибридационных зондов для ПЦР в реальном времени. При этом стоит отметить, что в силу более высокой стабильности азидопропильных производных они являются более предпочтительными кандидатами для рутинной работы по введению флуоресцентных меток в состав гибридационных зондов для ПЦР-РВ. При этом наиболее предпочтительным является использование производного 6-изомера азидопропила, так как он имеет большие значения квантового выхода и коэффициента экстинкции (табл. 1), производство которых пропорционально светимости флуорофора. Подобранный комбинация интерференционных светофильтров для трех соседних спектральных каналов обеспечивает эффективное определение ДНК-мишени на каждом индивидуальном спектральном канале прибора для ПЦР-РВ, хотя не является оптимальной. Для обеспечения наилучшего возбуждения и сбора сигнала

флуоресценции для детекции флуоресценции красителя Sy630 необходимо использовать интерференционные светофильтры, с максимумами пропускания, сдвинутыми на 20–30 нм в красную область спектрального диапазона.

Таким образом, впервые продемонстрирована возможность постановки ПЦР в реальном времени с гибридационными зондами, содержащими производные нового флуоресцентного красителя на основе дигидрохинолина (5(6)-карбокси-2-(1,11-диэтил-2,2,4,8,10,10-гексаметил-10,11-дигидро-2H-пирано[3,2-g:5,6-g']дигидрохинолиниум-6-ил)бензоата – 5/6-карбокси-Sy630. Продемонстрирована возможность использования таких зондов в мультиплексной ПЦР-РВ с детекцией на индивидуальном спектральном канале прибора для ПЦР-РВ. Это позволяет увеличить количество одновременно выявляемых в одной пробирке ДНК и/или РНК мишеней на одну, по сравнению со стандартным набором флуоресцентных красителей и соответствующих им комбинаций интерференционных светофильтров широко используемых сегодня в приборах для ПЦР-РВ для постановки мультиплексной ПЦР в реальном времени.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали ацетонитрил (ч.д.а) и бензол (х.ч.) перегнанные над P_2O_5 , хлороформ (х.ч.), метил-*трет*-бутиловый эфир (ч.д.а) и хлористый метилен (х.ч.) над CaH_2 , диизопропилэтиламин 99% (Fisher Scientific) перегоняли над КОН, ацетилацетон (ч.д.а.) (Черкасского завода химреактивов им. XXV съезда КПСС) перегоняли в вакууме с дефлегматором. Остальные реактивы использовали без дополнительной очистки: этил *n*-толуолсульфонат 98%, *m*-анизидин 99%, циклопентанон 99+%, 1 М раствор треххлористого бора в хлористом метиле, трибромид бора 99% (Acros Organics); тетрагидрофуран *dry* (max 0.0075% water) (Panreac); магний в гранулах 12–50 меш 99.8%, метилацетоацетат 99% (Alfa Aesar); 4-диметиламинопиридин 99+% (Fluka); фосфор(V) оксид (ч.), натрий серноокислый б/водн. (х.ч.), *n*-толуолсульфоокислота моногидрат (ч.), этилацетат (х.ч.), гексан (х.ч.), диэтиловый эфир (ч.д.а) (Химмед); соляная кислота (х.ч.), гидроксид натрия (ч.д.а.), масляная кислота (имп.), серная кислота (х.ч.), бихромат калия (х.ч.), метилиодид (имп.) (Вектон); хлорбензол (ч.д.а.) (Экос-1); хлорид аммония (х.ч.) (Реахим); тримеллитовый ангидрид 97%, *N,N'*-дисукцинимидилкарбонат 95+%, азид натрия 99.5+%, 3-бромопропиламина гидробромид 98%, диметилсульфоксид USP, трис-[(1-бензил-1Н-1,2,3-триазол-4-ил)метил]амин 97%, меди(II) сульфат пентагидрат 98%, трис(2-карбоксиил)фосфина гидрохлорид (Sigma-Aldrich); метанол 99.9% (Lab-Scan); *N,N,N,N',N'*-тетраметил-*O*-(*N*-сукцинимидил)мочевина тетрафторборат (Hangzhou Dayangchem); остальные реактивы отечественно-го производства марки “х.ч”.

ТСХ выполняли на пластинках Kieselgel 60 (Merck, Германия) в системах, приведенных ниже.

Олигонуклеотиды, использованные в работе, синтезировали и очищали как описано ранее [22]. Последовательности праймеров и зондов Fc-up, Fc-low, 5-Sy630-Aminolink-C6-Fc, 6-Sy630-Aminolink-C6-Fc, 5-Sy630-Alkyn-Fc, 6-Sy630-Alkyn-Fc, FC_Pr_up_ROX, FC_Pr_up_Cy5 были подобраны к Fc-фрагменту гена иммуноглобулина G человека (FCGR3B, Sequence ID: NM_001271036.1).

В работе использовали магнитную мешалку с подогревом (Heildolph MR 3001 K, Германия), роторный испаритель (Buchi Rotavapor R200, Швейцария), синтезатор ДНК (ASM-2000, Биоссет, Россия), препаративный хроматограф (Reveleris Prep Grace, США), термостат (Циклотемп-303, Россия), шейкер для пробирок (Eppendorf Mixer 5432, Германия), вакуумный испаритель (Univapo 150 ECH, Германия), микроцентрифугу-встраиватель (Циклотемп-901, Россия). Спектры поглощения красителей и их конъюгатов с олигонуклеотидами регистрировали на спектрофотометре

Nanodrop ND-1000 (ThermoFisher Scientific, США). Спектры возбуждения и флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре PerkinElmer LS55 (Perkin Elmer, США) со следующими параметрами: скорость сканирования 500 нм/мин, ширина щели при измерении возбуждения – 15 нм, при измерении эмиссии – 10 нм. Спектральный диапазон возбуждения – от 450 до 700 нм; эмиссии – от 500 до 750 нм. Спектры ЯМР записывали на приборе DRX500 (Bruker Daltonics, Германия), снимали в Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (г. Москва). Масс-спектры MALDI-TOF снимались на приборе Microflex LRF (Bruker Daltonics, Германия) в центре коллективного пользования научным оборудованием ФГБНУ ВНИИСБ “Биотехнология”. ПЦР в реальном времени проводили на приборе АНК-48 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия) по следующей циклограмме: 95°C – 5 мин, затем 49 циклов: 60°C – 40 с, 95°C – 15 с. Полученные данные автоматически обрабатывали с помощью программного обеспечения АНК-Shell 1.0.5.100.

2,4-Диметил-7-метоксихинолин (I). Ацетилацетон 45 мл (43.875 г, 0.438 моль, 1.1 экв.) и *m*-анизидин 45 мл (1 экв., 0.398 моль, 49.06 г) кипятили с обратным холодильником в течение 2.5 ч, нагревая на масляной бане при 140°C. Реакционную массу упаривали в вакууме при 70°C. Полученное масло при перемешивании и охлаждении на ледяной бане выливали в 250 мл концентрированной серной кислоты. Затем реакционную массу нагревали на кипящей водяной бане 1.5 ч. Выливали в 1 л воды, охлаждали на водяной бане и приливали раствор 135 г бихромата калия в 1 л воды. Охлаждали на ледяной бане. Выпавший осадок бихромата хинолина отфильтровывали, тщательно промыли на фильтре водой и растворяли в 900 мл 12% раствора гидроксида натрия. Перемешивали до полного растворения осадка, экстрагировали 4 × 200 мл диэтилового эфира. Экстракты сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали в вакууме. Получено 38.0 г вещества в виде бесцветного масла, при стоянии в холодильнике (на 4°C) медленно кристаллизующегося в виде крупных призм. Выход 2,4-диметил-7-метоксихинолина 51%. $R_f = 0.85$ (метанол–хлороформ 1 : 3), m/z найдено: 188.165, рассчитано: 187.1. ЯМР 1H в $CDCl_3$ (500 МГц) δ (м.д.): 7.73 (1H, d, $J = 9.1$, C_5H), 7.30 (1H, d, $J = 2.4$, C_8H), 7.06 (1H, dd, $J = 9.1$, 2.4, C_6H), 6.90 (1H, s, C_3H), 3.88 (3H, s, OCH_3), 2.61 (3H, s, C_2-CH_3), 2.53 (3H, s, C_4-CH_3). ЯМР ^{13}C в $CDCl_3$ (126 МГц) δ (м.д.): 159.86 (C_2), 158.41 (C_7), 148.97 (C_{8a}), 143.50 (C_4), 124.16 (C_5), 120.95 (C_{4a}), 120.20 (C_3), 117.56 (C_6), 106.81 (C_8), 54.87 (OCH_3), 24.60 (C_2-CH_3), 17.95 (C_4-CH_3).

1-Этил 2,4-диметил-7-метокси-хинолиния тозилат (IIa). 2,4-Диметил-7-метоксихинолин 38.0 г (0.203 моля) и этилтозилат 38 мл (1.1 экв., 0.223 мо-

ля, 44.7 г) кипятили с обратным холодильником в 115 мл хлорбензола в течение 20 часов. При охлаждении реакционной массы выпадали кристаллы. Осадок отфильтровывали, промывали на фильтре петролейным эфиром, сушили на воздухе. Фильтрат упаривали в вакууме масляного насоса. Полученное масло при стоянии кристаллизовалось. Получено 72.236 г вещества в виде кремовых кристаллов. Выход 1-этил-2,4-диметил-7-метокси-хинолина тозилата 92%. $R_f = 0.27$ (метанол–хлороформ 1 : 3), m/z найдено: 215.969, рассчитано: 216.3. ЯМР ^1H в CDCl_3 (500 МГц) δ (м.д.): 8.08 (1H, d, $J = 9.2$, C_3H), 7.64 (2H, d, $J = 8.0$, Tos(2' + 6')), 7.58 (1H, d, $J = 1.9$, C_8H), 7.52 (1H, s, C_3H), 7.40 (1H, dd, $J = 9.2$, 2.1, C_6H), 6.98 (2H, d, $J = 7.9$, Tos(3' + 5')), 5.09 (2H, q, $J = 7.2$, CH_2CH_3), 4.10 (3H, s, OCH_3), 3.04 (3H, s, $\text{C}_2\text{-CH}_3$), 2.81 (3H, s, $\text{C}_4\text{-CH}_3$), 2.25 (3H, s, Tos(CH_3)), 1.58 (3H, t, $J = 7.3$, CH_2CH_3).

2,2,4-Триметил-1-этил-7-метокси-1,2-дигидрохинолин (IIIa). К раствору 9.438 г (24.36 ммоль) 1-этил-2,4-диметил-7-метокси-хинолина тозилата в 100 мл абсолютного тетрагидрофурана прибавляли по каплям в темноте, в атмосфере аргона реактив Гриньяра, полученный из 2.43 г (4 экв., 100 ммоль) магния и 6.23 мл (100 ммоль, 14.194 г) йодистого метила в 100 мл метилтретбутилового эфира. Перемешивали в темноте в течение 2 суток. При охлаждении на ледяной бане добавляли 150 мл насыщенного раствора хлорида аммония. Осадок отфильтровывали, промывали небольшим количеством воды и метилтретбутилового эфира. Фильтрат разделяли в делительной воронке. Водную фазу экстрагировали 2 \times 100 мл диэтилового эфира. Объединенную органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия и упарили в вакууме. Полученный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле. Элюировали смесью гексан–хлороформ 9 : 1. Получено 2.742 г вещества в виде масла. Выход 2,2,4-триметил-1-этил-7-метокси-1,2-дигидрохинолина 49%. m/z найдено: 231.168, рассчитано: 231.2. ЯМР ^1H в CDCl_3 (500 МГц) δ (м.д.): 6.97 (1H, d, $J = 8.3$, C_5H), 6.14 (1H, dd, $J = 8.3$, 2.3, C_6H), 6.08 (1H, d, $J = 2.3$, C_8H), 5.10 (1H, s, C_3H), 3.79 (3H, s, OCH_3), 3.32 (2H, q, $J = 7.0$, $\text{N-CH}_2\text{CH}_3$), 1.97 (3H, s, $\text{C}_4\text{-CH}_3$), 1.32 (6H, s, $\text{C}_2\text{-(CH}_3)_2$), 1.22 (3H, t, $J = 7.0$, $\text{N-CH}_2\text{CH}_3$). ЯМР ^{13}C в CDCl_3 (126 МГц) δ (м.д.): 160.69 (C_7), 145.11 (C_{8a}), 127.48 (C_4), 127.12 (C_3), 124.59 (C_5), 116.73 (C_{4a}), 98.91 (C_6), 97.65 (C_8), 57.02 (C_2), 55.19 (OCH_3), 38.32 ($\text{N-CH}_2\text{CH}_3$), 28.80 ($\text{C}_2\text{-(CH}_3)_2$), 18.90 ($\text{C}_4\text{-CH}_3$), 14.39 ($\text{N-CH}_2\text{CH}_3$).

2,2,4-Триметил-1-этил-7-гидрокси-1,2-дигидрохинолин (IVa). 2,2,4-Триметил-1-этил-7-метокси-1,2-дигидрохинолин 2.655 г (11.5 ммоль) растворяли в 20 мл сухого хлороформа и в темноте при охлаждении на ледяной бане, в атмосфере аргона добавляли по каплям 2.22 мл (5.762 г, 23 ммоль,

2 экв.) трехбромистого бора в 10 мл сухого хлороформа. Выдерживали 1 ч при -3°C , затем 1 ч 40 мин при комнатной температуре. При охлаждении льдом добавляли 22.5 мл 12% раствора гидроксида натрия. Отделяли на делительной воронке нижний слой. Водную фазу подкисляли, экстрагировали хлороформом. Объединенные экстракты сушили безводным сульфатом натрия и пропускали через слой силикагеля, элюировали хлороформом и упаривали в вакууме. Получено 1.106 г масла, темнеющего на воздухе. Выход 2,2,4-триметил-1-этил-7-гидрокси-1,2-дигидрохинолина 44%. m/z найдено: 217.230, рассчитано: 217.1. ЯМР ^1H в CDCl_3 (500 МГц) δ (м.д.): 6.87 (1H, d, C_5H), 6.03 (2H, m, $\text{C}_6\text{H} + \text{C}_8\text{H}$), 5.05 (1H, s, C_3H), 3.27 (2H, q, NCH_2), 1.92 (3H, s, $\text{C}_4\text{-CH}_3$), 1.29 (6H, s, $\text{C}_2\text{-(CH}_3)_2$), 1.18 (3H, t, CH_2CH_3).

5(6)-Карбокси-Sy630 4(5)-карбокси-2-(1,11-диэтил-2,2,4,8,10,10-гексаметил-10,11-дигидро-2H-пирано[3,2-g:5,6-g']дихинолин-1-иум-6-ил)бензоат (Va) и (Vb). К 3.63 г (16.7 ммоль, 2 экв.) 2,2,4-триметил-1-этил-7-гидрокси-1,2-дигидрохинолина в 130 мл масляной кислоты добавляли 60 мг (0.32 ммоль) гидрата *n*-толуолсульфокислоты и 1.603 г (8.35 ммоль, 1 экв.) тримеллитового ангидрида. Кипятили в темноте, в атмосфере аргона с обратным холодильником 24 ч. Упаривали в вакууме (при 80°C), заливали гексаном, на следующий день гексан отбрасывали. Предварительно очищали хроматографией на нейтральной окиси алюминия. Элюировали изопропанолом с 0–15% воды с 5% триэтиламина. Фракции, содержащие 5-й изомер, упаривали и растворяли остаток в 5 мл сухого хлористого метилена. Приливали по каплям, при перемешивании на магнитной мешалке, к 100 мл абсолютного диэтилового эфира. Осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили в вакууме. Получено после сушки в вакууме 0.265 г чистого 5-карбокси изомера, остальные фракции, содержащие продукт, дополнительно очищали хроматографией на силикагеле. Элюировали 0–20% метанола в хлороформе с 1% триэтиламина. 6-карбоксиизомер (Vb) выходил при 10% метанола, 5-карбоксиизомер (Va) – при 15–20%. Получено 0.796 г 6-карбокси-Sy630 в виде фиолетовой пены. Выход 6-карбокси-Sy630 16%. $R_f = 0.24$, (метанол–хлороформ 1 : 4). Масс-спектр: m/z , найдено: 591.315, рассчитано: 590.3, квантовый выход = 0.77 (в системе этанол–вода 1 : 1), коэффициент экстинкции (при максимуме поглощения) = $9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, максимум длины волны поглощения = 584 нм (в системе этанол–вода 1 : 1), максимум длины волны флуоресценции = 609 нм (в системе этанол–вода 1 : 1). ЯМР ^1H триэтиламмониевой соли в CDCl_3 (500 МГц) δ (м.д.): 8.23 (1H, d, $J = 7.9$), 7.98 (1H, d, $J = 8.1$), 7.80 (1H, s), 6.37 (2H, s), 6.24 (2H, s), 5.09 (2H, s), 3.36 (4H, q, $J = 6.9$, $2^*\text{NCH}_2\text{CH}_3$), 3.01 (6H, q, $J = 7.3$, $\text{N(CH}_2\text{CH}_3)_3$),

1.63 (6H, s, C₄-CH₃ + C₈CH₃), 1.31 (12H, s, 2*C₂-CH₃ + 2*C₁₁-CH₃), 1.24 (15H, m, 2*NCH₂CH₃ + N(CH₂CH₃)₃). Получено 1.199 г 5-карбоксиву630 в виде фиолетового порошка. Выход 5-карбоксиву630 24%. Rf = 0.59 (метанол-хлороформ 1 : 9 + 5% триэтиламина), *m/z* Масс-спектр: *m/z*, найдено: 591.334, рассчитано: 590.3, квантовый выход = 0.50 (в системе этанол-вода 1 : 1), коэффициент экстинкции (при максимуме поглощения) = 1.007 × 10⁵ М⁻¹ см⁻¹, максимум длины волны поглощения = 585 нм (в системе этанол-вода 1 : 1), максимум длины волны флуоресценции = 612 нм (в системе этанол-вода 1 : 1). ЯМР ¹H триэтиламониевой соли в CDCl₃ (500 МГц) δ (м.д.): 8.66 (1H, s), 8.31 (1H, dd, *J* = 7.9, 1.3), 7.16 (1H, d, *J* = 7.8), 6.31 (2H, s), 6.25 (2H, s), 5.08 (2H, s), 3.35 (4H, q, *J* = 6.9, 2*NCH₂CH₃), 3.05 (6H, q, *J* = 7.2, N(CH₂CH₃)₃), 1.61 (6H, s, C₄-CH₃ + C₈CH₃), 1.24–1.32 (27H, m, 2*C₂-CH₃ + 2*C₁₁-CH₃ + 2*NCH₂CH₃ + N(CH₂CH₃)₃).

5-Sy630-NHS 5-карбоксиву630-2-(1,11-диэтил-2,2,4,8,10,10-гексаметил-10,11-дигидро-2H-пирано[3,2-g:5,6-g']дихинолин-1-иум-6-ил)бензоата N-гидроксисукцинимидный эфир (VIa). 5-Карбоксиву630 95 мг (0.161 ммоль) растворяли в 9.5 мл сухого хлористого метилена, добавляли 42 мкл (31 мг, 0.242 ммоль, 1.5 экв.) диизопропилэтиламина, 50 мг (0.193 ммоль, 1.2 экв.) дисукцинимидилкарбоната и 10 мг (0.08 ммоль, 0.5 экв.) 4-диметиламинопиридина. Перемешивали при комнатной температуре 2 ч, затем добавляли еще 25 мг дисукцинимидилкарбоната и перемешивали еще 1 ч. Выливали в 10 мл 0.6 М раствора соляной кислоты и отделяли нижний слой в делительной воронке. Органическую фазу сушили безводным сульфатом натрия, упаривали в вакууме, полученное вещество растворяли в 2 мл сухого хлористого метилена и добавляли по каплям при перемешивании к 30 мл абсолютизированного метилтретбутилового эфира. Отфильтровывали, промывали метилтретбутиловым эфиром, сушили в вакууме. Выход соединения (VIa) составил 43 мг (39%), фиолетовый порошок. Rf = 0.75, (метанол-хлороформ 1 : 3), *m/z* найдено: 688.1, рассчитано: 687.3 максимум длины волны поглощения = 592 нм (в системе этанол-вода 1 : 1), максимум длины волны флуоресценции = 641 нм (в системе этанол-вода 1 : 1). ЯМР ¹H в CDCl₃ (500 МГц) δ (м.д.): 9.08 (1H, s), 8.41 (1H, d, *J* = 7.7), 7.40 (1H, d, *J* = 7.7), 6.61 (2H, s), 6.58 (2H, s), 5.44 (2H, s), 3.62 (4H, d, *J* = 6.5), 2.98 (4H, s), 1.76 (6H, s), 1.48 (12H, s), 1.38 (6H, не разрешившийся триплет).

6-Sy630-NHS 4-Карбоксиву630-2-(1,11-диэтил-2,2,4,8,10,10-гексаметил-10,11-дигидро-2H-пирано[3,2-g:5,6-g']дихинолин-1-иум-6-ил)бензоата N-гидроксисукцинимидный эфир (VIb). 6-Карбоксиву630 227 мг (0.38 ммоль) растворяли в 22 мл сухого хлористого метилена, добавляли 100 мкл (75 мг,

0.576 ммоль, 1.5 экв.) диизопропилэтиламина, 117 мг (0.456 ммоль, 1.2 экв.) дисукцинимидилкарбоната и 23 мг (0.19 ммоль, 0.5 экв.) 4-диметиламинопиридина. Перемешивали при комнатной температуре 1 ч, затем добавляли еще 12 мг дисукцинимидилкарбоната и перемешивали еще 1.5 ч. Выливали в 25 мл насыщенного раствора дигидрофосфата калия, встряхивали в делительной воронке. Органическую фазу отделяли, сушили безводным сульфатом натрия, упаривали в вакууме. Очищали хроматографией на обращенной фазе, элюировали системой вода-ацетонитрил. Продукт собирали при 40% ацетонитрила. Фракции, содержащие продукт, упаривали до половины объема и экстрагировали хлористым метилом, сушили безводным сульфатом натрия и упаривали в вакууме. Выход соединения (VIb) составил 67 мг (26%) фиолетовая пена. Rf = 0.72, (метанол-хлороформ 1 : 3), *m/z* найдено: 688, рассчитано: 687.3, максимум длины волны поглощения = 603 нм (в воде). ЯМР ¹H в CDCl₃ (400 МГц) δ (м.д.): 8.51 (1H, d, *J* = 8.2), 8.44 (1H, dd, *J* = 8.2, 1.6), 7.99 (1H, d, *J* = 1.5), 6.64 (2H, s), 6.60 (2H, s), 5.46 (2H, s), 3.61–3.64 (4H, m), 2.94 (4H, s), 1.77 (6H, s), 1.48 (12H, d), 1.39 (6H, t, *J* = 7.0).

5-Sy630-N₃ 5-((3-Азидопропил)карбамоил)-2-(1,11-диэтил-2,2,4,8,10,10-гексаметил-10,11-дигидро-2H-пирано[3,2-g:5,6-g']дихинолин-1-иум-6-ил)бензоат (VIIa). 0.265 г 5-Карбоксиву630 (0.45 ммоль) растворяли в 10 мл безводного хлористого метилена, прибавляли при перемешивании 0.162 г (0.54 ммоль, 1.2 экв.) TSTU, затем 94 мкл (0.54 ммоль, 1.2 экв, 70 мг) диизопропилэтиламина и 27 мг (0.22 ммоль, 0.5 экв.) DMAP. Через 1 ч 20 мин реакционную смесь выливали при перемешивании в 100 мл 1%-ного раствора соляной кислоты. Экстрагировали 2 × 50 мл хлороформа, сушили безводным сульфатом натрия и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 10 мл безводного хлористого метилена, добавляли 68 мкл (0.675 ммоль, 1.5 экв.) аминопропилазида и 118 мкл (87 мг, 0.675 ммоль, 1.5 экв.) диизопропилэтиламина. Перемешивали 20 мин и упаривали в вакууме. Очищали хроматографией на силикагеле, элюировали 0–5% метанола в хлороформе, затем 6–8% метанола в хлороформе с 1% триэтиламина. Упаривали в вакууме и сушили в вакууме над P₂O₅. Выход соединения (VIIa) 212 мг (70%), фиолетовый порошок. Rf = 0.54, (метанол-хлороформ 1 : 4), *m/z* найдено: 673.423, рассчитано: 672.3, квантовый выход = 0.74 (в системе этанол-вода 1 : 1), коэффициент экстинкции (при максимуме поглощения) = 1.286 × 10⁵ М⁻¹ см⁻¹, максимум длины волны поглощения = 596 нм (в воде), 590 нм (в системе этанол-вода 1 : 1), максимум длины волны флуоресценции = 620 нм (в системе этанол-вода 1 : 1). ЯМР ¹H в CDCl₃ (500 МГц) δ (м.д.): 8.62 (1H, s, C₄'H), 8.19 (1H, d, *J* = 7.8, C₇'H), 7.58 (1H, t,

$J = 5.6$, CONH), 7.20 (1H, d, $J = 7.8$, C₆'H), 6.72 (2H, s, C₁₂H + C₁₃H), 6.50 (2H, s, C₅H + C₇H), 5.32 (2H, s, C₃H + C₉H), 3.61 (2H, dd, $J = 12.6$, 6.4, CONHCH₂), 3.53 (4H, m, N₁CH₂CH₃ + N₁₁CH₂CH₃), 3.45 (2H, t, $J = 6.7$, CH₂N₃), 1.97 (2H, qt, $J = 6.7$, CONHCH₂CH₂), 1.72 (6H, s, C₄-CH₃ + C₇-CH₃), 1.42 (12H, d, $J = 5.3$, C₂-2*CH₃ + C₁₀-2*CH₃), 1.34 (6H, m, N₁CH₂CH₃ + N₁₁CH₂CH₃).

6-Sy630-N₃ 4-((3-Азидопропил)карбамоил)-2-(1,11-диэтил-2,4,8,10,10-гексаметил-10,11-дигидро-2Н-пирано[3,2-g:5,6-g']дихинолин-1-иум-6-ил)бензоат (VIIb). 6-Sy630-NHS 66 мг (0.096 ммоль) растворяли в 10 мл сухого хлористого метилена, добавляли 19 мг (0.192 ммоль, 2 экв.) 3-аминопропилазида. Перемешивали 4 ч при комнатной температуре, разбавляли 10 мл хлористого метилена, промывали 2 × 10 мл 0.1% раствора трифторуксусной кислоты, 2 × 10 мл раствора гидрокарбоната натрия (насыщенный раствор—вода 1 : 1), 20 мл насыщенного раствора хлорида натрия. Очищали хроматографией на силикагеле. Элюировали 5% метанола в хлороформе с 1% триэтиламина. Выход соединения (VIIb) 41 мг (64%), сине-фиолетовый порошок. Rf = 0.27, (метанол—хлороформ 1 : 10 с 5% триэтиламина), m/z найдено: 673.248, рассчитано: 672.3.

ЯМР ¹H в CDCl₃ (500 МГц) δ (м.д.): 8.24 (1H, d, $J = 8.1$), 8.11 (1H, d, $J = 8.0$), 7.75 (2H, s), 6.66 (2H, s), 6.53 (2H, s), 5.35 (2H, s), 3.58 (4H, неразрешившийся q, $J = 6.8$, 2*CH₂N), 3.50 (2H, dt, $J = 15.8$, 7.9, CH₂NHCO), 2.36 (2H, t, $J = 6.9$, CH₂N₃), 1.92 (2H, qt, $J = 6.8$, -CH₂-), 1.66 (6H, s, 2*CH₃), 1.44 (12H, s, 4*CH₃), 1.33 (6H, t, $J = 6.9$, 2*CH₂CH₃). На основании спектра НМВС и HSQC удалось соотнести ЯМР ¹³C и подтвердить структуру каждого изомера. ЯМР ¹³C в CDCl₃ (126 МГц) δ (м.д.): 166.93 (COO-), 165.61 (CONH), 157.46 (2C, F), 157.29 (2), 151.54 (2C, D), 136.27 (6), 136.10 (1), 133.02 (3), 131.29 (2C, X), 131.18 (1), 128.45 (5), 127.79 (4), 125.41 (2C, E), 123.04 (2C, A), 122.29 (2C, H), 113.63 (2C, C), 94.90 (2C, B), 59.42 (2C, 2*C(CH₃)₂), 48.96 (a), 39.56 (2C, 2*NCH₂CH₃), 37.27 (c), 29.22, 29.05 (4C, 4*CH₃), 28.16 (b), 17.86 (2*CH₃), 12.76 (2*CH₂CH₃).

2-Амино-4-метоксиацетофенон (VIII). В приборе, снабженном хлоркальциевой трубкой, к 25 мл 1 М раствора треххлористого бора в хлористом метилена при охлаждении льдом по каплям добавляли раствор *m*-анизидина 2.777 мл (24.72 ммоль, 3.044 г) в 20 мл сухого бензола. Затем добавляли ацетонитрил 2.58 мл (2 экв. = 49.44 ммоль, 3.03 г) и хлорид алюминия 3.626 г (1.1 экв. = 27.19 ммоль). Кипятили 2 ч с обратным холодильником, затем отгоняли с дефлегматором хлористый метилен (пока температура не достигала 80°C). Кипятили еще 5 ч. Добавляли еще 1.29 мл (1 экв.) ацетонит-

рила и продолжали кипятить 8 ч. Затем при охлаждении льдом добавляли 90 мл 2 М раствора соляной кислоты. Кипятили 1 ч 15 мин с обратным холодильником, охлаждали, отделяли органический слой, водный подщелачивали 101 мл 2 М раствора гидроксида натрия до pH 3. Охлаждали до 3°C, выпавший осадок отфильтровывали, фильтрат экстрагировали 2 × 50 мл хлористого метилена, сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали в вакууме. Остаток объединяли с полученным осадком и перекристаллизовывали из водного этанола. Получено 1.078 г вещества в виде блестящих бесцветных призм. Выход 2-амино-4-метоксиацетофенона 27%.

ЯМР ¹H в CDCl₃ (500 МГц) δ (м.д.): 7.64 (1H, d, $J = 9.0$, C₆H), 7.30 (1.5H, b, NH₂), 6.23 (1H, d, $J = 2.3$, C₃H), 6.13 (1H, dd, $J = 9.0$, 2.5, C₅H), 3.73 (3H, s, OCH₃), 2.41 (3H, s, COCH₃).

Метилловый эфир 2,4-диметил-7-метоксихинолин-3-карбоновой кислоты (IX). Смешивали 0.772 г (4.67 ммоль) 2-амино-4-метоксиацетофенона, 0.605 мл (1.2 экв. = 5.6 ммоль, 0.651 г) метилацетата и 0.804 г (1 экв.) *n*-толуолсульфонокислоты. Медленно нагревали до 100°C на масляной бане и выдерживали при этой температуре полчаса. Охлаждали, добавили 14 мл воды и нейтрализовали 1.56 мл 12% раствора гидроксида натрия, перемешивали 5 мин, образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали на фильтре 3 раза водой. Очищали флэш-хроматографией на силикагеле. Элюировали в системе 2–50% этилацетата в гексане. Вещество выходило при 25–30% этилацетата. Получено 0.664 г в виде бледно-желтой массы. Выход метилового эфира 2,4-диметил-7-метоксихинолин-3-карбоновой кислоты 64%. Rf = 0.73 (метанол—хлороформ 1 : 9). ЯМР ¹H в CDCl₃ (500 МГц) δ (м.д.): 7.82 (1H, d, $J = 9.2$, C₅H), 7.30 (1H, s, C₈H), 7.13 (1H, dd, $J = 9.1$, 2.5, C₆H), 3.96 (3H, s, C₇-OCH₃), 3.92 (3H, s, COO-CH₃), 2.65 (3H, s, C₂-CH₃), 2.59 (3H, s, C₄-CH₃). ЯМР ¹³C в CDCl₃ (126 МГц) δ (м.д.): 170.04 (COO), 161.36 (C₇), 155.08 (C_{8a}), 149.34 (C₂), 141.90 (C₄), 125.90 (C₃), 125.39 (C_{4a}), 120.81 (C₃), 119.38 (C₆), 107.54 (C₈), 55.69 (C₇-OCH₃), 52.54 (COOCH₃), 24.07 (C₂-CH₃), 15.94 (C₄-CH₃).

2,4-Диметил-7-метоксихинолин-3-карбоновая кислота (X). К 0.66 г (3 ммоль) метилового эфира 2,4-диметил-7-метоксихинолин-3-карбоновой кислоты добавляли 8 мл 2 М раствора гидроксида натрия (5.5 экв., 16.5 ммоль), кипятили с обратным холодильником в течение 15 ч. Добавили 12 мл воды и 2.66 мл 6 М раствора соляной кислоты. Выдерживали ночь в холодильнике, отфильтровали осадок, промывали на фильтре водой, сушили в вакууме над P₂O₅. Получено 0.436 г вещества в виде бледно-желтых кристаллов. Выход 2,4-диметил-7-метоксихинолин-3-карбоновой кислоты 70%.

ЯМР ^1H в DMSO- d_6 (500 МГц) δ (м.д.): 8.27 (1H, d, $J = 9.4$, C_5H), 7.62 (1H, d, $J = 2.3$, C_8H), 7.47 (1H, dd, $J = 9.3, 2.4$, C_6H), 3.96 (3H, s, OCH_3), 2.83 (3H, s, $\text{C}_2\text{-CH}_3$), 2.79 (3H, s, $\text{C}_4\text{-CH}_3$).

N-гидроксисукцинимидные эфиры 5- и 6-карбок-си изомеров Су630 вводили в состав 5'-аминосодержащих олигонуклеотидов по следующей общей методике. К 200 мкл 5 мкМ раствора олигонуклеотида, содержащего аминокгруппу на 5'-конце в 0.1 М водном растворе гидрокарбоната натрия (рН 8) добавляли 5-ти кратный избыток N-гидроксисукцинимидного эфира красителя (20 мкл раствора с концентрацией 10 мг/мл в ДМСО). Полученную смесь перемешивали на шейкере со скоростью 1400 об./мин при температуре 25°C в течение 12 часов. Модифицированные олигонуклеотиды очищали методом электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле с последующей очисткой обращенно-фазовой ВЭЖХ. Азидные производные 5- и 6-карбок-си изомеров Су630 вводили в состав 5'-алкинсодержащих олигонуклеотидов по методике, описанной в [22]. ПЦР в реальном времени проводили по следующей циклограмме: денатурация: 95°C – 5 мин, затем 49 циклов: 60°C – 40 с, 95°C – 15 с. Рабочие концентрации праймеров были 5 мкМ, зондов – 2.5 мкМ. В реакцию брали 5 единиц фермента ДНК-полимеразы *SynTaq* с ингибирующими активностью фермента антителами (ООО “Синтол”, E-039-1000).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена по государственному заданию ФГБНУ ВНИИСБ № 0574-2019-0003 по теме “Расширение спектра используемых в молекулярно-генетических методах анализа флуоресцентных красителей”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Johnson I.D.* Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies. 11th ed. Life Technologies. Corp., 2010.
2. *Valeur B., Berberan-Santos M.N.* Molecular Fluorescence: Principles and Applications. 2nd ed. Wiley-VCH. Weinheim. Germany, 2013.
3. (a) *Farzan V.M., Ulashchik E.A., Martynenko-Makaev Yu.V., Kvach M.V., Aparin I.L., Brylev V.A., Prikazhikova T.A., Maklakova S.Yu., Majouga A.G., Ustinov A.V., Shipulin G.A., Shmanai V.V., Korshun V.A., Zaitsepina T.S.* // *Bioconjugate Chem.* 2017. 28 (10). P. 2599. (b) *Mason W.T.* Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity: A Practical Guide to Technology for Quantitative Real-Time Analysis. 2nd ed. Academic Press. San Diego, 1999. (c) *Taatjes D.J., Mossman B.T.* Cell Imaging Techniques. Humana Press. Totowa. New Jersey, 2006.
4. *Liu Jixiang, Diwu Zhenjun, Leung Wai-Yee, Lu Yixin, Patch B., Haugland R.P.* // *Tetrahedron Lett.* 2003. 44. P. 4355.
5. (a) *Elderfield R.C.* Heterocyclic Compounds. New York. N.Y. 1961. 45. P. 60. (b) *Walser A., Zenchoff G., Fryer R.I.* // *J. Heterocycl. Chem.* 1976. 13. P. 131.
6. *Sugasawa Tsutomu, Toyoda Tatsuo, Adachi Makoto, Sasakura Kazuyuki* // *J. Am. Chem. Soc.* 1978. 100. P. 4842.
7. *Friedlander P.* // *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 1882. 15. P. 2572–2575.
8. *Wang Guan-Wu, Jia Cheng-Sheng, Dong Ya-Wei* // *Tetrahedron Lett.* 2006. 47. P. 1059.
9. *Jia Cheng-Sheng, Ze Zhang, Tu Shu-Jiang, Wang Guan-Wu* // *Org. Biomol. Chem.* 2006. 4. P. 104.
10. *Selvam N.P., Saravanan C., Muralidharan D., Perumal P.T.* // *J. Heterocyclic Chem.* 2006. 43. P. 1379.
11. *Narasimhulu M., Reddy T.S., Mahesh K.C., Prabhakar P., Rao Ch.B., Venkateswarlu Y.* // *J. Mol. Catal. A: Chem.* 2007. 266. P. 114.
12. *De S.K., Gibbs R.A.* // *Tetrahedron Lett.* 2005. 46. P. 1647.
13. *Wu Jie, Zhang Liang, Diao Tian-Ning* // *Synlett.* 2005. P. 2653.
14. *Kumar S., Saini A., Sandhu J.S.* // *Synth. Commun.* 2007. 37. P. 4071.
15. *Bose D.S., Kumar R.K.* // *Tetrahedron Lett.* 2006. 47. P. 813.
16. *Varala R., Enugala R., Adapa S.R.* // *Synthesis.* 2006. P. 3825.
17. *Arumugam P., Karthikeyan G., Atchudan R., Muralidharan D., Perumal P.T.* // *Chem. Lett.* 2005. 34. P. 314.
18. *Zhang L., Wu J.* // *Adv. Synth. Catal.* 2007. 349. P. 1047.
19. *Zolfigol M.A., Salehi P., Ghaderi A., Shiri M.* // *Catal. Commun.* 2007. 8. P. 1214.
20. *Wu Jie, Xia Hong-Guang, Gao Ke* // *Org. Biomol. Chem.* 2006. 4. P. 126.
21. *Roberts E., Turner E.E.* // *J. Chem. Soc.* 1927. P. 1832.
22. *Натыров А.Н., Власова Н.А., Матвиенко И.В., Волков Е.М., Байрамов В.М., Курочкин В.Е., Алексеев Я.И.* // *Биоорг. хим.* 2018. 44. 5. С. 570–580. [*Natyrov A.N., Vlasova N.A., Matvienko I.V., Volkov E.M., Bajramov V.M., Kurochkin V.E., Alekseev Y.I.* // *Rus. J. Bioorg. Chem.* 2018. 44. 5. P. 562–571.]
23. *Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Варламов Д.А., Коновалов С.В., Курочкин В.Е., Маракушин Н.Ф., Петров А.И., Петросяков А.О., Румянцев Д.А., Скоблilов Е.Ю., Соколов В.Н., Фесенко В.А., Чернышев А.В.* // *Научное приборостроение.* 2006. 16. 3. С. 132–136.

Synthesis of Derivatives of Fluorescent Rhodamine Dye on the Basis of Dihydroquinolin for Analysis of Nucleic Acids by Real Time Polymerase Chain Reaction

I. V. Matvienko*, **, #, V. M. Bayramov*, N. A. Parygina*, **,
V. E. Kurochkin***, and Y. I. Alekseev**, ***

#Phone: +7 (495) 984-69-93#118; e-mail: storz@mail.ru

*All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, ul. Timiryazevskaya 42, Moscow, 127550 Russia

**“Syntol” LLC, ul. Timiryazevskaya 42, Moscow, 127550 Russia

***Institute for Analytical Instrumentation of the Russian Academy of Sciences,
ul. Ivana Chernyh 31/33, St. Petersburg, 198095 Russia

An optimized synthesis scheme for derivatives of xanthene fluorescent dye based on dihydroquinoline has been developed. The possibility of using them as effective fluorophores as part of hybridization probes for real-time PCR with the detection on an individual spectral channel is demonstrated for the first time.

Keywords: fluorescent rhodamine dyes, real-time polymerase chain reaction, nucleic acids, quinolines



КЛИК-СИНТЕЗ, МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ, ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (MDA-MB 231) И АНТИ-ВИЧ-АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 1,4-ДИЗАМЕЩЕННЫХ-1,2,3-ТРИАЗОЛТИМИНА¹

© 2020 Faeza Abdul Kareem Almashal*, Hamsa Hussein Al-Hujaj**,
Ahmed Majeed Jassem*,# and Najim Aboud Al-Masoudi***

*College of Education for Pure Sciences, Department of Chemistry, Basrah University, Basrah, Iraq

**College of Pharmacy, University of Basrah, Basrah, Iraq

***College of Science, Department of Chemistry, Basrah University, Basrah, Iraq

Поступила в редакцию 02.12.2019 г.

После доработки 17.12.2019 г.

Принята к публикации 27.12.2019 г.

Новая серия производных 1,4-дизамещенных 1,2,3-триазолтимина (**VIa–e**) была синтезирована и охарактеризована с помощью спектроскопических исследований. Цитотоксические активности *in vitro* выбранных соединений против линии раковых клеток человека (MDA-MB 231) оценивали с помощью анализа МТТ. 4-Азидо-*N*-замещенные бензолсульфонамиды (**Vc–e**) и 4,4'-((5-метил-2,4-диоксопиримидин-1,3(2*H*, 4*H*)-диил)бис(метилен))-бис(1*H*-1,2,3-триазол-4,1-диил))-бис(*N*-(4-метилпиримидин-2-ил)бензолсульфонамид) (**VIc**) проявлял значительную цитотоксическую активность с значениями IC_{50} 1.61, 1.41, 1.61 и 1.81 мкМ соответственно. Молекулярное док-исследование 4-азидо-*N*-(4,6-диметилпиримидин-2-ил)бензолсульфонамида (**Vd**) и 4,4'-((5-метил-2,4-диоксопиримидин-1), 3(2*H*, 4*H*)-диил)бис(метилен))-бис(1*H*-1,2,3-триазол-4,1-диил))-бис(*N*-(4-метилпиримидин-2-ил)бензолсульфонамид) (**VIc**) показало водородную связь с аминокислотными остатками рецепторов 1X7R и 1A53 соответственно. Эти производные полезны в качестве отправных точек для дальнейшего изучения новых противоопухолевых препаратов и для подтверждения потенциала триазолсульфонамидных аналогов в качестве соединений свинца при открытии противоопухолевых препаратов. Кроме того, производные 1,4-дизамещенных-1,2,3-триазолтимина (**VIa–e**) были оценены *in vitro* на антивирусную активность в отношении репликации ВИЧ-1 и ВИЧ-2 в клетках МТ-4. Результаты показали, что производные 1,4-дизамещенного-1,2,3-триазолтимина (**VIc–e**) обладают сильной активностью в отношении репликации ВИЧ-1 со значениями IC_{50} 11.42, ≥ 15.25 и 14.36 мкМ, $SI > 4$, ≤ 6 , > 9 соответственно.

Ключевые слова: клеточная линия рака молочной железы (MDA-MB 231), анти-ВИЧ активность, молекулярный докинг, клик-реакция, производные 1,2,3-триазолтимина

DOI: 10.31857/S0132342320030033

¹ Полный текст статьи печатается в английской версии журнала.

Автор для связи: (эл. почта: ahmed.majedd@uobasrah.edu.iq).



УДОБНЫЙ СИНТЕЗ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ САЛЬФОНАМИДА, ХАЛКОНА И ПИРАЗОЛИНА В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ АГЕНТОВ¹

© 2020 А. Р. С. Bonakdar*, А. Sadeghi*, Н. Р. Aghaei*,
К. Beheshtimaal**, S. M. R. Nazifi***, A. R. Massah*.*#

*Department of Chemistry, Shahreza Branch, Islamic Azad University, 86145–311, Shahreza, Iran

**Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Falavarjan, Isfahan, Iran

***Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, 81746-73461 Isfahan, Iran

Поступила в редакцию 11.11.2019 г.

После доработки 25.11.2019 г.

Принята к публикации 17.12.2019 г.

Были синтезированы новые производные хальконсульфонамида, начиная с бензофенонов и альдегидов, в 3 этапа. Кроме того, (Е)-3-(4-хлорфенил)-1-(4-метоксифенил)проп-2-ен-1-он превращался в различные пиразолины в четыре этапа. Синтез сульфонамидов проводили в условиях отсутствия растворителей при комнатной температуре, и продукты получали с высокой чистотой после простой обработки без использования какого-либо метода хроматографии для очистки. Все продукты были оценены на предмет их антибактериальной активности *in vitro* в отношении *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*.

Ключевые слова: халкон, пиразолин, сульфаниламиды, не содержащие растворителей, антибактериальная активность

DOI: 10.31857/S0132342320030069

¹ Полный текст статьи печатается в английской версии журнала.

Автор для связи: (тел.: +98 (321) 329-25-22; эл. почта: Massah@iaush.ac.ir).



СИНТЕЗ РЯДА НОВЫХ ТИАЗОЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРАЗОЛИНА И ОЦЕНКА ИХ ПРОТИВОМИКРОБНОЙ, ПРОТИВОГРИБКОВОЙ И ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ¹

© 2020 Safaa I. Elewa*, Eman Mansour*, Ibrahim F. Nassar**, #, and Amal A. I. Mekawey***

*Department of Chemistry, Faculty of Women for Arts, Science and Education, Egypt, Ain Shams University, Cairo, 11566 Egypt

**Faculty of Specific Education, Ain Shams University, 365 Ramsis street, Abassia, Cairo, 11566 Egypt

***The Regional Center of Mycology and Biotechnology, Al-Azhar University, Cairo, 11651 Egypt

Поступила в редакцию 27.05.2019 г.

После доработки 03.07.2019 г.

Принята к публикации 20.12.2019 г.

3-(2-Тиенил)-5-арил-1-тиокарбамоил-2-пиразолины вводили в реакцию с производными хлорэтона и гидразонил хлорида в этаноле для получения соответствующих производных тиазолилпиразолина и тиофенилпиразолил-5-замещенных арилдiazенилтиазола. Структуры полученных соединений были установлены методами элементного и спектрального (ИК, ¹H и ¹³C ЯМР) анализом. Противомикробную и противогрибковую активность новых соединений оценивали на четырех бактериальных и пяти грибковых штаммах. Помимо этого, исследовали противоопухолевую активность двух из синтезированных соединений, 1-(2-(5-(4-хлорофенил)-3-(тиофен-2-ил)-4,5-дигидропиразол-1-ил)-4-метилтиазол-5-ил)этан-1-она и (2-(5-(4-хлорофенил)-3-(тиофен-2-ил)-4,5-дигидро-1H-пиразол-1-ил)-4-метил-5-(фенилдиазенил)тиазола, по отношению к клеткам линий HEPG-2, HCT-116, MCF-7, ВНК и SАСО-2. Полученные результаты свидетельствуют о том, что указанные два соединения обладают наиболее высокой активностью по отношению ко всем исследованным грамположительным и грамотрицательным бактериям, а также грибам. Также эти соединения показали высокую противоопухолевую активность по отношению к двум опухолевым линиям клеток (HCT-116 и SАСО-2).

Ключевые слова: тиофен, тиазол, пиразолин, противомикробная, противогрибковая, противоопухолевая активность

DOI: 10.31857/S0132342320030100

¹ Полный текст статьи печатается в английской версии журнала.

Автор для связи: (эл. почта: Dr.Ibrahim.Nassar@sedu.asu.edu.eg).



СИНТЕЗ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ ТИЕНО[2,3-*d*]ПИРИМИДИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ И ИХ ТРИАЗИНИЛ И ТЕТРАЗИНИЛ ПРОИЗВОДНЫХ¹

© 2020 **Walaa I. El-Sofany***, ******, **#**, **Dalia M. Othman***,
Asma M. Mahran*, **Mai Manawaty*****, and **Wael A. El-Sayed***, ********

* *Photochemistry Department, National Research Centre, El-Behouth St, Dokki, Cairo, 12622 Egypt*

** *Chemistry Department, College of Science, Hail University, Hail, 81412 Kingdom of Saudi Arabia*

*** *Department of Pharmacology, National Research Centre, Dokki, Cairo, 12622 Egypt*

**** *Chemistry Department, College of Science, Qassim University, Buraydah, 51431 Kingdom of Saudi Arabia*

Поступила в редакцию 30.08.2019 г.

После доработки 16.11.2019 г.

Принята к публикации 24.12.2019 г.

Новые амино и гидразинил производные тиенопиримидина были получены из 2-гидразилниил-замещенного тиенопиримидина. Исследована противоопухолевая активность полученных соединений по отношению к клеточным линиям рака простаты (PC3), карциномы легкого (A549) и гепатоклеточной карциномы (HepG2) человека. Производные бензотиенопиримидина с тиоксоэтантаноамидом, пиримидотетразином, карботиоамидом и гидразинил глицином показали высокую активность по отношению к клеткам линий PC3 и A549. Помимо этого производные тиенопиримидина и их тиенопиримидиноновые аналоги были избирательно активны по отношению к этим клеткам. Некоторые из синтезированных соединений показали умеренную активность по отношению к клеткам линий PC3 и A549.

Ключевые слова: тиенопиримидин, пиримидотетразин, пиримидотриазин, противоопухолевая активность, PC3, A549, HepG2

DOI: 10.31857/S0132342320030082

¹ Полный текст статьи печатается в английской версии журнала.

Автор для связи: (эл. почта: walaa.elsofany@gmail.com; waelshendy@gmail.com).



ДИЗАЙН И СИНТЕЗ 1-ЗАМЕЩЕННЫХ 4-(4-НИТРОФЕНИЛ)-[1,2,4]ТРИАЗОЛО[4,3-*a*]ХИНАЗОЛИН-5(4*H*)-ОНОВ В КАЧЕСТВЕ НОВОГО КЛАССА АНТИГИСТАМИННЫХ АГЕНТОВ¹

© 2020 М. Gobinath*, N. Subramanian**,

V. Alagarsamy***, #, S. Nivedhitha*, and Viswas Raja Solomon***

*Department of Pharmaceutical Chemistry, Ratnam Institute of Pharmacy, Pidathapolur, Nellore, 524346 India

**Department of Pharmaceutical Technology, Anna University of Technology Tiruchirappalli, Tiruchirappalli, 620024 India

***Medicinal Chemistry Research Laboratory, MNR College of Pharmacy, Sangareddy, Gr. Hyderabad, 502294 India

Поступила в редакцию 28.02.2019 г.

После доработки 14.06.2019 г.

Принята к публикации 18.11.2019 г.

Некоторые новые 1-замещенные 4-(4-нитрофенил)-[1,2,4]триазоло[4,3-*a*]хиназолин-5(4*H*)-оны были получены и исследованы с точки зрения их H₁-антигистаминной активности. Структуры новых соединений подтверждены методами ИК, ¹H ЯМР и масс-спектрометрии; чистота соединений определена с помощью элементного анализа. Антигистаминная активность установлена в ходе эксперимента по защите морских свинок от бронхоспазма, вызванного гистамином. Уровень защиты новыми соединениями изменялся в пределах 68–71.56%, для сравнения уровень защиты стандартным препаратом хлорфениламин малеатом составляет 70.71%. Седативные свойства полученных соединений также исследованы; показано, что седативная активность соединений ничтожно мала по сравнению с хлорфениламин малеатом.

Ключевые слова: гистамин, триазол, хиназолин-5(4*H*)-оны, антигистаминная активность, седативная и гипнотическая активность

DOI: 10.31857/S0132342320030136

¹ Полный текст статьи печатается в английской версии журнала.

Автор для связи: (тел.: +91 (8455) 23-06-90; эл. почта: drvalagarsamy@gmail.com).



СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА НЕКОТОРЫХ *N*-ЗАМЕЩЕННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХИНОКСАЛИНА В КАЧЕСТВЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АГЕНТОВ¹

© 2020 Adil A. Gobouri[#]

Department of Chemistry, Faculty of Science, Taif University, Al-Haweiah, P.O. Box 888, Zip Code 21974, Taif, Saudi Arabia

Поступила в редакцию 02.12.2019 г.

После доработки 11.12.2019 г.

Принята к публикации 26.12.2019 г.

Новые гибридные молекулы, содержащие производные 1-(*N*-замещенного) хиноксалина, были синтезированы путем конденсации 3-гидрокси-2-оксохиноксалина с 2,3-ненасыщенными карбонильными соединениями в различных условиях с целью получения сложноэфирных и амидных производных. Структура полученных соединений была разъяснена на основе ИК, ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР, масс- и элементного анализа. Все приготовленные соединения оценивали на их противораковую активность в отношении двух раковых клеточных линий (MCF-7 и HeLa). Анализ клеточного цикла соединения гидразидов 3-(*n*-метоксифенил)-3-(3-гидрокси-2-оксохиноксалин-1-ил)-2-цианоакриловой кислоты показал остановку клеточного цикла при S-фазе и апоптозе Pre-G1. Процент ингибирования синтеза ДНК показал, что это упомянутое соединение проявляло равную активность по отношению к доксорубину. Кроме того, апоптоз был подтвержден увеличением процента каспазы на 3/7 выше, чем цисплатина.

Ключевые слова: хиноксалин, антипролиферативный анализ, анализ клеточного цикла, каспаза 3/7, цисплатин

DOI: 10.31857/S013234232003015X

¹ Полный текст статьи печатается в английской версии журнала.

[#] Автор для связи: (эл. почта: gobouria@gmail.com).



СИНТЕЗ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТРАНСФЕКЦИИ С ПОМОЩЬЮ БИВАЛЕНТНЫХ КАТИОННЫХ ЛИПИДОВ С АММОНИЕВОЙ ГОЛОВОЙ И РАЗЛИЧНЫМИ ГИДРОФОБНЫМИ ХВОСТАМИ¹

© 2020 W. Radchatawedchakoon*.,#, N. Niyomtham**, C. Thongbamrer*, **, C. Posa**, U. Sakee*, W. Roobsoong***, J. Sattabongkot***, P. Opanasopit****, and B. Yingyongnarongkul**

*Creative Chemistry and Innovation Research Unit, Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai, Maha Sarakham, 44150 Thailand

**Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok, Bangkok, 10240 Thailand

***Mahidol Vivax Research Unit, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Ratchatewi, Bangkok, 10400 Thailand

****Pharmaceutical Development of Green Innovations Group (PDGIG), Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom, 73000 Thailand

Поступила в редакцию 22.05.2019 г.

После доработки 10.09.2019 г.

Принята к публикации 20.12.2019 г.

Катионные липиды с амидным или карбаматным линкером и бивалентной катионной головой были получены и исследованы с точки зрения эффективности трансфекции. Шестнадцать липидов с двойными ацильными или холестериновыми хвостами и бивалентными аммониевыми головами получены с помощью твердофазного синтеза. Структуры полученных липидов установлены с помощью методов спектроскопии. Аффинность к ДНК полученных липидов подтверждена методом торжования в геле. Липиды с несимметричными гидрофобными хвостами (лауроил и стеароил) показали более высокую эффективность трансфекции по сравнению с другими липидами в присутствии липида-хелпера, диолеоилфосфатидилэтаноламина (ДОФЭ), в оптимизированном составе на клетках НЕК293. В присутствии 20% сыворотки те же липиды показали эффективность трансфекции, аналогичную величине для препарата LipofectamineTM 2000 (L2K). Эффективность трансфекции активных липидов была исследована на клетках линий HeLa, РС3 и НС-04. Что касается выживаемости клеток в присутствии липидов, самые активные трансфецирующие молекулы были нетоксичны по отношению к клеткам НЕК293 и НС-04 (выживаемость >85%). Липиды образовывали с ДНК (отношение ДНК/липид 1 : 30) частицы (липоплексы) размера около 380 нм с зета-потенциалом около 35 мВ.

Ключевые слова: катионные липиды, диэтилентриамин, доставка ДНК, твердофазный синтез, трансфекция

DOI: 10.31857/S0132342320030239

¹ Полный текст статьи печатается в английской версии журнала.

Автор для связи: (тел.: +(66) 43-75-42-46; факс: +66 43 754246; эл. почта: widchaya.r@msu.ac.th; widchaya@hotmail.com).



ДИЗАЙН, СИНТЕЗ, ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПРОИЗВОДНЫХ ИЗОАЗОЛА ПИРАЗОЛИНА¹

© 2020 Т. Radhika*, **, #, А. Vijay*, В. V. Harinadha*, and В. Madhavareddy*

*Department of Pharmaceutical Chemistry, G. Pulla Reddy College of Pharmacy,
Mehdipatnam, Hyderabad, Telangana, 500028 India

**Department of Pharmacy, University College of Technology, Osmania University, Hyderabad, Telangana, India

Поступила в редакцию 13.11.2019 г.

После доработки 04.12.2019 г.

Принята к публикации 28.12.2019 г.

Нами была разработана и синтезирована новая серия производных изоксазола, содержащих пиразолин. Синтезированные соединения охарактеризованы спектрами ¹H NMR, IR и ESI-MS. Кроме того, все синтезированные соединения были состыкованы с целевым DHFR человека (ID PDB: 1KMS). Среди всех соединений соединение 5-(4-метоксифенил)-3-(5-метил-3-(4-нитрофенил)изоксазол-4-ил)-4,5-дигидро-1H-пиразол-1-ил(фенил)метанон оказалось наиболее сильным, проявляя самую высокую аффинность связывания с оценкой стыковки 153.763. Все синтезированные соединения были подвергнуты скринингу на противоопухолевую активность против клеточных линий рака молочной железы человека MCF-7 и MDA-MB-231 посредством анализа МТТ. Из всех синтезированных соединений (5-(4-метоксифенил)-3-(5-метил-3-(4-нитрофенил)изоксазол-4-ил)-4,5-дигидро-1H-пиразол-1-ил) (фенил) метанон обладает хорошей активностью со значениями IC₅₀ в диапазоне 3–4 мкг/мл. Кроме того, все соединения подвергали скринингу на противотуберкулезный анализ против штамма H₃₇Rv и штамма с множественной лекарственной устойчивостью DKU 156; среди всех четырех соединений они проявляли значительную активность при концентрациях 6.25 мкг/мл. Таким образом, значение MIC может находиться в диапазоне от 3.12 до 6.25 мкг/мл.

Ключевые слова: противораковый препарат, аффинность связывания, докинг, изоксазол, пиразолы, противотуберкулезный препарат

DOI: 10.31857/S0132342320030252

¹ Полный текст статьи печатается в английской версии журнала.

Автор для связи: (эл. почта: radhikavanam25@gmail.com).



СИНТЕЗ И АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ КУМАРИНА И ДИКУМАРОЛА¹

© 2020 М. К. А. Regal*, S. S. Shaban*, #, and S. A. El-Metwally**

*Chemistry Department, Faculty of Science, Ain Shams University, Cairo, 11566 Egypt

**Basic Science Department, Higher Technological Institute, 10th of Ramadan City, 228, Egypt

Поступила в редакцию 13.11.2019 г.

После доработки 27.11.2019 г.

Принята к публикации 05.12.2019 г.

Реакция межфазного катализа 4-гидрокси-6-метил-2Н-хромен-2-она с алкилгалогенидами дает продукты алкилирования C₄ производных 2Н-хромен-2-она с заметным выходом, тогда как с фенил-изотиоцианатом получается продукт присоединения C₃ 4-гидрокси-6-метил-2-оксо-N-фенил-2Н-хромен-3-карботиоамида, также была исследована одна трехкомпонентная реакция фазового переноса. Обработка 4-гидрокси-6-метил-2Н-хромен-2-она ароматическими альдегидами в различных молярных соотношениях дает 3-арилидин и производные дикумарола. Однако пиранохромен и пиранопиридин были получены по реакции арилидина с этилацетатом в реакции циклоприсоединения Михаэля. Стабильность пиранового кольца в 3-арилидине и дикумароле по отношению к различным нуклеофильным реагентам в условиях дефлегмации и/или синтеза была изучена под действием гидразин-гидрата, ацетата аммония, метиламина и *n*-толуидина, что позволило получить соединения 1,2-бис(бензо[d][1,3]диоксол-5-илметил)гидразин, 1,2-бис(4-метоксибензил)гидразин и производные 2,4-бис((2,6-дигидрокси-3-метилфенил)(гидрокси)метил)-1-(4-метоксифенил)-4-(*n*-толил)пиперидин-3,5-диона. Исследована антимикробная активность некоторых синтезированных соединений.

Ключевые слова: межфазный катализ-алкилирование, 3-арилидин, дикумарол, реакции Михаэля

DOI: 10.31857/S0132342320030288

¹ Полный текст статьи печатается в английской версии журнала.

Автор для связи: (эл. почта: safashaban@ymail.com).



СТРУКТУРНЫЙ ПРОФИЛЬ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АДЕНОЗИНА В КАЧЕСТВЕ АНТИАГРЕГАНТОВ НА ОСНОВАНИИ АНАЛИЗА 3D-QSAR С ПОМОЩЬЮ АЛГОРИТМОВ CoMFA, CoMSIA И SOMFA¹

© 2020 Shunlai Li*, XueFeng Bao*, Chenghu Lu*,
Chaorui Ren*, Guocheng Liu*, and Hongguang Du*[#]

*College of Science, Beijing University of Chemical Technology, Chaoyang District, Beijing, 100029 China

Поступила в редакцию 11.06.2019 г.

После доработки 23.08.2019 г.

Принята к публикации 29.12.2019 г.

В работе серия новых производных аденозина исследована с помощью методов сравнительного анализа молекулярных полей (comparative molecular field analysis, CoMFA), сравнительного анализа индексов молекулярного подобия (comparative molecular similarity indices analysis, CoMSIA) и анализа самоорганизующихся молекулярных полей (self-organizing molecular field analysis, SOMFA). Получены статистически значимые коэффициенты (CoMFA, $q^2 = 0.560$, $r^2 = 0.940$, F value = 71.850 и $SEE = 0.097$; CoMSIA, $q^2 = 0.528$, $r^2 = 0.943$, F value = 29.29 и $SEE = 0.108$; SOMFA, $r^2 = 0.615$, $r_{cv}^2 = 0.577$, F value = 60.797 и $SEE = 0.226$), а созданные модели опробованы на тестовых выборках. Тщательный анализ контурных карт позволит разработать новые производные аденозина с высокой эффективностью ингибирования агрегации тромбоцитов для будущего синтеза и исследований.

Ключевые слова: производные аденозина, дизайн, антиагрегантная активность, 3D-QSAR, CoMFA

DOI: 10.31857/S0132342320030173

¹ Полный текст статьи печатается в английской версии журнала.

[#] Автор для связи: (тел.: +86 (106) 443-92-18; эл. почта: dhg@mail.buct.edu.cn).



УДК 547.782

СИНТЕЗ И ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОГО АЦЕТИЛЕНОВОГО АНАЛОГА ХРОМОФОРА БЕЛКА Kaede

© 2020 г. Э. Р. Зайцева*, **, А. Ю. Смирнов*, А. С. Мишин*.,#, М. С. Баранов*, ***

*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Россия, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10**Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева,
Россия, 125047, Москва, Миусская площадь, 9***Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова,
Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

Поступила в редакцию 22.11.2019 г.

После доработки 29.11.2019 г.

Принята к публикации 26.12.2019 г.

В результате использования модифицированной реакции Соногаширы впервые синтезирован ацетиленовый аналог хромофора белка Kaede – (Z)-2-((4-(диэтиламино)фенил)этинил)-5-(4-гидроксидибензидил)-3-метил-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-он. Изучение оптических свойств данного соединения установило, что максимумы абсорбции и эмиссии сдвинуты в длинноволновую область по сравнению с классическим хромофором GFP, а стоксов сдвиг достигает почти 150 нм.

Ключевые слова: имидазолы, хромофоры, флуоресцентные красители, GFP, Kaede, реакция Соногаширы, оптические свойства

DOI: 10.31857/S0132342320030343

Ключевыми из современных подходов к изучению процессов, протекающих в живых клетках, являются методы визуализации, связанные с испусканием света. Важнейшей составляющей данных методов является введение в изучаемый объект люминесцентной либо флуоресцентной метки. Среди последних стоит отдельно отметить многочисленные производные хромофора зеленых флуоресцентных белков (GFP), содержащие в своем составе бензилиденимидазолон [1]. Данный класс соединений обладает большой вариативностью оптических свойств, значительным стоксовым сдвигом, хорошей растворимостью в воде, высокой проницаемостью через цитоплазматическую мембрану, низкой токсичностью и синтетической доступностью [2–4].

Для биологических объектов характерно высокое поглощение коротковолнового излучения (которое зачастую нарушает протекающие биологические процессы) и низкое поглощение длинноволнового. Поэтому при проведении биомедицинских исследований предпочтительным является использование меток с максимумами поглощения и эмиссии флуоресценции в длинновол-

волевой части видимого спектра. Одной из основных синтетических стратегий достижения батохромного сдвига является увеличение размера сопряженной π -системы молекулы хромофора. Примером такого подхода в случае бензимидазолонов являются аналоги хромофора белка Kaede, содержащие в своем составе стирольный заместитель во втором положении имидазолонового цикла [5]. Данные соединения уже используются как флуоресцентные [6, 7] или флуорогенные (вещества, увеличивающие квантовый выход флуоресценции при связывании с целевым объектом) метки [8, 9] в биомедицинских исследованиях. Однако, за все время изучения аналогов хромофора белка Kaede не были получены их ацетиленовые производные. В настоящей работе мы впервые разработали подход к синтезу данного класса соединений и на одном примере рассмотрели их доступность и оптические свойства.

В качестве целевого соединения нами было выбрано вещество (V) (рис. 1). Одним из самых распространенных методов синтеза ацетиленов является реакция Соногаширы, ее применение предполагает вовлечение в реакцию терминального алкина и арил- либо гетарилгалогенида. В литературных источниках не описаны 2-галоген-

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 995-55-57 (2074); эл. почта: mishin@ibch.ru).

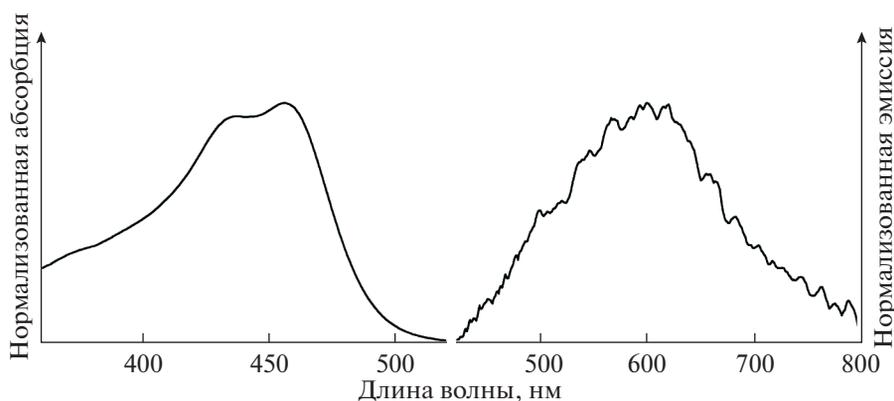


Рис. 1. Спектры поглощения и эмиссии соединения (V) в ацетонитриле.

имидазолы, однако существуют примеры проведения реакции Соногаширы с участием алкилтиопроизводных, в которых происходит катализируемое комплексами палладия замещение серосодержащей группы на ацетилен [10, 11]. Также существует несколько примеров модифицирования тиогидантоинов [12] и 2-алкилтиоимидазолонов [13] в результате реакции Либскайнда-Срогля. Поэтому для синтеза целевого соединения мы выбрали модифицированную методику получения ацетиленов реакцией Соногаширы с десульфированием соответствующего тиогидантоинового производного.

Соединение (IV) было синтезировано с использованием достаточно редкой модификации реакции Соногаширы с использованием производного, содержащего группу SCH₃ [14]. В качестве катализатора были использованы йодид меди (I) и Pd(dppf)Cl₂ · CH₂Cl₂. В начале в результате конденсации 4-гидроксibenзальдегида с 2-тиооксоимидазолин-4-оном было получено соединение (I). Так как алкилирование тиооксоимидазолина могло протекать и с участием гидроксигруппы бензилиденового фрагмента, следующей стадией стала ее защита триизопропилсилильной группой. Полученное в результате соединение (II) метилировали метилйодидом с образованием продукта (III). После этого проводилась реакция Соногаширы, в результате чего было выделено соединение (IV) с ацетиленовым фрагментом в структуре. Для удаления триизопропилсилильной защиты соединение (IV) обрабатывали фторидом тетрабутиламмония. В результате нами было получено новое соединение (V) с хорошим выходом.

Далее были определены оптические свойства нового соединения (V) в ацетонитриле (рис. 1). Было обнаружено, что эмиссия флуоресценции

соединения (V) невелика, что согласуется с полученными ранее данными для других аналогов хромофора белка Kaede [6]. Максимумы абсорбции (457 нм) и эмиссии (примерно 605 нм) соединения (V) сдвинуты в значительно более длинноволновую область по сравнению с классическим хромофором GFP (Z)-5-(4-гидроксibenзилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-оном (максимумы абсорбции и эмиссии 368 и 438 нм соответственно) [8]. Также обращает на себя внимание тот факт, что стоксов сдвиг нового ацетиленового производного составляет почти 150 нм, что делает полученный краситель перспективным в задачах многоцветного мечения биологических образцов.

Таким образом, нами был впервые разработан подход к синтезу ацетиленовых аналогов хромофора белка Kaede на примере соединения (V). Максимумы абсорбции и эмиссии данного соединения лежат в более длинноволновой области, чем у аналогичного хромофора GFP из-за наличия сопряженной ацетиленовой системы. Этот факт, а также низкий уровень флуоресценции данного соединения позволяют предполагать, что новое производное (V) или его аналоги могут оказаться перспективными флуорогенными красителями.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР (δ м.д., J Гц) зарегистрированы на приборе Bruker Avance III (700 МГц, США) в DMSO-*d*₆ (внутренний стандарт – Me₄Si). Спектры поглощения в УФ и видимом диапазоне регистрировали на спектрофотометре Varian Cary 100 Bio (США). Спектры флуоресценции регистрировались на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (США). Температуры плавления определены на приборе SMP 30 (Великобритания) и не исправ-

лены. Масс-спектры высокого разрешения записаны на приборе Bruker micrOTOF II, ионизация электрораспылением.

(Z)-5-(4-Гидроксibenзилиден)-2-тиооксоимидазолин-4-он (I). 4-Гидроксibenзальдегид (793 мг, 6.5 ммоль), 2-тиооксоимидазолин-4-он (580 мг, 5.0 ммоль) и ацетат натрия (1.76 г, 21.5 ммоль) растворяли в 15 мл ледяной уксусной кислоты, полученную смесь кипятили в течение 3 ч и остужали до комнатной температуры. При интенсивном перемешивании добавляли 50 мл воды, выпавший осадок отфильтровывали и промывали водой (20 мл) и диэтиловым эфиром (10 мл), после чего сушили в вакууме. Желтый порошок (935 мг, 85%), т. пл. 280°C с разложением; ¹H-ЯМР: 6.43 (с, 1 H), 6.81 (д, *J*₂ 8.6, 2 H), 7.63 (д, *J*₂ 8.6, 2 H), 10.02 (ушир. с., 1 H), 11.95 (ушир. с., 1 H), 12.22 (ушир. с., 1 H).

(Z)-2-Тиоксо-5-(4-((триизопропилсилил)окси)бензилиден)имидазолидин-4-он (II). (Z)-5-(4-Гидроксibenзилиден)-2-тиооксоимидазолин-4-он (I, 1.10 г, 5.0 ммоль), триизопропилсилилхлорид (1.06 г, 5.5 ммоль), DIPEA (0.78 г, 6.0 ммоль) и имидазол (20 мг) растворяли в ТГФ (50 мл), после чего перемешивали в течение ночи. Полученный раствор упаривали, остаток растворяли в этилацетате (200 мл), промывали насыщенным раствором хлорида натрия (3 × 50 мл), сушили над безводным Na₂SO₄ и упаривали. Продукт очищали флеш-хроматографией (элюент – хлороформ). Желтый порошок (1.48 г, 79%), т. пл. 275°C с разложением; ¹H-ЯМР: 1.08 (д, *J*₂ 7.4, 18 H), 1.25–1.31 (септ., *J*₂ 7.4, 3 H), 6.45 (с, 1 H), 6.89 (д, *J*₂ 8.6, 2 H), 7.68 (д, *J*₂ 8.6, 2 H), 12.03 (ушир. с., 1 H), 12.28 (ушир. с., 1 H); ¹³C-ЯМР: 11.9, 17.5, 111.6, 119.8, 125.4, 126.1, 132.0, 156.5, 165.6, 178.6; HRMS (ESI), *m/z*: найдено *M*, 377.1711; рассчитано для C₁₉H₂₉N₂O₂SSi⁺, [M + H]⁺ 377.1714.

(Z)-3-Метил-2-(метилтио)-5-(4-((триизопропилсилил)окси)бензилиден)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (III). (Z)-2-Тиоксо-5-(4-((триизопропилсилил)окси)бензилиден)имидазолидин-4-он (II, 1.13 г, 3.0 ммоль), йодметан (1.70 г, 12.0 ммоль) и поташ (1.66 г, 12.0 ммоль) смешивали в ацетонитриле (30 мл) и кипятили в течение 8 часов. Реакционную смесь остужали, фильтровали, раствор упаривали на три четверти и добавляли этилацетат (150 мл). Полученный раствор промывали насыщенным раствором хлорида натрия (3 × 30 мл), сушили над безводным Na₂SO₄ и упаривали. Продукт очищали флеш-хроматографией (элюент – хлороформ). Желтый порошок (820 мг, 69%), т. пл. 160–163°C; ¹H-ЯМР: 1.07 (д,

*J*₂ 7.3, 18 H), 1.27 (септ., *J*₂ 7.3, 3 H), 2.72 (с, 3 H), 3.08 (с, 3 H), 6.83 (с, 1 H), 6.94 (д, *J*₂ 8.7, 2 H), 8.16 (д, *J* = 8.8, 2 H); ¹³C-ЯМР: 12.1, 12.5, 17.7, 26.3, 120.0, 122.1, 126.5, 133.8, 136.7, 157.1, 161.7, 170.9; HRMS (ESI), *m/z*: найдено *M*, 405.2022; рассчитано для C₂₁H₃₃N₂O₂SSi⁺, [M + H]⁺ 405.2027.

(Z)-2-((4-(Диэтиламино)фенил)этинил)-3-метил-5-(4-((триизопропилсилил)окси)бензилиден)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (IV). В колбу Шленка насыпали (Z)-3-метил-2-(метилтио)-5-(4-((триизопропилсилил)окси)бензилиден)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (III, 406 мг, 1 ммоль), йодид меди(I) (190 мг, 1 ммоль) и комплекс (1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцена хлорида палладия(II) с дихлорметаном (41 мг, 0.05 ммоль). Колбу вакуумировали, заполнили аргоном, в токе аргона добавляли DIPEA (2.58 г, 20 ммоль) и N,N-диэтил-4-этиниланилин (340 мг, 2 ммоль). Реакционную смесь выдерживали при температуре 100°C в течение 12 ч, затем добавляли этилацетат (100 мл) и промывали насыщенным раствором хлорида натрия (3 × 30 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na₂SO₄ и упаривали. Продукт очищали флеш-хроматографией (элюент – смесь этилацетата и гексана, 1 : 5). Темный порошок (227 мг, 43%), т. пл. 166–168°C. Продукт частично (до 20%) загрязнен соединением (V), использован в следующей стадии без проведения полной очистки. ¹H-ЯМР: 1.08 (д, *J*₂ 7.4, 18 H), 1.13 (септ., *J*₂ 7.1, 6 H), 1.30 (т, *J*₂ 7.6, 1 H), 3.22 (с, 3 H), 3.42 (кв., *J*₂ 7.1, 4 H), 6.75 (д, *J*₂ 9.0, 2 H), 6.97 (д, *J*₂ 8.8, 2 H), 7.02 (с, 1 H), 7.52 (д, *J*₂ 9.0, 2 H), 8.16 (д, *J*₂ 8.6, 2 H); HRMS (ESI), *m/z*: найдено *M*, 530.3198; рассчитано для C₃₂H₄₄N₃O₂Si⁺, [M + H]⁺ 530.3197.

(Z)-2-((4-(Диэтиламино)фенил)этинил)-5-(4-гидроксibenзилиден)-3-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (V). (Z)-2-((4-(Диэтиламино)фенил)этинил)-3-метил-5-(4-((триизопропилсилил)окси)бензилиден)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (IV, 159 мг, 0.3 ммоль) растворяли в ТГФ (4 мл), добавляли фторид тетрабутиламмония тригидрата (474 мг, 1.5 ммоль), после чего полученный раствор перемешивали 1 ч. Добавляли этилацетат (100 мл) и промывали насыщенным раствором хлорида натрия (10 × 15 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na₂SO₄ и упаривали. Продукт очищали флеш-хроматографией (элюент – смесь хлороформа и этанола, 50 : 1). Темно-красный порошок (64 мг, 57%), т. пл. 188–190°C; ¹H-ЯМР: 1.12 (т, *J*₂ 7.0, 6 H, NCH₂CH₃), 3.21 (с, 3 H, NCH₃), 3.41 (кв., *J*₂ 6.9, 4 H, NCH₂CH₃), 6.73 (д, *J*₂ 9.0, 2 H, H5', H7'), 6.87 (д, *J*₂ 8.8, 2 H, H3'', H5''), 6.99 (с, 1 H, H7''), 7.51 (д, *J*₂ 8.8, 2 H, H4',

H8'), 8.10 (д, J_2 8.6, 2 H, H2'', H6''), 10.24 (ушир. с., 1 H, OH); ^{13}C -ЯМР: 12.3 (NCH₂CH₃), 27.0 (NCH₃), 43.8 (NCH₂CH₃), 78.4 (C1'), 102.6 (C2'), 103.6 (C3'), 111.3 (C5', C7'), 115.9 (C3'', C5''), 125.4 (C7''), 127.4

(C1''), 134.2 (C2'', C6''), 134.6 (C4', C8'), 136.4 (C2), 146.2 (C5), 149.1 (C6'), 160.1 (C4''), 168.5 (C4); HRMS (ESI), m/z : найдено M , 374.1864; рассчитано для C₂₃H₂₄N₃O₂⁺, [M + H]⁺ 374.1863.

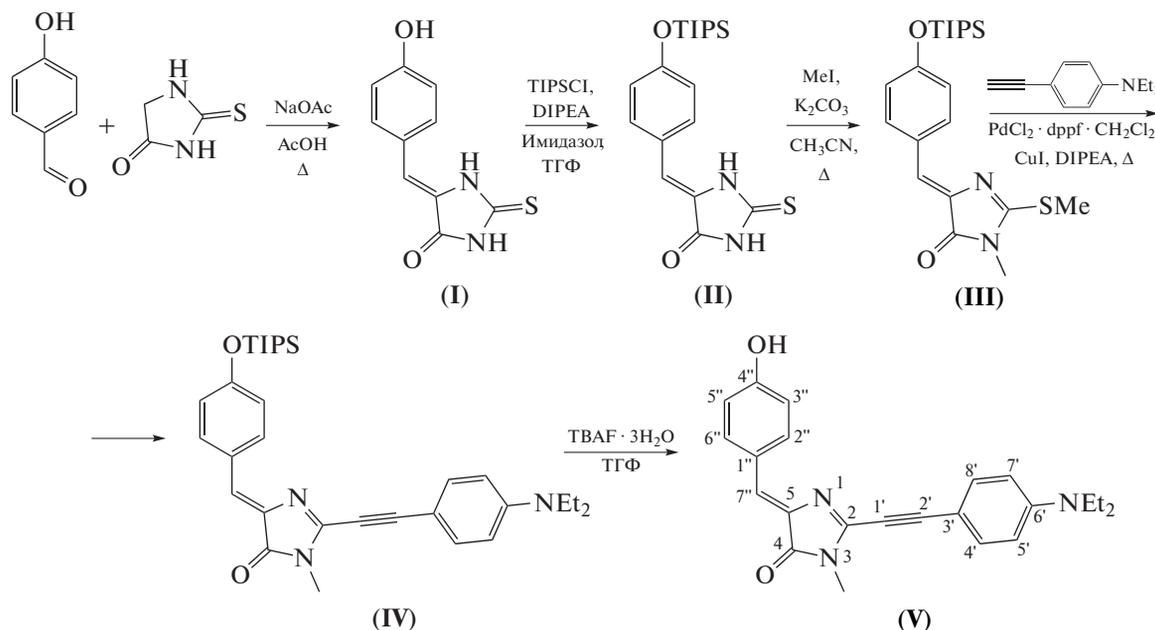


Схема 1. Схема синтеза соединения (V).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научно-го проекта № 16-14-10364.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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.
- Ge S., Deng H., Su Y., Zhu X. // *RSC Adv.* 2017. V. 7. P. 17980–17987.
- Povarova N.V., Bozhanova N.G., Sarkisyan K.S., Gritcenko R., Baranov M.S., Yampolsky I.V., Lukyanov K.A., Mishin A.S. // *J. Mater. Chem. C.* 2016. V. 4. P. 3036–3040.
- 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.
- Yampolsky I.V., Kislukhin A.A., Amatov T.T., Shcherbo D., Potapov V.K., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2008. V. 36. P. 96–104.
- Baleeva N.S., Myannik K.A., Yampolsky I.V., Baranov M.S. // *Eur. J. Org. Chem.* V. 2015. P. 5716–5721.
- Ermakova Y.G., Sen T., Bogdanova Y.A., Smirnov A.Y., Baleeva N.S., Krylov A.I., Baranov M.S. // *J. Phys. Chem. Lett.* 2018. V. 9. P. 1958–1963.
- 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.
- Jung K.H., Fares M., Grainger L.S., Wolstenholme C.H., Hou A., Liu Y., Zhang X.A. // *Org. Biomol. Chem.* 2019. V. 17. P. 1906–1915.
- Mehia V.P., Sharma A., Van der Eycken E. // *Org. Lett.* 2008. V. 10. P. 1147–1150.
- Iwasaki M., Topolovčan N., Hu H., Nishimura Y., Gagnot G., Nanakorn R., Yuvacharaskul R., Nakajima K., Nishihara Y. // *Org. Lett.* 2016. V. 18. P. 1642–1645.
- Gosling, S., Rollin, P., Tatibouët, A. // *Synthesis.* 2011. P. 3649–3660.
- Oumouch S., Bourotte M., Schmitt M., Bourguignon J.-J. // *Synthesis.* 2005. P. 25–27.
- Shook B.C., Chakravarty D., Jackson P.F. // *Tetrahedron Lett.* 2009. V. 50. P. 1013–1015.

Synthesis and Optical Properties of the New Acetylene Kaede Chromophore Analogue

E. R. Zaitseva^{*, **}, A. Yu. Smirnov^{*}, A. S. Mishin^{*, #}, and M. S. Baranov^{*, ***}

[#]Phone: +7 (495) 995-55-57 (2074); e-mail: mishin@ibch.ru

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

^{**}*Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Miusskaya pl. 9, Moscow, 125047 Russia*

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

A novel derivative of acetylene Kaede protein chromophore (Z)-2-((4-(diethylamino)phenyl)ethynyl)-5-(4-hydroxybenzylidene)-3-methyl-3,5-dihydro-4H-imidazol-4-one was synthesised by modified Sonogashira reaction. In comparison with classical GFP chromophore analogue, obtained compound exhibits prominent shift of absorption and emission maxima to the long-wavelength region. The value of Stock's shift of the newly synthesized compound reached almost 150 nm.

Keywords: imidazolones, chromophores, fluorescent dyes, GFP, Kaede, Sonogashira reaction, optical properties