

# СОДЕРЖАНИЕ

## Том 48, номер 3, 2022

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

Carbohydrate Structure Database и другие углеводные базы данных как важнейший элемент гликоинформатики (обзорная статья)

*Ф. В. Тоукач, А. И. Ширковская* 255

Антибиотики группы ауреоловой кислоты: перспективы биологически активного класса соединений (обзорная статья)

*А. К. Исагулиева, А. Н. Тевяшова, А. А. Штиль* 266

Методы получения моноклональных антител для терапии и профилактики вирусных инфекций (обзорная статья)

*Ю. А. Меркульева, Д. Н. Щербаков, А. А. Ильичев* 279

Синтез дисахарида Ху1 $\beta$ 1-2Ман $\beta$  – корового фрагмента растительных N-гликопротеинов

*С. В. Цыганкова, Г. В. Пазынина, А. С. Парамонов, А. О. Чижов, Н. В. Бовин* 296

Характеристика структуры и генов биосинтеза O-антигенов *Azospirillum zeae* N7(T), *Azospirillum melinis* TMCY 0552(T) и *Azospirillum palustre* B2(T)

*Е. Н. Сигида, В. С. Гринёв, Э. Л. Здоровенко, А. С. Дмитренко, Г. Л. Бурыгин, Н. К. Кондюрина, С. А. Коннова, Ю. П. Федоненко* 302

Экспрессия генов целлюлозосинтаз при гравистимуляции растений льна (*Linum usitatissimum*) и тополя (*Populus alba*  $\times$  *tremula*)

*Н. Е. Мокшина, П. В. Микшина, Т. А. Горшкова* 313

Фармакологические свойства галогенидов 2-аминобензимидазолия и производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола

*А. А. Спасов, О. Н. Жуковская, Н. А. Гурова, Л. В. Науменко, Н. В. Елисеева, А. Ф. Кучерявенко, В. А. Косолапов, Д. С. Яковлев, В. Ю. Муравьева, В. А. Бабкова, Д. А. Бабков, Ю. В. Лифанова, А. С. Морковник* 328

Ацильномодифицированные водорастворимые производные хитозана – носители для адсорбционной иммобилизации папаина

*А. В. Сорокин, С. С. Ольшанникова, Н. В. Малыхина, Ф. А. Сакибаев, М. Г. Холявка, М. С. Лавлинская, В. Г. Артюхов* 340

Синтез тетрагемисукцинатов brassinosterоидов и их влияние на начальный рост растений ярового ячменя

*Р. П. Литвиновская, Н. Е. Манжелесова, О. П. Савочка, В. А. Хрипач* 352

Синтез и исследование антидепрессивных свойств новых аналогов аргинин-вазопрессина

*К. В. Бородина, О. Н. Саванец, Е. С. Пустюльга, В. П. Мартинович, Е. В. Кравченко, Л. М. Ольгомец, В. П. Голубович* 357

Электроподвижный белок престин как чувствительное ядро флуоресцентного индикатора мембранного потенциала

*Л. А. Кост, В. А. Юнусова, В. О. Иванова, Е. С. Никитин, К. А. Лукьянов, А. М. Богданов*

371

---

### **ПИСЬМА РЕДАКТОРУ**

Влияние положения сопряженного заместителя на оптические свойства производных хромофора белка Kaede

*И. Н. Мяснянко, Н. С. Балеева, М. С. Баранов*

375

---

---



УДК [547+577]:004.65

**CARBOHYDRATE STRUCTURE DATABASE И ДРУГИЕ УГЛЕВОДНЫЕ БАЗЫ ДАННЫХ КАК ВАЖНЕЙШИЙ ЭЛЕМЕНТ ГЛИКОИНФОРМАТИКИ**

© 2022 г. Ф. В. Тоукач\*., А. И. Ширковская\*

\*Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Россия, 119334 Москва, Ленинский просп., 47

Поступила в редакцию 08.11.2021 г.

После доработки 22.11.2021 г.

Принята к публикации 12.12.2021 г.

Углеводы – один из наиболее химически разнообразных классов биомакромолекул. Объем накопленной информации о них многократно превышает уровень, позволяющий ориентироваться в этом океане данных без специальных средств – баз данных (БД) гликомики и прогностических сервисов, использующих данные из этих баз. Существующие БД не полностью совместимы друг с другом как по покрытию, так и по форматам данных и возможностям, предоставляемым пользователям, и направлены на решение отдельных задач. Главные проблемы нынешних БД – наличие ошибок, пробелы в полноте покрытия и отсутствие общепризнанного углеводного языка. Наиболее востребованы углеводные БД с широким покрытием для обеспечения единого информационного пространства данных по структуре, свойствам и функциям углеводов, связанных с таксономией и свойствами их природных источников. В рамках проекта Carbohydrate Structure Database (CSDB) была создана архитектура БД, направленная на создание расширяемого проекта гликоинформатики с непрерывной поддержкой и регулярным обновлением данных. Она была реализована в программном продукте, лишенном основных недостатков других БД гликомики. За 15 лет своего существования CSDB стала основным источником данных по углеводам микроорганизмов и платформой для множества сервисов углеводной тематики. Проект нацелен на создание современной и всеобъемлющей базы природных углеводов со свободным доступом, ежегодным обновлением и дополнением содержимого, поиском и устранением ошибок (в том числе в публикациях), появлением новых сервисов.

*Ключевые слова:* CSDB, углеводы, базы данных, гликоинформатика

**DOI:** 10.31857/S0132342322030198

СОДЕРЖАНИЕ	
ВВЕДЕНИЕ .....	255
СУЩЕСТВУЮЩИЕ БАЗЫ ДАННЫХ ГЛИКОМИКИ.....	256
КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ УГЛЕВОДНЫХ БАЗ ДАННЫХ.....	256
УГЛЕВОДНЫЕ НОТАЦИИ.....	258
ИНТЕРФЕЙС И ИНТЕГРАЦИЯ БАЗ ДАННЫХ.....	259
CARBOHYDRATE STRUCTURE DATABASE.....	259

ТЕХНИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ CSDB.....	262
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	262
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	263

**ВВЕДЕНИЕ**

Углеводы – один из наиболее химически разнообразных классов биомакромолекул. С открытием гликозилирования белков и выяснением роли углеводных антигенов в межклеточных взаимодействиях интерес к ним непрерывно возрастает. К настоящему времени объем накопленной информации об углеводах многократно превысил уровень, позволяющий ориентироваться в этом океане данных без специальных средств. Поэтому прогресс гликобиологии во многом зависит от наличия единого информационного пространства данных по структуре, свойствам и функциям углеводов, связанных с таксономией и свойствами их природных источников. Основное средство создания такого пространства – базы данных (БД) гликомики и прогностические сер-

Сокращения: БД – база данных; CSDB – База данных структур углеводов (Carbohydrate Structure Database); IUPAC – Международный союз теоретической и прикладной химии (International Union of Pure and Applied Chemistry); NCBI – Национальный центр биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information); PDB – База данных белков (Protein Data Bank); SNFG – Символьная номенклатура гликанов (Symbol Nomenclature for Glycans).

# Автор для связи: (тел.: +7 (916) 172-47-10; эл. почта: netbox@toukach.ru).

висы, использующие данные из этих баз. В отличие от геномики и протеомики, стандарты идентификации структур и протоколы обмена информацией в гликомике были унифицированы лишь в последние годы; этот процесс еще полностью не завершен. Появившиеся проекты новой области биоинформатики – гликоинформатики – не полностью совместимы друг с другом как по покрытию, так и по форматам данных и возможностям, предоставляемым химикам, биологам, генетикам, фармацевтам. Каждый из таких проектов направлен на решение своего класса задач, тем не менее прослеживается явная тенденция к взаимной интеграции. Более детальный разбор проблем гликоинформатики и их возможных решений опубликован в виде мини-обзора [1].

### СУЩЕСТВУЮЩИЕ БАЗЫ ДАННЫХ ГЛИКОМИКИ

Базы данных гликомики можно разделить на структурные, протеомные, базы функций и вспомогательные. На рис. 1 представлены наиболее значимые базы данных, ориентированные на углеводные структуры.

Наиболее востребованы углеводные БД с широким покрытием: GLYCOSCIENCES [2–4] (импорт CCSD/ CarbBank [5, 6] + углеводы млекопитающих + данные ЯМР), UniCarbKB [7, 8] (O- и N-гликаны млекопитающих, включая данные GlycoSuite [9, 10] и GlycoBase/GlycoStore (NIBRT) [11, 12], KEGG Glycan [13] (в основном импорт CCSD/CarbBank), Carbohydrate Structure Database [14–17] (CSDB; углеводы прокариот, растений и грибов + данные ЯМР). Также следует отметить специализированные базы: портал GlyGen [18, 19] (структурно-протеомная база гликанов, унаследованная, как и UniCarbKB, данные GlycoSuite и архитектуру дизайн-проекта EuroCarbDB [7, 20]), ECODAB [21] (O-антигены *Escherichia coli*), Monosaccharide DB [22, 23] (моносахариды), мета-репозиторий структур GlyTouCan [24, 25], созданный как источник универсальных идентификаторов углеводов, GlycoBase-Lille (углеводы амфибий и других животных + данные ЯМР). Исторически первой универсальной углеводной БД была CCSD/CarbBank [6], претендовавшая на полноту покрытия по всем структурам, опубликованным до 1996 г., в котором прекратилась ее поддержка. Поскольку сбор и оцифровка первичных данных из публикаций – наиболее трудоемкая часть работы по созданию БД, почти все современные проекты в том или ином виде используют данные CarbBank, а также элементы идеологии этой базы.

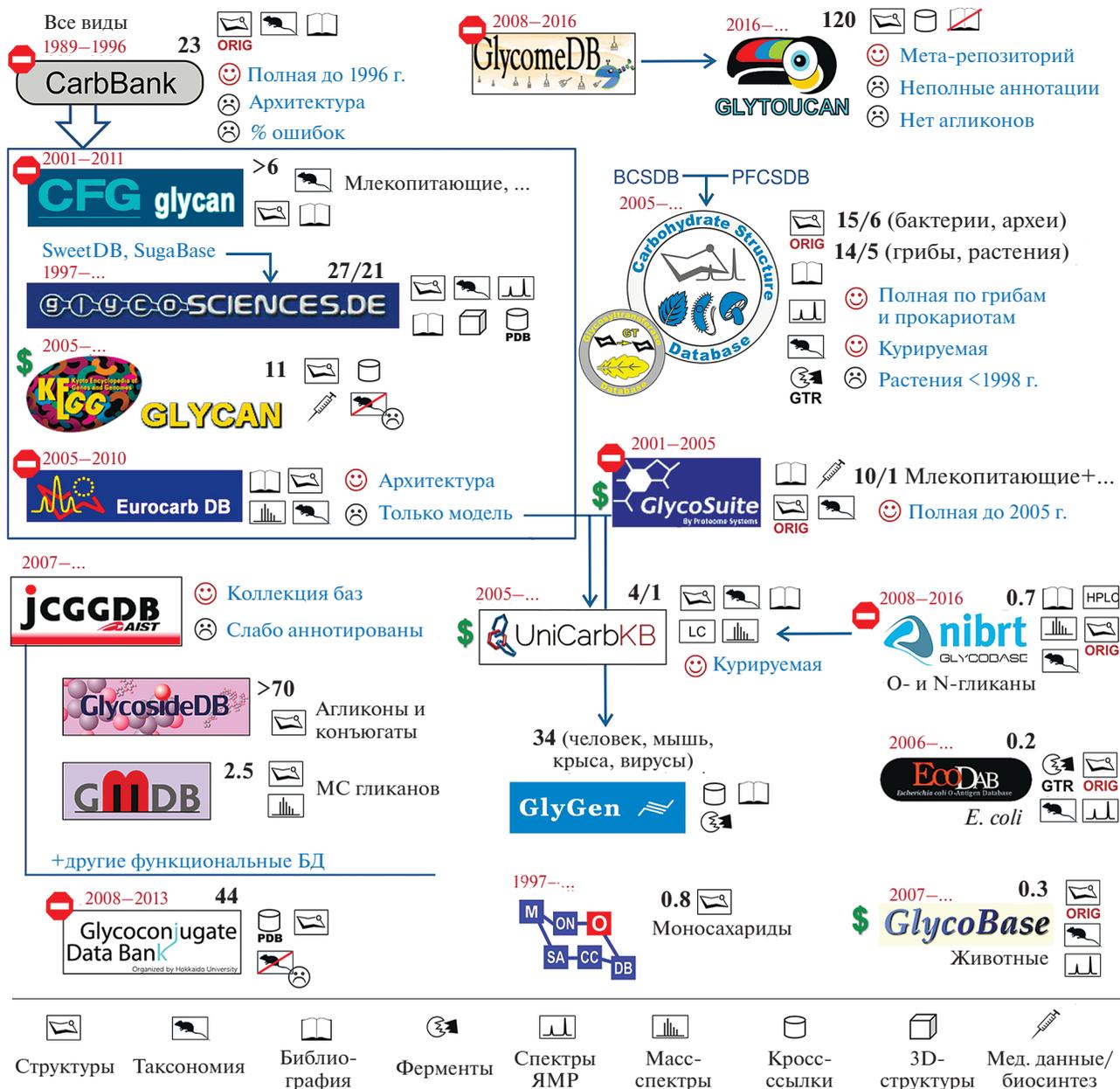
### КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ УГЛЕВОДНЫХ БАЗ ДАННЫХ

Отличительные особенности, как и критерии оценки углеводных баз данных: представленные типы информации, полнота покрытия, качество данных, функциональность (а также стабильность и производительность), интерфейс пользователя, возможность интеграции с другими проектами и, косвенно, внутренняя архитектура БД.

Типы информации, хранение и обработка которых необходимы для углеводной базы, – это как минимум первичная структура молекул, их таксономические и библиографические аннотации. Часто БД также включают экспериментальные данные, например, ЯМР- или масс-спектры. Возможность записи биохимической, генетической, медицинской и другой информации, как правило, присутствует, но покрытие по этим полям оставляет желать лучшего. Таксономические и библиографические аннотации также есть не во всех базах или не для всех записей. В тех базах, где есть спектры ЯМР, ЯМР-покрытие составляет 5–35% структур. На рис. 1 основные типы представленной информации обозначены иконками. Для первичных баз, получающих данные с помощью собственных усилий по аннотированию, иконки снабжены меткой ORIG; вторичные базы импортируют структуры из других проектов, надстраивая их производными данными.

Полнота покрытия существенно увеличивает полезность БД, т.к. в таком случае даже отрицательный ответ на поисковый запрос представляет собой значимую научную информацию. Полнота покрытия лимитируется невозможностью автоматизации процесса поиска статей с первичными данными. В настоящее время на полное (>80%) покрытие в рамках выбранного класса соединений претендуют только бактериальная и грибная части CSDB. Покрытие остается актуальным при своевременном обновлении базы; приемлемым можно считать период между публикацией и попаданием в базу ~1–2 года. Универсальное решение для повышения актуальности данных – это требование редакций журналов обязательно размещать описываемые структуры в базах данных перед публикацией, с предоставлением ID записи. Такой подход давно реализован в геномике, но отсутствует в гликомике из-за недостаточной стандартизации языков описания структур, корни которой лежат в высокой химической вариативности углеводов.

Процесс заполнения баз данными не поддается полной автоматизации не только на уровне отбора источников данных, но и на уровне интерпретации текстов публикаций. Как следствие, все химические и биологические БД содержат ошибки (перечислены в порядке распространения): привнесенные операторами, перекочевавшие из



**Рис. 1.** Обзор существующих структурно-центрических углеводных баз данных. Пиктограммы отражают основные типы накопленных данных в соответствии с обозначениями в нижней части рисунка. Стрелки показывают направления заимствования данных. Приблизительное покрытие по структурам/публикациям (в тысячах записей) указано черными числами. Основные преимущества и недостатки приведены синим шрифтом. Проекты с платным доступом обозначены зеленым символом \$. Закончившиеся проекты, тем не менее оказавшие влияние на существующие, обозначены красным восьмиугольником с белой чертой. Рисунок заимствован с адаптивированием из работы Egorova, Toukach (2018) [1].

других БД, присутствующие в публикациях изначально, возникшие из-за несовершенства архитектуры БД и программных ошибок в импортерах и автоаннотаторах. По результатам нашего направленного исследования, большинство записей в CarbBank содержит ошибки [26], причем более трети записей – две и более ошибок, наиболее частая из которых – неверная таксономическая привязка структуры. Также обнаружены значи-

тельные пробелы в полноте покрытия. Поскольку большинство современных проектов использует данные CarbBank, эти ошибки проявляются и в них. Некоторые типы ошибок можно выявить (и иногда – исправить) автоматически, и такой контроль ведется в нескольких проектах, однако для достижения действительно высокого качества данных необходим ретроспективный экспертный

анализ публикаций и курирование экспертами-гликобиологами.

Функциональность БД – это ее способность обрабатывать поисковые запросы разных типов, комбинировать их в разных логических сочетаниях, уточнять их с использованием данных других типов. Например, “найти все опубликованные за период 2001–2005 гг. структуры, содержащие такой-то фрагмент, а также связанный с моносахаридом лизин либо аланин, кроме синтетических и тех, которые найдены в гамма-протеобактериях, после чего вывести их ЯМР-спектры”. Также к функциональности относятся сопутствующие сервисы углеводной тематики (генерирование конформационных карт, предсказание спектров, поиск структурных закономерностей, статистическая обработка и кластеризация данных из базы и т.д.).

На рис. 2 представлены основные пользовательские запросы, позволяющие переходить от одних типов данных об углеводах к другим. Для многих данных существуют общепризнанные стандартные индексы. Для первичной структуры биогликанов роль такого индекса может выполнять GlyTouCan ID. В отличие от простых в реализации схем поиска по библиографии, ключевым словам, фрагментам текстов, таксономии и проч., поиск структур, содержащих указанный фрагмент, а также поиск структур или спектров, “похожих” на указанные, – задача, требующая предварительных исследований, изощренного программирования и значительных вычислительных ресурсов. В этой связи становится значимой внутренняя архитектура БД, правильность проектирования которой критична для достижения разумной скорости обработки структурных запросов. На этапе становления гликоинформатики в 2010-х гг. исследовательский коллектив GLYCOSCIENCES сформулировал “Десять заповедей построения углеводной базы данных”, объединивших опыт немецкой и российской групп и реализовавшихся в углеводной нотации GlycoCT [27] и дизайн-проекте GlycomeDB [28] (предшественник GlyTouCan). Ключевые положения этого документа включают использование таблицы связности для внутреннего представления структур, максимально возможную индексацию, минимальное количество свободнотекстовых данных (которыми, к сожалению, “грешат” почти все проекты) и однозначный контролируемый словарь для множества типов данных, в первую очередь – для названий остатков. Попытка вывести словарь мономеров из зоны ответственности конкретных проектов была сделана в рамках базы MonosaccharideDB [22]. Дальнейшее совершенствование этих правил Консорциумом по гликоинформатике (<https://glic.glycoinfo.org>) и консультативной группой по гликоинформатике при NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/glycans/glyag.html>)

включало стандартизацию представления углеводов в статьях и компьютерных ресурсах (SNFG [29, 30]) и курс на использование семантической паутины (semantic web, модель Resource Description Framework [31]) для получения неявно заданных знаний, не зависящих от конкретных баз [32–34]. Адаптация этой модели к химии и биологии углеводов выразилась в появлении онтологий GlycoRDF (общая) [35] и GlycoCoO (гликоконъюгаты) [36].

## УГЛЕВОДНЫЕ НОТАЦИИ

Возможность правильной обработки структурной информации напрямую связана со способом записи углеводных структур [37]. Несовершенство и несовместимость форматов этих записей долгое время были камнем преткновения для развития гликоинформатики. Языки записи структур, используемые для внутреннего представления данных и/или для пользовательского интерфейса, оцениваются по следующим критериям:

1) однозначность (строгие правила для записи каждой химически различной структуры единственным образом);

2) способность обрабатывать максимально возможное число реально существующих структур (полимерные, олигомерные и комбинированные углеводы, гликолипиды, гликопротеины), в том числе с неуглеводными компонентами и с поддержкой всевозможных “особых случаев” (нестандартные остатки, связи через фосфор и серу, циклические эфиры, амидные и сложноэфирные связи и т.д.);

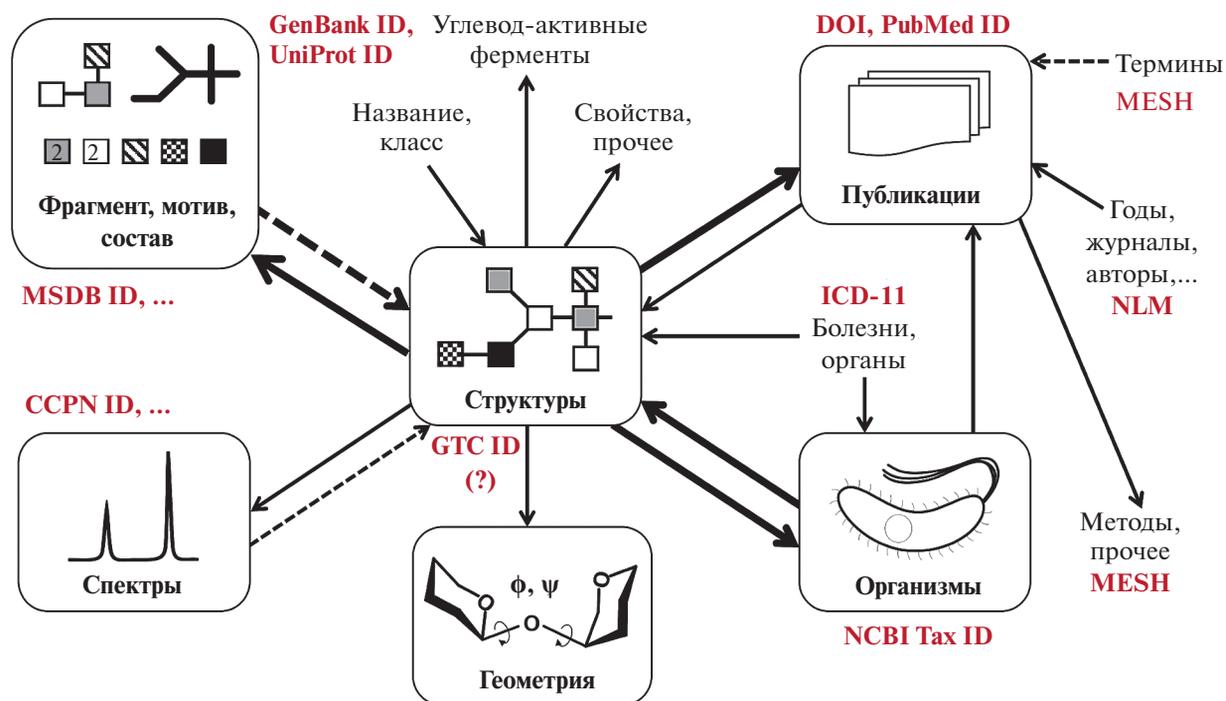
3) способность работать с неполными (частично определенными) структурами как на уровне остатков, их конфигураций и позиций замещения, так и на уровне топологий и стехиометрии боковых цепей;

4) “машиночитаемость” (без необходимости сложного синтаксического анализа (parsing), как, например, в случае с языком Extended IUPAC) и “человекочитаемость” (необходима для контроля ошибок, неизбежно возникающих при “человеческой” работе с данными), включая понятные гликобиологам названия остатков;

5) совместимость с существующими форматами и атомарными моделями (наличие конвертеров, облегчающих освоение языка и переход между БД);

6) независимость от ресурсов, курируемых вручную, таких как словари мономеров, лигандов и т.д.

В настоящее время указанными характеристиками в наибольшей степени обладают языки CSDB Linear [37], GlycoCT [27] и WURCS [38, 39]. Однако первый не поддерживает некоторые то-



**Рис. 2.** Взаимосвязь между типами информации об углеводах, представленными в Carbohydrate Structure Database (CSDB). Однозначные переходы, применяемые при обработке запросов, показаны сплошными стрелками; переходы, в которых возможно применение нечеткой логики (выявление паттернов по аналогии или частичному соответствию и т.д.) – пунктирными стрелками. Толстые стрелки соответствуют наиболее распространенным запросам пользователей. Любые запросы могут комбинироваться с помощью булевских операций “И”, “ИЛИ”, “НЕ”.

пологии, а два других “нечеловекочитаемы”. В отличие от ситуации в геномике и протеомике, общепризнанного углеводного языка до сих пор не существует, кроме несовершенного для данного применения IUPAC. Один из упомянутых языков может стать таким стандартом в будущем.

## ИНТЕРФЕЙС И ИНТЕГРАЦИЯ БАЗ ДАННЫХ

Сложившиеся представления о качественном продукте гликоинформатики подразумевают, что интерфейс пользователя (как и интерфейс администраторов) должен быть интуитивно понятным, хорошо документированным и находиться в бесплатном доступе для научной общественности через интернет. Понятность касается в том числе форматов ввода и вывода структур, которым пользователю не придется специально учиться. В этом аспекте чрезвычайно плодотворна реализация ввода фрагментов структур с помощью самостоятельных сервисов, в том числе специальных редакторов, имеющих программный интерфейс, позволяющий любой БД пользоваться интерфейсом других БД. Краткий обзор современных углеводных редакторов опубликован в статье, посвященной редактору CSDB/SNFGeditor [40].

Интеграция между проектами гликоинформатики подразумевает не только общий интерфейс

поисковых запросов, но и возможность автоматического обмена данными. Это касается и взаимодействия с неуглеводными базами данных: библиографическими (например, NCBI PubMed) [41], таксономическими (NCBI Taxonomy) [42], генетическими (NCBI GenBank) [43], протеомными (UniProt) [44] и др. Первыми проектами, разработавшими протоколы автоматического обмена данными об углеводах [45], были GLYCO-SCIENCES и Vacterial CSDB, после чего стандартизация форматов и разработка программных сервисов гликомики значительно ускорились.

Особняком стоит EuroCarbDB [20], которая была профинансирована как БД, полностью лишенная недостатков и обеспечивающая широчайшую функциональность при разумной цене обслуживания, но на деле ограничилась разработкой подходов (без их реального воплощения, которое выступает “узким местом” БД из-за человеческого фактора) и импортом CCSD/CarbBank. На противоположном конце идеологической иерархии находится мета-репозиторий GlyTouCan, который заведомо не предоставляет собственных данных, но интегрируется со множеством других проектов, импортируя их данные и выступая по сути “базой баз”, обеспечивающей межпроектную работу в едином интерфейсе.

Более глубокий анализ состояния гликоинформатики и современных инициатив в ней, углеводных баз и сопутствующих проектов можно найти в обзорах и сборниках [46–51].

## CARBOHYDRATE STRUCTURE DATABASE

В рамках проекта Carbohydrate Structure Database (CSDB) мы поставили цель спроектировать архитектуру БД и реализовать ее в программном продукте, который был бы лишен основных недостатков других БД гликомики, а также обеспечить постоянную поддержку, не требующую серьезных финансовых вложений, и регулярное обновление данных. Ключевые особенности CSDB – полнота покрытия и полностью верифицируемое содержимое. За 15 лет своего существования CSDB стала основным источником данных по углеводам микроорганизмов и платформой для множества сервисов углеводной тематики. Проект нацелен на создание современной и всеобъемлющей базы природных углеводов, которая идеологически заменит собой Carbbank.

Коллектив CSDB проводит систематическую работу по информатизации гликомики [1, 52]. Во взаимодействии с мировым сообществом гликоинформатиков сформированы критерии качества программ и сервисов в этой области, созданы стандарты и онтологии компьютерного представления и визуализации углеводных данных, разработана платформа CSDB, включающая тематические базы данных и расчетные модули, позволяющие делать выводы на основании обработки всех данных, в том числе проводить скрининг и получать статистические данные. На рис. 3 представлены основные возможности и скриншоты отдельных инструментов базы. Все возможности проекта бесплатно доступны гликохимикам и гликобиологам через интернет (<http://csdb.glycoscience.ru>). Основные вехи его развития с разбивкой по годам приведены на сайте проекта в разделе “История изменений” (<http://csdb.glycoscience.ru/help/about.html#changelog>). В частности, нововведения 2020–2021 гг. – интеграция с Международным классификатором болезней (ICD-11) и базой KEGG, модуль 3D-моделирования, SNFG-совместимый графический редактор структур, модуль работы с конформациями дисахаридов, сервисная база данных по агликонам и гликоэпитопам.

Ниже перечислены важнейшие компоненты CSDB.

1) База данных природных углеводов бактерий, архей, грибов, растений и простейших [15, 16, 53]. По прокариотам и грибам база обеспечивает покрытие, близкое к полному (т.е. включает ~90% всех опубликованных данных, что делает даже отрицательный ответ на поисковый запрос

значимой научной информацией). База содержит данные о первичной структуре гликанов и гликоконъюгатов, их таксономическую привязку вплоть до штаммов и серогрупп, подробные библиографические аннотации, спектры ЯМР и отчасти – биохимические, генетические, медицинские и другие аннотации, а также ссылки на другие базы (NCBI PubMed [41], NCBI Taxonomy [42], ICD-11 [54], MeSH [55], PubChem [56], GlyTouCan [24, 25], Thomson Reuters DCI [57]). Данные попадают в базу на основании отбора в библиографических базах и последующего аннотирования статей. Временной промежуток между публикацией и размещением в базе составляет ~1 год.

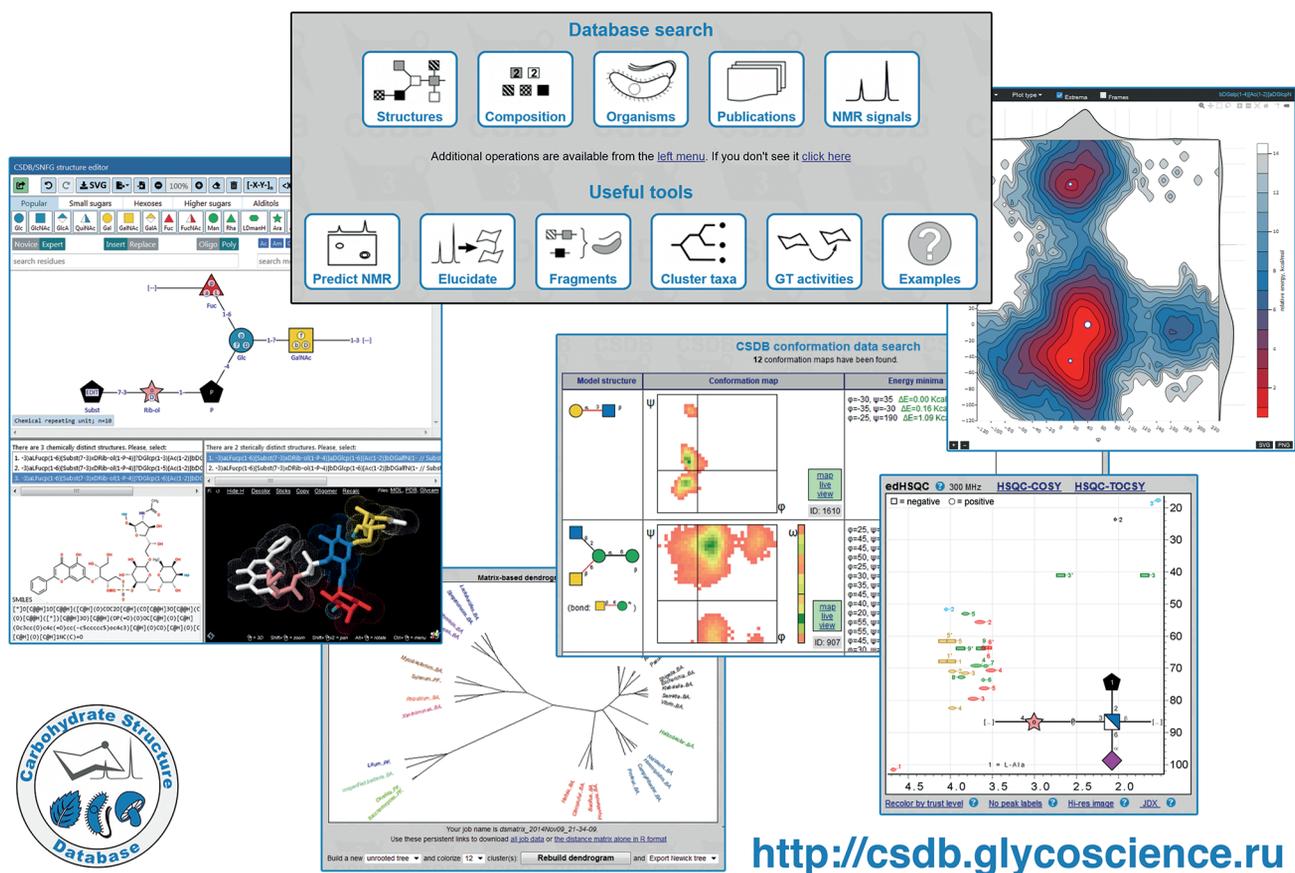
2) База данных конформаций гликозидных мостиков в олигосахаридах и родственных структурных фрагментах, заполненная данными низкотемпературной молекулярной динамики с явным учетом растворителя [58], и данными, импортированными из базы GlycoMapsDB [59]. Интерфейс базы позволяет изучать, визуализировать и экспортировать карты энергий и заселенностей с размерностью до 4.

3) База данных гликозилтрансфераз с экспериментально подтвержденной активностью и с привязкой к полным структурам и штаммам. Этот модуль предоставляет близкое к полному покрытие до 2020 г. по трем наиболее изученным представителям каждого царства: бактерии *E. coli*, дрожжам *Saccharomyces cerevisiae* и растению *Arabidopsis thaliana* [60–62].

4) База данных структурных компонентов природных углеводов (моносахаридов, полиолов, аминокислот, жирных кислот, распространенных агликонов и других молекулярных строительных блоков) с подробными структурно-химическими аннотациями вплоть до 3D-моделей.

5) Многочисленные инструменты поиска, фильтрации [63, 64], сопоставления, статистической обработки [65] и кластеризации структурных, таксономических, биосинтетических, конформационных, библиографических, ЯМР-спектроскопических и прочих данных по нескольким десяткам критериев.

6) Визуальный онлайн-редактор углеводных структур [40], позволяющий собирать сложные биомолекулы с помощью интуитивных операций в браузере. Редактор способен экспортировать результат во все современные форматы гликоинформатики, в атомарные форматы (MOL, PDB), структурные формулы, трехмерные модели, имеет собственные генератор возможных изомеров для структур с неопределенностями, генератор и визуализатор геометрии [66], оптимизированные для молекулярной механики сложных углеводов и опирающиеся на предварительно заполненную



**Рис. 3.** Основные возможности и скриншоты отдельных инструментов Carbohydrate Structure Database (CSDB). Посередине сверху – главная страница веб-портала CSDB со ссылками на основные инструменты: верхний ряд – поиск по фрагменту структуры, составу, организму, публикации, спектрам ЯМР; нижний ряд – сервис предсказания спектров ЯМР, предсказание структуры по экспериментальным данным, анализ распределения структурных фрагментов, кластеризация таксонов по их гликомам, активность гликозилтрансфераз, примеры использования. В нижнем ряду слева направо скриншоты: редактор структур CSDB/SNFG editor, кластеризация таксонов, таблица с конформационными данными дисахаридов, предсказанный двумерный спектр ЯМР HSQC, интерактивная конформационная карта.

сервисную базу конформаций мономерных остатков.

7) Модуль предсказания одно- и двумерных спектров ЯМР произвольных углеводов [67], предсказания структуры по спектрам [68] и данным других экспериментов. Предсказание спектров базируется на собственной теории [69] и использовании базы данных, обеспечивает среднюю точность для структурных компонентов биогликанов на уровне 0.07 м.д. ( $^1\text{H}$ ) и 0.6 м.д. ( $^{13}\text{C}$ ). Для сложных углеводов и гликоконъюгатов достигнутая точность существенно превосходит показатели аналогов, в том числе нейросетевых и квантовомеханических расчетов на высоких уровнях теории [70], при этом на 3–4 порядка превосходя их по скорости. Такая производительность позволяет использовать разработанный инструмент для потоковой генерации спектров и их автоматического сравнения с экспериментальными спектрами.

8) Интеграция с другими проектами [34] глик-, хемо- и биоинформатики на уровне программного интерфейса, кросс-ссылок, универсальных идентификаторов, RDF-онтологии [35], договоренностей о стандартах и форматах данных. Используемая собственная углеводная нотация (язык CSDB Linear [37]) поддерживает подавляющее большинство структурных особенностей биогликанов, в том числе однозначно описывает их неуглеводные компоненты. Она имеет трансляторы на другие углеводные языки (GlycoCT, WURCS, Sweet-DB, SNFG) и из них (GlycoCT).

9) Инструменты автоматизации аннотирования оригинальных публикаций, выявления ошибок в публикациях и в базах данных, программы для повышения эффективности и снижения стоимости ретроспективного анализа публикаций коллективом CSDB.

10) Подробная справочная система для пользователей, администраторов и аннотаторов,

включающая руководство пользователя (раздел “Help” в главном меню сайта проекта), учебник по решению наиболее распространенных задач [64] (<http://csdb.glycoscience.ru/help/examples.html>), справочные данные для разработчиков (<http://csdb.glycoscience.ru/help/dbdocs.html>), быструю контекстную справку по элементам интерфейса.

Каждый год в CSDB обновляются и дополняются данные, проводятся поиск и устранение ошибок (в том числе в публикациях других авторов), появляются новые сервисы. Планируемое дальнейшее развитие CSDB включает расширение покрытия гликанами животных, достижение полного покрытия по простейшим, формализацию поиска гликоэпитопов, совершенствование конформационного модуля и дальнейшее заполнение его сервисной базы данными о разветвленных трисахаридах, расширение покрытия базы гликозилтрансфераз ферментами патогенов группы ESKAPE и другие задачи.

### ТЕХНИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ CSDB

Технически CSDB представляет собой платформу для компьютерных сервисов с оригинальным стандартизированным API. Данные, импортированные из других баз (CarbBank, GlycomeDB, GlycoMapsDB, GlycoEpitopeDB) и полученные из литературы, после всесторонней проверки и валидирования попадают в “человекочитаемые” текстовые файлы (дампы), одновременно выступающие резервными копиями. Все редактирование данных в базе происходит на уровне этих файлов. Ежегодно дампы импортируются в реляционную базу данных на СУБД MySQL 5, где получают дополнительные представления, ускоряющие многокритериальный поиск: таблицу связности на уровне мономерных остатков, сервисные базы, денормализацию. Скрипты импорта, обработки, поиска данных и обслуживания базы написаны на языке PHP 5.6; работа с атомарными химическими моделями – на Python 3.5 + RDKit + openBabel; веб-интерфейс пользователя – на Javascript + DHTML. Для молекулярно-динамических расчетов используется Tinker 8.3. Проект развернут на выделенном аппаратном веб-сервере (64 ядра, 96 Gb RAM) под управлением Windows Server 2016, он же используется как вычислительный сервер для обработки ресурсоемких задач пользователей и фоновой обработки конформаций. Длительные задачи (например, выявление ошибок в дампах, подготовленных аннотаторами, или поиск структурных гипотез, наиболее подходящих экспериментальным данным) выполняются в отложенном формате с уведомлением пользователя по мере готовности результатов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для эффективной работы с накопленным в настоящее время объемом информации об углеводах необходимо единое информационное пространство данных по структуре, свойствам и функциям углеводов, связанных с таксономией и свойствами их природных источников. Основное средство создания такого пространства – базы данных (БД) гликомики и прогностические сервисы, использующие данные из этих баз. За последние 10 лет информатизированность гликохимии и гликобиологии существенно возросла, появились общепризнанные стандарты и сервисы, увеличилась их совместимость друг с другом, и началось налаживание взаимодействия с компьютерными проектами смежных областей. Это постепенно приближает гликомику к уровню информационной обеспеченности, сравнимому с существующим в геномике и протеомике, несмотря на большую вариативность и гетерогенность объектов исследования.

Коллектив Carbohydrate Structure Database (CSDB) провел обширное исследование существующих инициатив гликоинформатики для выявления их преимуществ и недостатков. Полученная информация легла в основу создания архитектуры БД и ее реализации в программном продукте CSDB, ключевые особенности которого – полнота покрытия и полностью верифицируемое содержимое. CSDB содержит данные о первичной структуре гликанов и гликоконъюгатов, их таксономическую привязку вплоть до штаммов, подробные библиографические аннотации, спектры ЯМР и отчасти – биохимические, генетические, медицинские и другие аннотации. Встроенные надстройки позволяют проводить анализ путей биосинтеза посредством базы гликозилтрансфераз, получать конформационные карты олигосахаридов, предсказывать и относить спектры ЯМР  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ,  $2\text{D}$ , предсказывать структуру по спектрам и другим данным, проводить кластеризацию таксонов на основании их гликомов, распределять фрагменты по таксонам и положению в структурах, а также классифицировать мономеры. Данные в базе ежегодно обновляются и дополняются, проводятся поиск и устранение ошибок, появляются новые сервисы.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Ю.А. Книрелю за поддержку проекта на начальном этапе и за верификацию данных; К.С. Егоровой за работу с литературой, верификацию данных и помощь в проектировании модуля гликозилтрансфераз; Н.А. Калинин, К.В. Казанцеву, Е.А. Белозерцевой, Э.Л. Здорвенко, Е.В. Шикиной и Н.С. Смирновой за работу с литературой и аннотирование данных; А.Ю. Бочкову, И.Ю. Чернышеву и Р.Р. Капаеву за разработку и про-

граммирование модулей ввода структуры, генерирования 3D-структуры и статистического предсказания ЯМР-спектров соответственно; остальным участникам проекта в 2005–2021 гг.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работы в рамках развития, обслуживания и популяризации CSDB в 2021–2022 гг., включая подготовку данного обзора, выполнены при поддержке Российского научного фонда (проект № 18-14-00098-П).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Egorova K.S., Toukach P.V. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2018. V. 57. P. 14986–14990. <https://doi.org/10.1002/anie.201803576>
2. Lütteke T. // In: *A Practical Guide to Using Glycomics Databases* / Ed. Aoki-Kinoshita K.F. Tokyo: Springer, 2017. P. 335–350. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-56454-6\\_16](https://doi.org/10.1007/978-4-431-56454-6_16)
3. Bohm M., Bohne-Lang A., Frank M., Loss A., Rojas-Macias M.A., Lutteke T. // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. P. D1195–D1201. <https://doi.org/10.1093/nar/gky994>
4. Lütteke T., Bohne-Lang A., Loss A., Goetz T., Frank M., von der Lieth C.W. // *Glycobiology.* 2006. V. 16. P. 71R–81R. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwj049>
5. Doubet S., Bock K., Smith D., Darvill A., Albersheim P. // *Trends in Biochemical Sciences.* 1989. V. 14. P. 475–477. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(89\)90175-8](https://doi.org/10.1016/0968-0004(89)90175-8)
6. Doubet S., Albersheim P. // *Glycobiology.* 1992. V. 2. P. 505–507. <https://doi.org/10.1093/glycob/2.6.505>
7. Campbell M.P., Peterson R., Mariethoz J., Gasteiger E., Akune Y., Aoki-Kinoshita K.F., Lisacek F., Packer N.H. // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. P. D215–D221. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1128>
8. Campbell M.P., Packer N.H. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. V. 1860. P. 1669–1675. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.02.016>
9. Cooper C.A., Joshi H.J., Harrison M.J., Wilkins M.R., Packer N.H. // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31. P. 511–513. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg099>
10. Cooper C.A., Harrison M.J., Wilkins M.R., Packer N.H. // *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29. P. 332–335. <https://doi.org/10.1093/Nar/29.1.332>
11. Zhao S., Walsh I., Abrahams J.L., Royle L., Nguyen-Khuong T., Spencer D., Fernandes D.L., Packer N.H., Rudd P.M., Campbell M.P. // *Bioinformatics.* 2018. V. 34. P. 3231–3232. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty319>
12. Campbell M.P., Royle L., Radcliffe C.M., Dwek R.A., Rudd P.M. // *Bioinformatics.* 2008. V. 24. P. 1214–1216. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn090>
13. Aoki-Kinoshita K.F., Kanehisa M. // In: *Glycoinformatics* / Eds. Lütteke T., Frank M. New York: Humana Press, 2015. P. 97–107. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2343-4\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2343-4_7)
14. Toukach P.V., Egorova K.S. // In: *Glycoscience: Biology and Medicine* / Eds. Taniguchi N., Endo T., Hart G., Seeberger P., Wong C.H. Tokyo: Springer, 2015. P. 241–250. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-54841-6\\_24](https://doi.org/10.1007/978-4-431-54841-6_24)
15. Toukach P.V., Egorova K.S. // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. P. D1229–D1236. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv840>
16. Toukach P.V., Knirel Y.A. // *Glycoconjugate J.* 2005. V. 2. P. 216–217.
17. Toukach P.V. // *J. Chem. Inf. Model.* 2011. V. 51. P. 159–170. <https://doi.org/10.1021/ci100150d>
18. York W.S., Mazumder R., Ranzinger R., Edwards N., Khsay R., Aoki-Kinoshita K.F., Campbell M.P., Cummings R.D., Feizi T., Martin M., Natale D.A., Packer N.H., Woods R.J., Agarwal G., Arpinar S., Bhat S., Blake J., Castro L.J.G., Fochtman B., Gildersleeve J., Goldman R., Holmes X., Jain V., Kulkarni S., Mahadik R., Mehta A., Mousavi R., Nakarakommula S., Navelkar R., Pattabiraman N., Pierce M.J., Ross K., Vasudev P., Vora J., Williamson T., Zhang W. // *Glycobiology.* 2020. V. 30. P. 72–73. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwz080>
19. Khsay R., Vora J., Navelkar R., Mousavi R., Fochtman B.C., Holmes X., Pattabiraman N., Ranzinger R., Mahadik R., Williamson T., Kulkarni S., Agarwal G., Martin M., Vasudev P., Garcia L., Edwards N., Zhang W., Natale D.A., Ross K., Aoki-Kinoshita K.F., Campbell M.P., York W.S., Mazumder R. // *Bioinformatics.* 2020. V. 36. P. 3941–3943. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa238>
20. von der Lieth C.W., Freire A.A., Blank D., Campbell M.P., Ceroni A., Damerell D.R., Dell A., Dwek R.A., Ernst B., Fogh R., Frank M., Geyer H., Geyer R., Harrison M.J., Henrick K., Herget S., Hull W.E., Ionides J., Joshi H.J., Kamerling J.P., Leeflang B.R., Lutteke T., Lundborg M., Maass K., Merry A., Ranzinger R., Rosen J., Royle L., Rudd P.M., Schloissnig S., Stenutz R., Vranken W.F., Widmalm G., Haslam S.M. // *Glycobiology.* 2011. V. 21. P. 493–502. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwq188>
21. Rojas-Macias M.A., Stähle J., Lütteke T., Widmalm G. // *Glycobiology.* 2015. V. 25. P. 341–347. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwu116>
22. Lutteke T., von der Lieth C.W. // *Glycobiology.* 2005. V. 15. P. 1209–1210. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwj039>
23. Lütteke T. // In: *A Practical Guide to Using Glycomics Databases* / Ed. Aoki-Kinoshita K.F. Tokyo: Springer, 2017. P. 29–40. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-56454-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-4-431-56454-6_3)
24. Fujita A., Aoki N.P., Shinmachi D., Matsubara M., Tsuchiya S., Shiota M., Ono T., Yamada I., Aoki-Kinoshita K.F. // *Nucleic Acids Res.* 2021. V. 49.

- P. D1529–D1533.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa947>
25. Tiemeyer M., Aoki K., Paulson J., Cummings R.D., York W.S., Karlsson N.G., Lisacek F., Packer N.H., Campbell M.P., Aoki N.P., Fujita A., Matsubara M., Shinmachi D., Tsuchiya S., Yamada I., Pierce M., Ranzinger R., Narimatsu H., Aoki-Kinoshita K.F. // *Glycobiology*. 2017. V. 27. P. 915–919.  
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwx066>
  26. Egorova K.S., Toukach P.V. // *J. Chem. Inf. Model*. 2012. V. 52. P. 2812–2814.  
<https://doi.org/10.1021/ci3002815>
  27. Herget S., Ranzinger R., Maass K., Lieth C.W. // *Carbohydr. Res*. 2008. V. 343. P. 2162–2171.  
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.03.011>
  28. Ranzinger R., Herget S., von der Lieth C.W., Frank M. // *Nucleic Acids Res*. 2011. V. 39. P. D373–D376.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkq1014>
  29. Varki A., Cummings R.D., Aebi M., Packer N.H., Seeberger P.H., Esko J.D., Stanley P., Hart G., Darvill A., Kinoshita T., Prestegard J.J., Schnaar R.L., Freeze H.H., Marth J.D., Bertozzi C.R., Etzler M.E., Frank M., Vliegthart J.F., Lutteke T., Perez S., Bolton E., Rudd P., Paulson J., Kanehisa M., Toukach P., Aoki-Kinoshita K.F., Dell A., Narimatsu H., York W., Taniguchi N., Kornfeld S. // *Glycobiology*. 2015. V. 25. P. 1323–1324.  
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwv091>
  30. Neelamegham S., Aoki-Kinoshita K., Bolton E., Frank M., Lisacek F., Lutteke T., O'Boyle N., Packer N.H., Stanley P., Toukach P., Varki A., Woods R.J., Group S.D. // *Glycobiology*. 2019. V. 29. P. 620–624.  
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwz045>
  31. Willighagen E.L., Brandle M.P. // *J. Cheminform*. 2011. V. 3. P. 15.  
<https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-15>
  32. Aoki-Kinoshita K.F., Aoki N.P., Fujita A., Fujita N., Kawasaki T., Matsubara M., Okuda S., Shikanai T., Shinmachi D., Solovieva E., Suzuki Y., Tsuchiya S., Yamada I., Narimatsu H. // *Perspectives in Science*. 2017. V. 11. P. 18–23.  
<https://doi.org/10.1016/j.pisc.2016.05.012>
  33. Katayama T., Wilkinson M.D., Aoki-Kinoshita K.F., Kawashima S., Yamamoto Y., Yamaguchi A., Okamoto S., Kawano S., Kim J.D., Wang Y., Wu H., Kano Y., Ono H., Bono H., Kocbek S., Aertis J., Akune Y., Antezana E., Arakawa K., Aranda B., Baran J., Bolleman J., Bonnal R.J., Buttigieg P.L., Campbell M.P., Chen Y.A., Chiba H., Cock P.J., Cohen K.B., Constantin A., Duck G., Dumontier M., Fujisawa T., Fujiwara T., Goto N., Hoehndorf R., Igarashi Y., Itaya H., Ito M., Iwasaki W., Kalas M., Katoda T., Kim T., Kokubu A., Komiyama Y., Kotera M., Laibe C., Lapp H., Lutteke T., Marshall M.S., Mori T., Mori H., Morita M., Murakami K., Nakao M., Narimatsu H., Nishide H., Nishimura Y., Nystrom-Persson J., Ogishima S., Okamura Y., Okuda S., Oshita K., Packer N.H., Prins P., Ranzinger R., Rocca-Serra P., Sansone S., Sawaki H., Shin S.H., Splendiani A., Strozzi F., Tadaka S., Toukach P., Uchiyama I., Umezaki M., Vos R., Whetzel P.L., Yamada I., Yamasaki C., Yamashita R., York W.S., Zmasek C.M., Kawamoto S., Takagi T. // *J. Biomed. Semantics*. 2014. V. 5. P. 5.  
<https://doi.org/10.1186/2041-1480-5-5>
  34. Aoki-Kinoshita K.F., Bolleman J., Campbell M.P., Kawano S., Kim J.D., Lutteke T., Matsubara M., Okuda S., Ranzinger R., Sawaki H., Shikanai T., Shinmachi D., Suzuki Y., Toukach P., Yamada I., Packer N.H., Narimatsu H. // *J. Biomed. Semantics*. 2013. V. 4. P. 39.  
<https://doi.org/10.1186/2041-1480-4-39>
  35. Ranzinger R., Aoki-Kinoshita K.F., Campbell M.P., Kawano S., Lutteke T., Okuda S., Shinmachi D., Shikanai T., Sawaki H., Toukach P., Matsubara M., Yamada I., Narimatsu H. // *Bioinformatics*. 2015. V. 31. P. 919–925.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu732>
  36. Yamada I., Campbell M.P., Edwards N., Castro L.J., Lisacek F., Mariethoz J., Ono T., Ranzinger R., Shinmachi D., Aoki-Kinoshita K.F. // *Glycobiology*. 2021. V. 31. P. 741–750.  
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwab013>
  37. Toukach P.V., Egorova K.S. // *J. Chem. Inf. Model*. 2020. V. 60. P. 1276–1289.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00744>
  38. Tanaka K., Aoki-Kinoshita K.F., Kotera M., Sawaki H., Tsuchiya S., Fujita N., Shikanai T., Kato M., Kawano S., Yamada I., Narimatsu H. // *J. Chem. Inf. Model*. 2014. V. 54. P. 1558–1566.  
<https://doi.org/10.1021/ci400571e>
  39. Matsubara M., Aoki-Kinoshita K.F., Aoki N.P., Yamada I., Narimatsu H. // *J. Chem. Inf. Model*. 2017. V. 57. P. 632–637.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00650>
  40. Bochkov A.Y., Toukach P.V. // *J. Chem. Inf. Model*. 2021. V. 61. P. 4940–4948.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00917>
  41. Lu Z. // *Database*. 2011. V. 2011. P. baq036.  
<https://doi.org/10.1093/database/baq036>
  42. Federhen S. // *Nucleic Acids Res*. 2012. V. 40. P. D136–D143.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr1178>
  43. Benson D.A., Cavanaugh M., Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Sayers E.W. // *Nucleic Acids Res*. 2013. V. 41. P. D36–D42.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
  44. The Uniprot Consortium // *Nucleic Acids Res*. 2017. V. 45. P. D158–D169.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw1099>
  45. Toukach P., Joshi H.J., Ranzinger R., Knirel Y., von der Lieth C.W. // *Nucleic Acids Res*. 2007. V. 35. P. D280–D286.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkl883>
  46. Li X., Xu Z., Hong X., Zhang Y., Zou X. // *Int. J. Mol. Sci*. 2020. V. 21. P. 6727.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21186727>
  47. Abrahams J.L., Taherzadeh G., Jarvas G., Guttman A., Zhou Y., Campbell M.P. // *Curr. Opin. Struct. Biol*. 2020. V. 62. P. 56–69.  
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.11.009>
  48. Scherbinina S.I., Toukach P.V. // *Int. J. Mol. Sci*. 2020. V. 21. P. 7702.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21207702>
  49. Copoiu L., Malhotra S. // *Curr. Opin. Struct. Biol*. 2020. V. 62. P. 132–139.  
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.12.020>
  50. A Practical Guide to Using Glycomics Databases / Ed. Aoki-Kinoshita K.F. Tokyo: Springer, 2017. 370 p.  
<https://doi.org/10.1007/978-4-431-56454-6>
  51. Aoki-Kinoshita K.F. // *Molecular & Cellular Proteomics*. 2013. V. 12. P. 1036–1045.  
<https://doi.org/10.1074/mcp.R112.026252>
  52. Тоукач Ф.В. // Информационные технологии в структурной гликохимии и гликобиологии. Дисс.

- докт. хим. наук. Москва: ФГБУН Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 2019.
53. Egorova K.S., Toukach P.V. // *Carbohydr. Res.* 2014. V. 389. P. 112–114.  
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.10.009>
54. ICD-11: in Praise of Good Data// *The Lancet Infectious Diseases.* 2018. V. 18. P. 813.  
[https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(18\)30436-5](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(18)30436-5)
55. Baumann N. // *Int. J. Clin. Pract.* 2016. V. 70. P. 171–174.  
<https://doi.org/10.1111/ijcp.12767>
56. Kim S., Thiessen P.A., Bolton E.E., Chen J., Fu G., Gindulyte A., Han L., He J., He S., Shoemaker B.A., Wang J., Yu B., Zhang J., Bryant S.H. // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. P. D1202–D1213.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv951>
57. Pavlech L.L. // *J. Med. Library Association.* 2016. V. 104. P. 88–90.  
<https://doi.org/10.3163/1536-5050.104.1.020>
58. Stroylov V., Panova M., Toukach P. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 7626.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21207626>
59. Frank M., Lutteke T., von der Lieth C.W. // *Nucleic Acids Res.* 2007. V. 35. P. 287–290.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkl907>
60. Egorova K.S., Toukach P.V. // *Glycobiology.* 2017. V. 27. P. 285–290.  
<https://doi.org/10.1093/glycob/cww137>
61. Egorova K.S., Knirel Y.A., Toukach P.V. // *Glycobiology.* 2019. V. 29. P. 285–287.  
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwz006>
62. Egorova K.S., Smirnova N.S., Toukach P.V. // *Glycobiology.* 2021. V. 31. P. 524–529.  
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwaa107>
63. Egorova K.S., Toukach P.V. // In: *A Practical Guide to Using Glycomics Databases* / Ed. Aoki-Kinoshita K.F. Tokyo: Springer, 2017. P. 75–113.  
[https://doi.org/10.1007/978-4-431-56454-6\\_5](https://doi.org/10.1007/978-4-431-56454-6_5)
64. Toukach P.V., Egorova K.S. // In: *Glycoinformatics* / Eds. Lütteke T., Frank M. New York: Humana Press, 2015. P. 55–85.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2343-4\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2343-4_5)
65. Egorova K.S., Kondakova A.N., Toukach P.V. // *Database.* 2015. V. 2015. P. bav073.  
<https://doi.org/10.1093/database/bav073>
66. Chernyshov I.Y., Toukach P.V. // *Bioinformatics.* 2018. V. 34. P. 2679–2681.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty168>
67. Kapaev R.R., Toukach P.V. // *J. Chem. Inf. Model.* 2016. V. 56. P. 1100–1104.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00083>
68. Kapaev R.R., Toukach P.V. // *Bioinformatics.* 2018. V. 34. P. 957–963.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx696>
69. Kapaev R.R., Egorova K.S., Toukach P.V. // *J. Chem. Inf. Model.* 2014. V. 54. P. 2594–2611.  
<https://doi.org/10.1021/ci500267u>
70. Kapaev R.R., Toukach P.V. // *Anal. Chem.* 2015. V. 87. P. 7006–7010.  
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01413>

## Carbohydrate Structure Database and Other Carbohydrate Databases as the Most Important Element of Glycoinformatics

P. V. Toukach\*, # and A. I. Shirkovskaya\*

#Phone: +7(916) 172-47-10; e-mail: netbox@toukach.ru

\*N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry Russian Academy of Sciences, Leninskiy prosp. 47, Moscow, 119334 Russia

Carbohydrates are one of the most chemically diverse classes of biomacromolecules. The volume of accumulated information on carbohydrates exceeds by far the level at which it is possible to orient oneself in this ocean of data without special tools such as glycomics databases (DBs) and their predictive services. Existing DBs are not fully compatible with each other in coverage and data formats as well as in services provided to users, and each project is focused on solving its specific tasks. The main problems of current DBs are content errors, incomplete coverage, and absence of a widely accepted carbohydrate notation. In demand are carbohydrate DBs which provide a common information space with broad coverage of carbohydrate structures, features and activity in connection with their taxonomy and properties of their natural source. As part of the Carbohydrate Structure Database (CSDB) project a database architecture has been developed to establish an expandable glycoinformatics project with continuous support and regular updates. It was implemented in software, which is devoid of the most common shortcomings of other glycomics DBs. In the 15 years of its existence CSDB has become one of the main data sources for microbial carbohydrates and a platform for multitudes of glycoservices. The projects aim is to create a modern, comprehensive and freely accessible database of natural carbohydrates with yearly updates and data additions, error search and elimination (including errors in publications), and introduction of new services.

*Keywords:* CSDB, carbohydrates, databases, glycoinformatics



УДК 577.181.5:577.181.4

## АНТИБИОТИКИ ГРУППЫ АУРЕОЛОВОЙ КИСЛОТЫ: ПЕРСПЕКТИВЫ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО КЛАССА СОЕДИНЕНИЙ

© 2022 г. А. К. Исагулиева\*, \*\*, #, А. Н. Тевяшова\*, \*\*\*, А. А. Штиль\*\*\*\*

\*Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе, Россия, 119021 Москва, ул. Б. Пироговская, 11, стр. 1

\*\*Институт биологии гена РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 34/5

\*\*\*Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Россия, 125047 Москва, Миусская пл., 9

\*\*\*\*Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина Минздрава России, Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 23

Поступила в редакцию 06.05.2021 г.

После доработки 05.06.2021 г.

Принята к публикации 16.06.2021 г.

Антибиотики группы ауреоловой кислоты – митрамицин, хромомицин А3, оливомицин А – ароматические гликозилированные поликетиды, продуцируемые актиномицетами. Молекула ауреоловой кислоты состоит из трициклического агликона с двумя олигосахаридными цепями в качестве заместителей, а также пентильной боковой цепи в положении С3. Для митрамицина и хромомицина А3 детально исследованы механизм биосинтеза в штаммах-продуцентах, роль ферментов, необходимость каждого этапа биосинтеза и их влияние на биологическую активность продукта. Благодаря этому стал возможен рациональный поиск новых, более специфичных и менее токсичных аналогов существующих антибиотиков группы ауреоловой кислоты. В настоящем обзоре обобщены базовые и новейшие знания о биосинтезе ауреоловых антибиотиков, современных подходах к химическим и полусинтетическим модификациям, взаимосвязях “структура–активность”. Проанализированы молекулярные механизмы цитотоксичности ауреоловой кислоты и перспективы развития этого класса соединений как “кандидатов” в противоопухолевые препараты.

*Ключевые слова:* антибиотики, митрамицин, оливомицин А, хромомицин А3, механизм действия, биосинтез, ДНК-лиганды

DOI: 10.31857/S0132342322020129

### СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....266

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ПРИМЕНЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ ГРУППЫ АУРЕОЛОВОЙ КИСЛОТЫ.....267

*Химиотерапия опухолей*.....267*Молекулярные механизмы действия: связывание с GC-богатыми областями ДНК*.....269*Влияние на транскрипционные факторы и структуру хроматина*.....269*Нейропротекторные свойства*.....271

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ АНТИБИОТИКОВ ГРУППЫ АУРЕОЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ.....271

*Модификации олигосахаридных цепей*.....272*Модификации агликона и боковой пентильной цепи*.....273

БИОСИНТЕЗ АНТИБИОТИКОВ ГРУППЫ АУРЕОЛОВОЙ КИСЛОТЫ.....273

ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ ГРУППЫ АУРЕОЛОВОЙ КИСЛОТЫ.....275

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....275

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....276

### ВВЕДЕНИЕ

Среди противоопухолевых препаратов – синтетических антиметаболитов, алкилирующих агентов, природных и полусинтетических алкалоидов, антрациклинов и др. – антибиотики за-

Сокращения: АК – ауреоловая кислота; МИК – минимальная ингибирующая концентрация; ТФ – транскрипционный фактор; SP1 – specificity protein 1 (белок специфичности 1).

# Автор для связи: (тел.: +7 (916) 059-17-57; эл. почта: kia2303@ya.ru).

нимают важное место [1, 2]. Побочные эффекты противоопухолевых препаратов (нефротоксичность, гепатотоксичность, миелосупрессия, кардиотоксичность [3, 4] как наиболее частые) существенно снижают возможности терапии. Поиск новых противоопухолевых агентов осложняется продолжительностью исследований и не всегда дает значимые результаты: практическое значение приобретают отдельные соединения из тысяч исходных. В связи с этим актуальной становится оптимизация структуры и свойств применяемых сегодня антибиотиков [5], для которых установлены (или активно изучаются) механизмы действия. Производные ауреоловой кислоты (митрамицин, хромомицин А3, оливомицин А и их аналоги) в настоящий момент вновь достаточно активно исследуются в качестве препаратов для терапии онкологических и других заболеваний.

Ауреоловая кислота (АК) – первый антибиотик, выделенный из данной группы соединений и получивший название митрамицин (синонимы: LA-7017 или PA-144) [6]. Параллельные независимые исследования нескольких научных групп, а также наличие в выделяемых культуральных средах промежуточных метаболитов и производных обусловили трудности наименования и идентификации отдельных соединений [7]. Впоследствии были получены другие представители группы: 1) хромомицин А3, выделенный из штаммов *Streptomyces griseus* и *Streptomyces cavourensis*, имеющий идентичный митрамицину хромофор – хромомицинон; 2) оливомицин А, получаемый из штамма *Actinomyces olivoreticuli*; 3) хромоцикломицин, продуцируемый штаммом *Streptomyces atroolivaceus* и не проявляющий существенной цитотоксичности на линиях опухолей, т.к. не способен проникать в клетки про- и эукариот (его тетрациклический агликон хромоциклин получен как отдельное производное, которое также не проявило активность из-за отсутствия связывания с ДНК) [8].

Различия в структурах ауреоловых антибиотиков определяются следующими параметрами: 1) количеством циклов в агликоне; 2) размером и составом олигосахаридных остатков в положениях С-2 и С-6; 3) длиной и составом алифатической цепи в положении С-3; 4) наличием алкильного заместителя в положении С-7. Все АК, кроме хромоцикломицина, представляют собой трициклические ароматические гликозилированные поликетиды, имеющие две олигосахаридные цепи разной длины и состава в положениях С-2 и С-6 агликона (рис. 1, табл. 1). Хромоцикломицин имеет в качестве агликона тетрациклический хромоциклин. Митрамицин и хромомицин А3 имеют общую структуру агликона и отличаются лишь составом сахаров. Оливомицин А схож с хромомицином А3, за исключением Е-сахара (4-*O*-изобутирил-оливомикоза вместо 4-*O*-ацетил-*L*-хро-

мозы) и алкильного заместителя в положении С-7 (метильная группа у хромомицинона; у агликона оливомицина А, оливина, заместитель отсутствует).

Для основных представителей класса – хромомицина А3, митрамицина и оливомицина А – и их производных ниже рассмотрены биологические свойства, взаимосвязь структуры и активности, пути биосинтеза, а также предполагаемые механизмы действия.

### БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ПРИМЕНЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ ГРУППЫ АУРЕОЛОВОЙ КИСЛОТЫ

Первоначальное внимание исследователей было обращено на антибактериальный эффект антибиотиков группы АК. Хромомицин А3, оливомицин А и митрамицин показали ингибирующую активность в отношении штаммов *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*: минимальная ингибирующая концентрация (МИК) на обоих штаммах составляла не более 0.15 мкг/мл для хромомицина А3, 0.5 мкг/мл для оливомицина А и 0.039 мкг/мл для митрамицина. Однако в отношении грамотрицательных бактерий и грибов соединения были неактивны [9–12]. Кроме этого, была исследована противовирусная активность соединений. Митрамицин в концентрации 50 нМ ингибировал индуцированную TNF $\alpha$  реактивацию вируса иммунодефицита человека (HIV-1) в клетках Jurkat [13]. Действие оливомицина А и его дегликозилированных производных исследовано на вирусах-возбудителях оспы, гриппа, иммунодефицита человека, герпеса и др., но активность проявлялась только в отношении штаммов HIV-1 и HIV-2 [14]. Хромомицин А3 также показал противовирусную активность в отношении HIV-1 [15].

#### Химиотерапия опухолей

Основное применение антибиотиков группы АК нашли в химиотерапии злокачественных новообразований; рациональное использование этих соединений в лечении инфекционных заболеваний ограничивается их высокой общерезорбтивной токсичностью. Митрамицин успешно применяли в лечении рака яичек, острого и хронического миелоидного лейкоза [16]. Кроме этого, до появления бисфосфонатов митрамицин в малых дозах использовали в лечении гиперкальциемии у онкологических больных [17, 18] и при раке Педжета [19]. Хромомицин А3 активно исследовали и применяли в Японии и США как монопрепарат и в комбинированной терапии рака толстой кишки, желудка и других солидных опухолей [20]. Оливомицин А нашел широкое клиническое применение в СССР и использовался в лечении хорионкарциномы [21], опухолей яичка, сарком мягких тканей [12] и рака желудка [20].

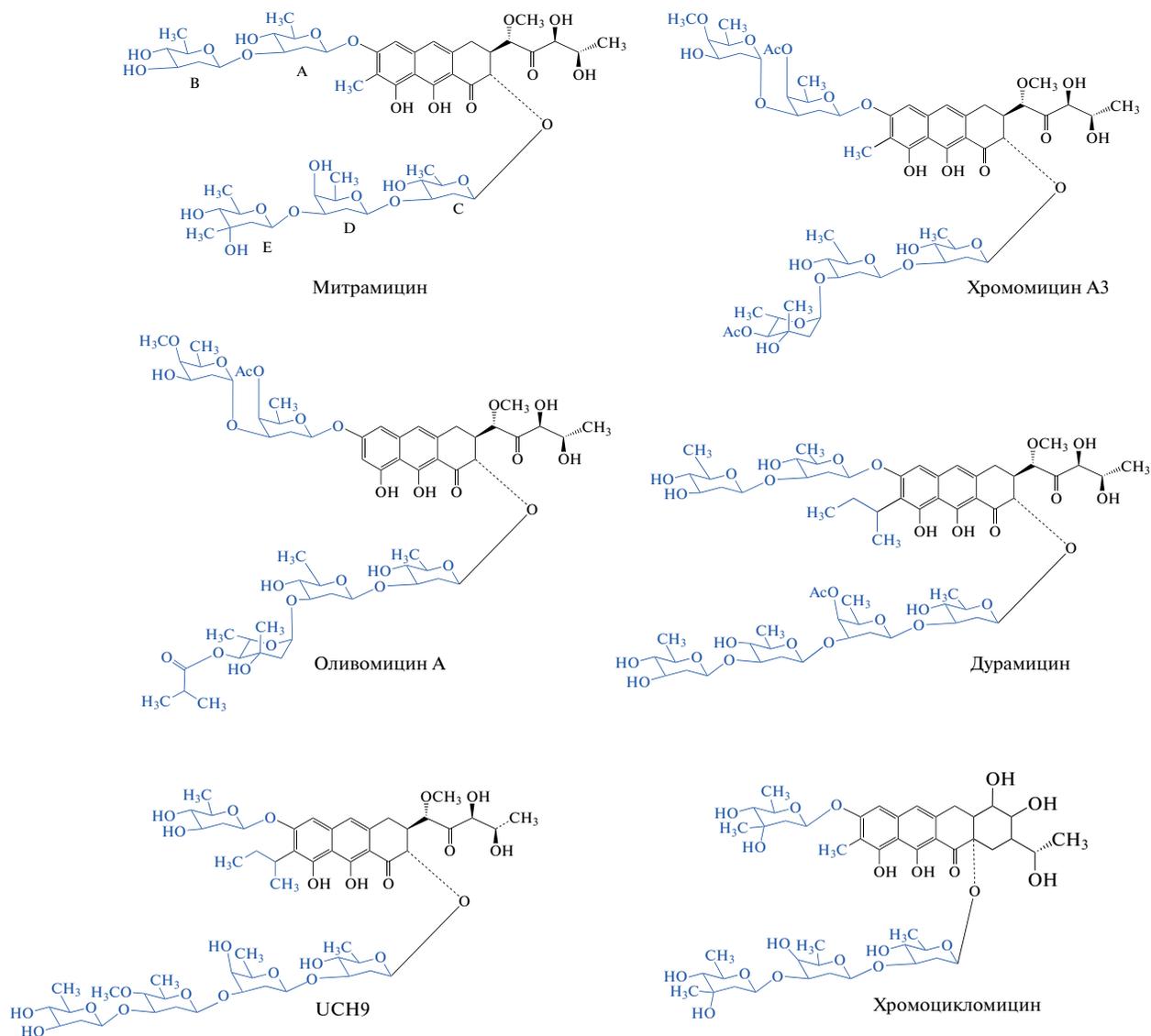


Рис. 1. Структура антибиотиков группы ауреоловой кислоты.

Таблица 1. Состав олигосахаридных цепей представителей группы ауреоловой кислоты

Сахар	Антибиотик					
	митрамицин	хромомицин А3	оливомицин А	дурамицин	UCH9	хромоцикломицин
A	D-оливоза	4-O-ацетил-D-олиоза	4-O-ацетил-D-олиоза	D-оливоза	D-оливоза	D-оливоза
B	D-оливоза	Оливомоза	Оливомоза	D-оливоза	D-оливоза	D-оливоза
C	D-оливоза	D-оливоза	D-оливоза	D-оливоза	D-олиоза	D-оливоза
D	D-оливоза	D-оливоза	D-оливоза	4-O-ацетил-D-олиоза	4-O-метил-D-олиоза	D-оливоза
E	D-микароза	4-O-ацетил-L-хромоза В	4-O-изобутирил-оливомикоза	D-оливоза	D-оливоза	D-микароза
F	—	—	—	D-оливоза	—	—

В настоящее время клиническое применение митрамицина, хромомицина АЗ и оливомицина А прекращено из-за выраженных побочных эффектов, в основном нефро- и гепатотоксичности [22]. Вместе с тем представляется целесообразным продолжить исследования столь активного химического класса соединений. Знания механизмов действия антибиотиков группы АК послужат рациональному дизайну производных, применимых в клинической практике.

*Молекулярные механизмы действия: связывание с GC-богатыми областями ДНК*

Интерес к АК как химиотерапевтическим агентам объясняется их способностью взаимодействовать с ДНК и нарушать транскрипцию генов. Особенность этих узкобороздочных лигандов — высокая аффинность к GC-богатым участкам ДНК. Такие участки присутствуют преимущественно в регуляторных областях генома (короткие GC-повторы и CpG-островки) [23]. Связываясь с ними, антибиотики способны ингибировать транскрипцию. Механизмы и последствия такого действия в настоящий момент не до конца ясны. Предполагается, что, связываясь с GC-повторами, антибиотики группы АК блокируют сайты посадки транскрипционных факторов, например, Sp1 (specificity protein 1) [24–26].

В ряде работ исследованы предпочтительные сайты связывания антибиотиков группы АК [27–29]. В экспериментах с мечеными короткоцепочечными олигонуклеотидами показано, что молекулы антибиотика способны образовывать комплекс, координированный ионом двухвалентного металла (1 : 1 или 2 : 1); комплекс стабилизируется в малой бороздке ДНК водородными связями с аминогруппой гуанина. Комплекс взаимодействует с сайтом длиной как минимум 4 нуклеотида, причем центральные основания имеют ключевое значение для связывания антибиотика с ДНК и стабильности комплекса (GG ≥ GC > CG) [28].

Такие повторы встречаются в том числе в регуляторных областях генов и могут выполнять роль сайтов связывания транскрипционных факторов (ТФ), например, фактора SP1 с сайтом связывания 5'-CGGGGCCCG-3'. В геноме человека с помощью иммунопреципитации хроматина и высокопроизводительного скрининга обнаружено >12 тыс. подобных консенсусов [30], более половины из них расположены в 5'- или 3'-нетранслируемых областях, где зачастую находятся регуляторные элементы (промоторы, энхансеры, сайленсеры, инсуляторы). SP1-опосредованная транскрипция отмечена, в частности, для генов, участвующих в ответе на повреждение ДНК, в регуляции ангиогенеза, апоптоза, пролиферации, метастазирования и ремоделирования хроматина [31]. Кроме того, уровень SP1 по-

вышен в клетках рака легкого, желудка, поджелудочной железы и др. [32, 33], что обосновывает возможность использования этого ТФ в качестве лекарственной мишени. Обработка клеток аденокарциномы легкого и яичников антибиотиками группы АК приводила к ингибированию экспрессии онкогенов *c-Src*, *c-Myc* и *MDR1*, имеющих сайты связывания ТФ семейства SP в промоторных областях (рис. 2) [34–37].

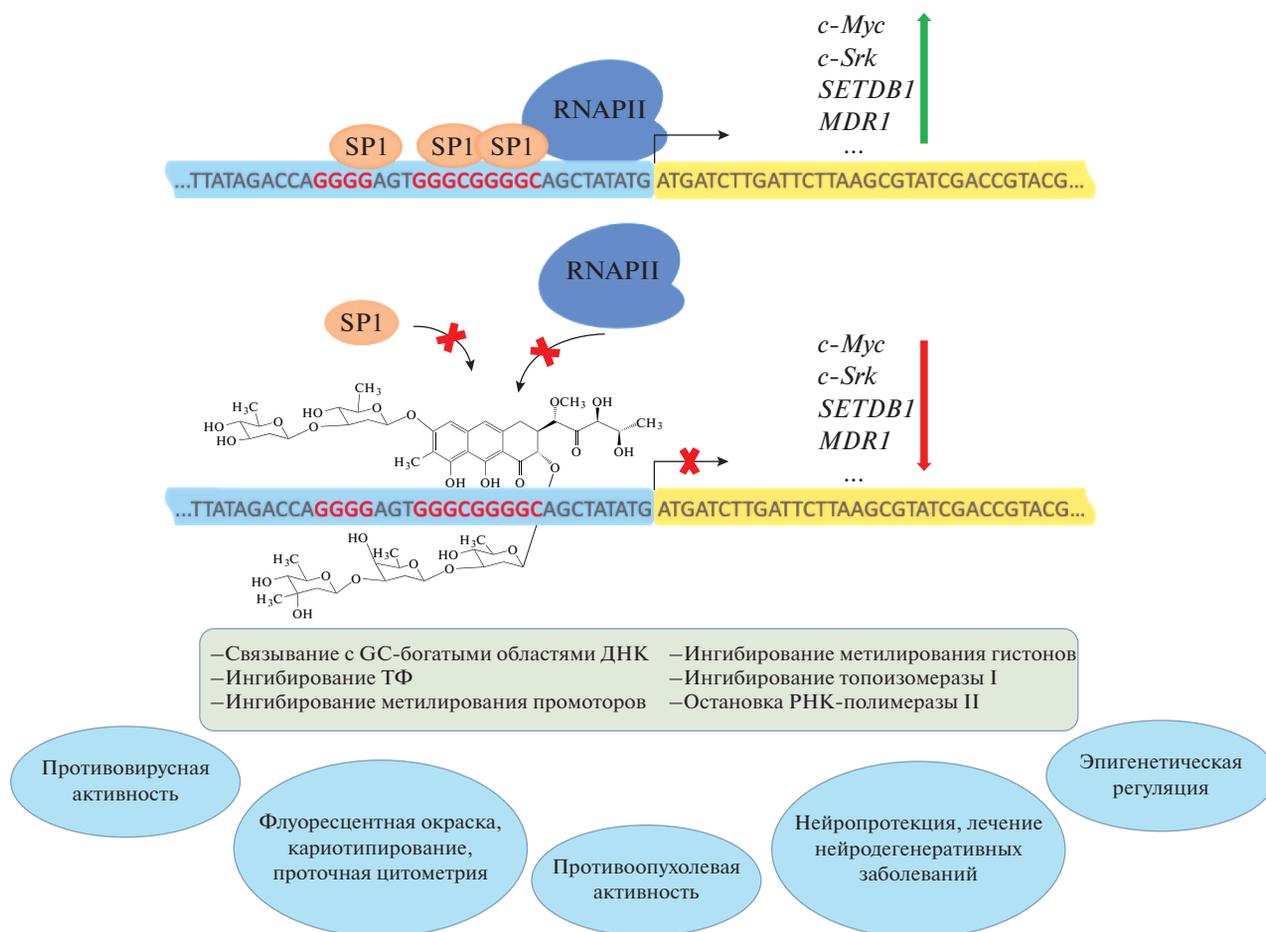
Помимо ингибирования генов-мишеней SP1, митрамицин способен существенно подавлять транскрипцию генов, зависимых от ТФ EWS-FLI1, в клетках саркомы Юинга [38]. Сайт связывания EWS-FLI1 не содержит предпочтительного для митрамицина GC-повтора [39], поэтому механизм его действия остается неясным. Митрамицин продолжает исследоваться в качестве монопрепарата или в комбинированной терапии с ингибиторами CDK9 [40].

Производные АК также ингибируют активность топоизомераз I и II [41, 42], создавая пространственные препятствия для связывания ферментов с ДНК и матричных синтезов. Связывание ауреоловых антибиотиков с ДНК может препятствовать образованию преинициаторного транскрипционного комплекса, связыванию и/или процессированию РНК-полимеразы II [28]. В настоящее время детально исследуется ингибирование функций РНК-полимеразы II при действии оливомицина А и его производного, оливамида, на опухолевые и неопухолевые клетки [43]. Интересно, что оливомицин А вызывает не только ингибирование транскрипции, но и активацию экспрессии ряда генов. Это подтверждает многосторонний характер влияния АК на важнейшие процессы, обуславливающие жизнеспособность клеток.

Свойства антибиотиков группы АК не ограничиваются подавлением экспрессии онкогенов. Они способны усиливать или восстанавливать транскрипцию части генов, регулирующих клеточный цикл и выживание. В нейронах дрозофилы митрамицин ингибировал экспрессию *c-Myc* и активировал экспрессию *p21<sup>waf1/cip1</sup>* (негативный регулятор клеточного цикла); этими механизмами обуславливался нейропротекторный эффект митрамицина [44] (см. также подраздел “Нейропротекторные свойства”).

*Влияние на транскрипционные факторы и структуру хроматина*

Предполагалось, что снижение транскрипции SP1-зависимых генов обуславливается тем, что производные АК блокируют сайт связывания ТФ на ДНК. Однако АК снижают уровень и самого SP1 (по крайней мере, в отдельных клеточных линиях) [45, 46]. Примерно на 20% снижался уро-



**Рис. 2.** Предполагаемые механизмы ингибирования транскрипции антибиотиками группы ауреоловой кислоты и возможности их применения.

вень мРНК SP1 в линиях HEp-2 (карцинома гортани) и KB (эпидермальная карцинома) при действии митрамицина (200 и 80 нМ соответственно) в течение 48 ч. Уровень белка SP1 снижался еще более существенно. Обработка клеток митрамицином в комбинации с циклогексимидом (ингибитор синтеза белка) или MG132 (ингибитор 26S протеасомы) показала, что ингибирующее действие митрамицина на SP1 связано с функцией протеасом [45]. Инкубация клеток карциномы яичников с 200 нМ митрамицина или его аналога DIG-MSK снизила уровень мРНК SP1 более чем на 20% уже после 8 часов [47]. На клетках миеломы мыши 5TGM1 подавление SP1 практически не наблюдалось, что не позволяет сделать однозначный вывод о действии митрамицина на экспрессию SP1 [48].

Долгое время антибиотики группы АК рассматривались главным образом как ингибиторы SP1-транскрибируемых генов; в настоящее время также изучается их влияние на эпигенетическую регуляцию транскрипции. Известно, что регуляция укладки хроматина происходит на эпигене-

тическом уровне: конденсация вызывается метилированием ДНК и модификациями гистонов. Метилирование остатков цитозина привлекает деацетилазу гистонов HDAC в составе хроматин-ремоделирующего комплекса, что способствует образованию транскрипционно неактивного хроматина. Гиперметилирование в CpG-островках промоторов генов-супрессоров опухолей снижает их экспрессию, что может приводить к злокачественной трансформации клетки.

Снижение метилирования при действии митрамицина показано на клетках рака легкого (линии CL1-5 и A549) [49]. Добавление малых концентраций митрамицина (10 нМ) существенно снижало гиперметилирование генов *SLIT2* и *TIMP3* на 14-й день инкубации. Иммуноблоттинг показал снижение уровня метилтрансферазы DNMT1 после 14 дней инкубации клеток с 10 нМ митрамицином. Интересно, что уровень мРНК метилтрансферазы при тех же условиях оставался практически неизменным, хотя ее экспрессия SP1-зависимая [50]. Уровень белка и мРНК метилтрансферазы гистона H3, SETDB1,

снижался при инкубации клеток меланомы с митрамицином или его аналогом ЕС-8042 [51], при этом экспрессия гена *SETDB1 SP1*-зависимая.

Не вполне ясны механизмы эпигенетической регуляции производными АК, среди вероятных – подавление экспрессии генов, кодирующих ферменты модификации гистонов и ДНК, а также связывание с этими ферментами и их инактивация. Последнее – ингибирование метилтрансферазной активности – рассмотрено для оливомицина А и его производного оливамида, которые способны подавлять ДНК-метилтрансферазу Dnmt3a [52]. Для присоединения донорной метильной группы по положению С-5 цитозина Dnmt3a должна присоединиться к таргетной GC-последовательности, экспонировать остаток цитозина из минорной бороздки и расположить его в каталитическом центре. После этого происходит образование стабильного ковалентно связанного интермедиата с последующим метилированием цитозинового остатка. Оливомицин А и оливамид препятствуют метилированию на этапе образования стабильного интермедиата, что, видимо, вызвано затруднением доступа каталитического центра Dnmt3a к цитозину в малой бороздке ДНК. Рассматривая вышеназванные свойства оливомицина А, митрамицина и их аналогов, можно предположить, что они действуют как ингибиторы транскрипции метилтрансфераз и/или непосредственно как ингибиторы их ферментативной активности.

#### *Нейропротекторные свойства*

Описанные выше свойства производных АК оказываются важными в новых для этого химического класса областях. Указанные антибиотики неожиданно проявили нейропротекторный эффект. Малые дозы митрамицина (150 мкг/кг) способствовали увеличению продолжительности жизни на 30% у модельных мышей с болезнью Хантингтона и улучшению их двигательных функций. При этом происходило существенное снижение уровня метилированного гистона H3 [53]. Такой эффект митрамицина ранее был описан для линий опухолевых клеток (линии рака легкого CL1-5 и А549, линия клеток меланомы А375); оказалось, что, действуя на нейроны, митрамицин защищает их от внешних стрессовых воздействий. Введение хромомицина мышам с моделируемой болезнью Хантингтона также улучшало двигательную активность и увеличивало время жизни, однако помимо этого снижалось количество повреждений ДНК нейронов, а профиль ацетилирования гистонов был таким же, как у мышей дикого типа [54].

Нейропротекторные свойства митрамицина и его аналогов показаны также на моделях заболеваний, в патогенезе которых играет роль наруше-

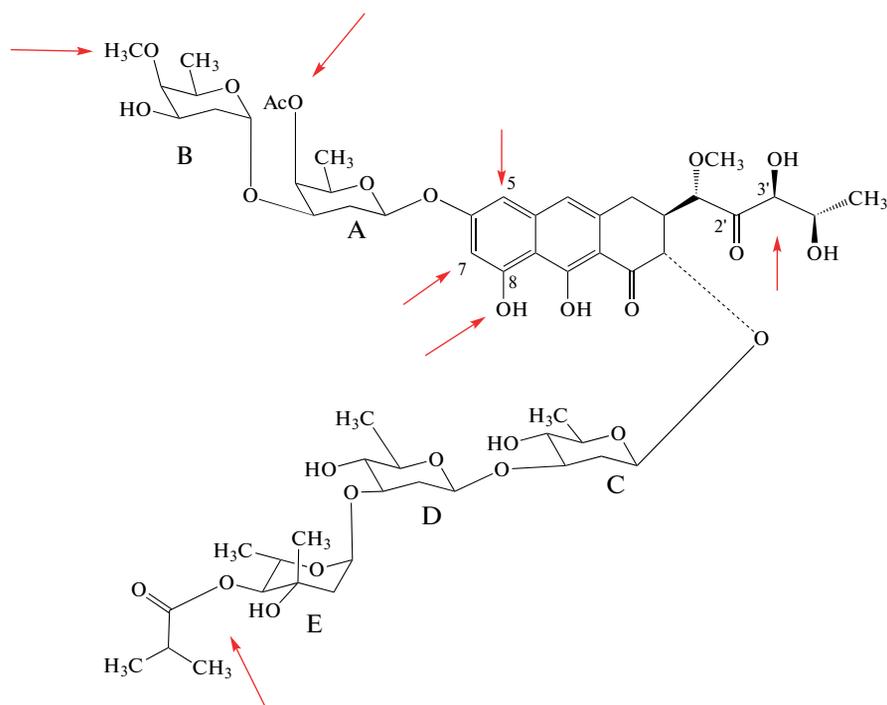
ние ответов на стресс (неправильная пространственная организация белков – стресс эндоплазматического ретикулаума; изменение баланса окисления-восстановления при повреждении ДНК): болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона, дофаминергическая нейротоксичность вследствие употребления метамфетамина, ишемия головного мозга [55, 56]. Эти состояния связаны с увеличением копийности ряда генов, нарушениями эпигенетической регуляции и повышением экспрессии транскрипционных факторов, в том числе SP1.

Важно отметить, что, хотя основной механизм действия aureоловых антибиотиков – их способность связывать ДНК и ингибировать транскрипцию, тем не менее не всегда этот механизм объясняет наблюдаемые эффекты. В моделях болезни Хантингтона действие митрамицина и хромомицина, по-видимому, не связано с прямым ингибированием экспрессии гена хантингтина (*HTT*): последняя сохраняется на исходном уровне при добавлении антибиотика [55]. При этом промотор гена *HTT* содержит три сайта связывания SP1 вблизи точки старта транскрипции. Нейропротекторный эффект может объясняться, по крайней мере частично, снижением экспрессии *Myc*, *Hif1 $\alpha$*  и *Src* [44]. Это позволяет нейронам избежать гибели в условиях экзогенного окислительного стресса.

#### ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ АНТИБИОТИКОВ ГРУППЫ АУРЕОЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ

Биологическая активность антибиотиков группы АК определяется, главным образом, их способностью образовывать комплексы с двучлещечной ДНК в присутствии  $Mg^{2+}$ . АК – узкобороздочные лиганды, предпочтительно связывающиеся с GC-богатыми областями генов. Агликоновая часть антибиотика располагается в малой бороздке ДНК, при этом гидроксильная группа в положении С-8 взаимодействует с аминогруппой гуанина, экспонированной внутрь малой бороздки, образуя водородные связи. А- и В-сахара и боковая цепь С-3 агликона образуют межмолекулярные связи с сахарофосфатным остовом ДНК [57]. Двухвалентный ион магния координируется гидроксильной группой С-9 и соседней карбонильной группой С-1 агликона [27]. Образование устойчивого комплекса антибиотик–ДНК повышает локальную температуру плавления, что приводит к стабилизации вторичной структуры ДНК и нарушению матричных синтезов [58].

Различия в структуре главных представителей антибиотиков группы АК во многом определяют основные пути синтеза их аналогов (рис. 3): 1) изменение профиля ацетилирования и метилирования А-, В- и Е-сахаров; 2) изменение длины и со-



**Рис. 3.** Основные направления структурных модификаций антибиотиков группы ауреоловой кислоты (на примере оливомицина А).

става олигосахаридных остатков; 3) модификации агликона по положениям С-5, С-7 и фенольной группе С-8; 4) модификации 2'-кето и 3'-гидрокси-групп или замена боковой цепи агликона на более короткую (производные SA, SK и SDK).

#### Модификации олигосахаридных цепей

4-*O*-ацетилирование D-олиозы (А-сахар) у хромомицина А3 и оливомицина А, а также D-хромозы (Е-сахар хромомицина А3) приводит к увеличению стабильности соединений в комплексе с ДНК, вероятно, за счет образования дополнительной водородной связи между ацильной группой и 2-аминогруппой гуанина. А, Е-4-*O*-дидеацетилированная форма хромомицина А3 показала меньшую цитотоксичность на ряде опухолевых линий клеток [59]. Митрамицин не имеет ацетильных заместителей у сахаров, что делает его более “гибким”, т.е. менее требовательным к пространственной структуре GC-богатых участков малой бороздки, позволяя связывать больше GC-сайтов [60]. Отсутствие изобутирильной группы у производных оливомицина А почти не влияло на формирование магний-координируемого комплекса, однако соединение теряло аффинность к ДНК; антипролиферативная активность снижалась [61]. Кроме этого, такая роль изобутирильной группы для проявления антипролиферативной активности оказалась значительно важнее, чем роль ацетильной группы в положении А4.

Более радикальные модификации базовой структуры, такие как изменение состава олигосахаридных цепей, как правило, приводят к существенному снижению аффинности соединения к ДНК. Так, для хромомицина А3 и митрамицина получены аналоги, отличающиеся наличием Е-сахара. Присутствие Е4-ОН-группы митрамицина стабилизирует молекулу в малой бороздке ДНК, обеспечивая прочность связи и увеличивая время диссоциации комплекса. Отсутствие D-микарозы не исключало возможности образования комплекса 4-кетодемикарозилмитрамицин–ДНК, при этом соединение не ингибировало транскрипцию гена *sSRK*, активируемую SP1 [34]. Аналогичная зависимость скорости диссоциации и, вследствие этого, биологической активности от длины олигосахаридных цепей показана для производных хромомицина А3 [62, 63]. Аналоги оливомицина А с фенилдиазенильными заместителями, присоединенными по 5-положению агликона, и отсутствующей дисахаридной цепью имели низкую цитотоксичность на клеточных линиях лейкозов [14]. Отсутствие токсичности на опухолевых клетках наблюдалось также и для производных агликона оливина. Эти данные указывают на существенную роль олигосахаридных остатков, в частности Е4-*O*-заместителей, в способности антибиотиков группы АК образовывать стабильные комплексы с ДНК и влиять на экспрессию генов.

Интересно отметить, что, хотя отсутствие дисахаридной цепи оливомицина А приводило к значительному снижению цитотоксичности, его фенилдиазенильные производные были активны в отношении вируса иммунодефицита человека HIV-1 [14]. Цитотоксическая доза для опухолевых клеток была больше эффективной ингибирующей дозы для штамма HIV-1 в 2 раза (индекс селективности,  $IC_{50}/EC_{50}$ ), а для отдельных производных – в 30 раз. Это делает подобный путь химических модификаций весьма перспективным для поисков антиретровирусных агентов.

#### Модификации агликона и боковой пентильной цепи

Модификации агликона ауреоловых антибиотиков, как правило, связаны с изменением состава и длины пентильной цепи в С3-положении или с введением функциональных групп по С7-, С8- и С5-положениям.

Например, по С7-положению хромофора возможно введение алкильной группы разной длины. Модификация не так существенна для биосинтеза в клетке продуцента, однако может влиять на биоактивность: так, для УСН9 и дурамицина показано, что 2-метилбутильная группа вытесняет D-сахар из малой бороздки ДНК, приводя к нестабильности структуры и снижению связывания антибиотика с ДНК. Наличие же небольшой метильной группы в том же положении у митрамицина и хромомицина А3 повышает связывание с ДНК и стабильность образующегося комплекса [64], а ее отсутствие снижает аффинность 7-дезметилмитрамицина к ДНК более чем в 150 раз [65].

С5-фенилдиазенильные производные оливомицина А не показали значимого эффекта на опухолевых клетках, однако в их случае происходил одновременный гидролиз дисахаридной цепи, поэтому нельзя однозначно сказать, какой вклад вносят С5-заместители агликона в биологическую активность [14]. Производное оливомицина А с ацетилированной С8-фенильной группой показало схожую с исходным антибиотиком активность на линиях лейкоза [14].

Один из самых успешных подходов к синтезу новых производных АК – модификация пентильной цепи в С3-положении. Подобные производные были впервые получены для митрамицина путем инактивации гена *mtmW*, кодирующего соответствующую кеторедуктазу, в штамме-продуценте *Streptomyces argillaceus*. На последних стадиях биосинтеза она отвечает за восстановление 4'-кетогруппы алкильной боковой цепи после расщепления 4-го кольца агликона. Ее инактивация привела к получению трех новых производных: митрамицина SK (short ketone), митрамицина SA (short acid) и демикарозилмитрамицина SK [66]. Те же производные хромомицин А3 с добав-

лением еще одного продукта, дикетона (SDK), были получены схожим образом при инактивации гена кеторедуктазы *cmmWI* [67]. Формы SK и SDK показали схожую или большую активность на ряде опухолевых линий клеток в сравнении с митрамицином или хромомицином А3, а SK-форма митрамицина показала еще и в разы меньшую цитотоксичность и лучший терапевтический индекс. Для оливомицина А полусинтетически была создана SA-форма, однако она не вызывала гибель опухолевых клеток. Другое производное – оливамид, содержащий *N,N*-диметиламиноэтиламинную группу в боковой цепи, показал схожую с оливомицином А цитотоксичность на серии линий опухолевых клеток. В экспериментах на мышцах с трансплантированной меланомой В16 переносимость оливамида превышала таковую оливомицина А [68].

Таким образом, на аффинность АК к ДНК и, как следствие, на биологические свойства, влияют наличие ацетокси- и метоксигрупп в олигосахаридных цепях, длина и состав последних, наличие небольшой алкильной группы в положении С-7, а также тип боковой цепи в положении С-3 агликона.

## БИОСИНТЕЗ АНТИБИОТИКОВ ГРУППЫ АУРЕОЛОВОЙ КИСЛОТЫ

Для митрамицина и хромомицина А3 подробно описан механизм биосинтеза в штаммах-продуцентах *Streptomyces argillaceus* и *Streptomyces griseus*. Биосинтез центральной части молекулы на первых стадиях аналогичен получению тетрациклинов и антрациклинов и начинается с конденсации ацетатно-малонатных единиц. Далее у ауреоловых антибиотиков происходит последовательное гликозилирование с образованием моно- и олигосахаридных боковых цепей, а также окислительное расщепление тетрацикла до дигидроантраценового агликона. Дополнительные модификации включают метилирование и/или ацетилирование А-, В-, D- или Е-сахаров, а также алкилирование по положению С-7 агликона.

Первый тетрациклический предшественник, 4-деметилпремитрамицинон (4-DMPC), образуется при действии ароматазы (на примере синтеза митрамицина, рис. 4) *mtmQ* для первых двух колец митрамицина и циклазы *mtmY* для 3-го кольца из линейного декакетиды, после чего под действием циклазы *mtmX* завершается образование 4-го кольца. При действии метилтрансферазы *mtmMI* происходит метилирование гидроксильной группы по положению 4 с образованием премитрамицинона (PMC) – это решающий шаг для последующего синтеза [64]. Тетрациклический премитрамицинон – общий предшественник всех антибиотиков этой группы.

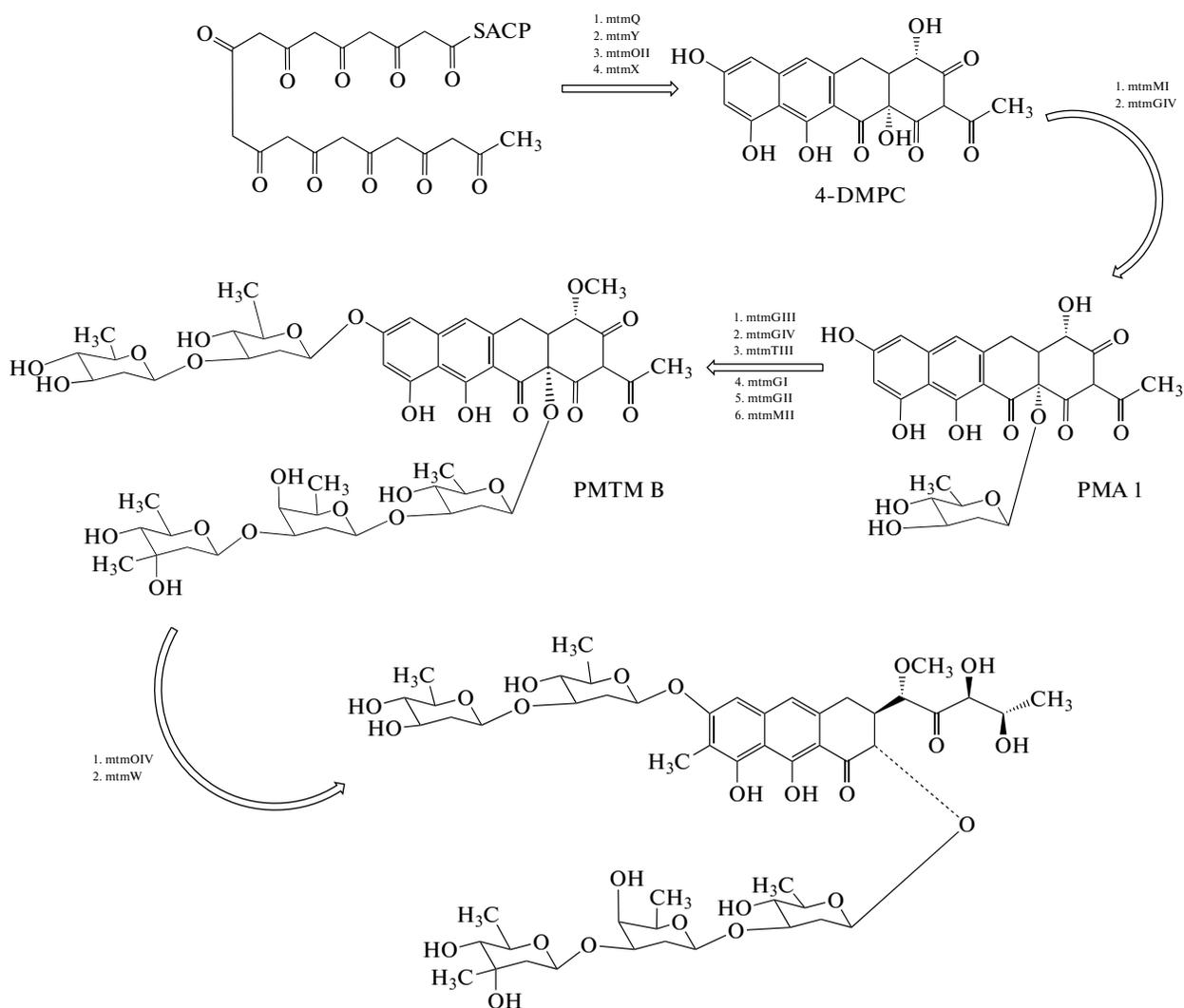


Рис. 4. Основные этапы биосинтеза митрамицина.

Для первого этапа гликозирования тетрациклического интермедиата необходима D-оливоза, а ее предшественник 4-кето-2,6-дидезоксид-оливоза – промежуточное звено в синтезе всех остальных мономеров олигосахаридных цепей агликона. Гликозирование РМС начинается с присоединения первой молекулы D-оливозы, общей для всех антибиотиков группы АК, к гидроксильной группе при положении С-12а агликона. К образованному премитрамицину А1 (PMA1) соответствующие гликозилтрансферазы присоединяют второй сахар D-оливозу (хромомицин А3, оливомицин А) или D-олиозу (митрамицин, UCH9). Синтез трисахаридной цепи завершается присоединением 4-кето-D-микозы (для митрамицина) с последующим восстановлением кеторедуктазой *mtmTIII*, или L-хромозы (для хромомицина). E-сахар у оливомицина А представлен 4-O-изобутирил-L-оливомикозой. Трисахарид-

ная цепь может также содержать 4-O-ацетильные формы оливозы и олиозы (дурамицин, UCH9). Гликозирование по положению С-6 агликона происходит по схожему механизму с последовательным присоединением сахаров. Чаще всего это дисахаридная цепь, содержащая D-оливозу, D-олиозу или их 4-O-ацетильные или метильные производные.

Важный этап синтеза антибиотиков группы АК – расщепление 4-го кольца агликона. В отсутствие этой модификации образуется премитрамицин В, который не проявляет биологической активности на опухолевых клетках [34]. Размыкание цикла происходит под действием монооксигеназы Байера–Виллигера *mtmOIV* через образование лактонного кольца с его последующим декарбоксилированием и восстановлением кетогруппы при 4'-положении боковой пентильной группы агликона [69, 70]. Интересно,

что, хотя действие монооксигеназы, как правило, необходимо для проявления биологической активности, в отдельных случаях оно может не влиять на связывание антибиотика с ДНК. Так, выделенный в результате инактивирующей мутации по гену *cmmGII* тетрациклический прехромомицин АЗ вызывал гибель опухолевых клеток в субмикромольных концентрациях [71].

Помимо перечисленных основных преобразований для антибиотиков группы АК существуют дополнительные модификации: алкилирование по положению С-7 агликона, 4-*O*-метилование и ацетилирование сахарных остатков. Такие модификации влияют на биологическую активность соединений и используются при поиске новых аналогов. Нужно заметить, что отдельные реакции, помимо придания биологической активности соединению, могут также защищать клетки продуцента от воздействия антибиотика. Например, ацетилирование А- и Е-сахара хромомицина АЗ происходит на последних этапах синтеза; мембранная локализация ацетилтрансферазы *cmmA*, по-видимому, играет существенную роль в устойчивости штамма-продуцента к итоговому продукту биосинтеза [72].

#### ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ ГРУППЫ АУРЕОЛОВОЙ КИСЛОТЫ

Хотя антибиотики группы АК в настоящий момент не используются в терапии, они все же нашли практическое применение в медицинских и научных исследованиях. Например, флуоресценция в видимом спектре и аффинность к GC-богатым областям позволяет использовать хромомицин АЗ для карiotипирования [73–75]. Комбинация с АТ-селективными флуорофорами (DAPI, Хехст 33342) дает возможность визуализировать хромосомы и выявлять их структуру, что важно, в частности, для выявления внутриутробных патологий [76]. Окрашивание хромомицином АЗ позволяет определить нарушения конденсации хроматина в сперматозоидах из-за недостаточной протаминизации, что используется в лабораторных исследованиях фертильности [77].

Для применимости производных АК как противоопухолевых агентов один из ключевых вопросов – преодоление общерезорбтивной токсичности. В литературе описаны аналоги митрамицина и хромомицина АЗ, модифицированные по боковой цепи агликона (SK и SDK) и полученные в результате комбинаторного биосинтеза. Схожее направление (модификация боковой пентильной цепи) было выбрано и для оливомицина А. Поиск основывался на знании механизмов взаимодействия оливомицина А с мишенью – малой бороздкой ДНК. Цель создания нового производного – несколько ослабить связывание с ДНК,

сохраняя противоопухолевые свойства. Действительно, у нового производного, оливамида, приемлемое соотношение токсической и эффективной дозы (терапевтическое окно) и улучшенная переносимость *in vivo* (см. выше), что позволяет рассуждать о его возможном клиническом применении и о векторе дальнейших модификаций структуры. Получение менее токсичных аналогов с сохранением их биологической эффективности служит прекрасным примером того, насколько подобный рациональный подход к мишень-направленному дизайну противоопухолевых препаратов (в том числе на основе АК) оказывается важен в практическом отношении.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Открытый в 1960-х гг. класс антибиотиков-производных АК проявляет разносторонние свойства – антибактериальные, противоопухолевые и противовирусные. В настоящее время детально изучен биосинтез основных представителей класса – митрамицина и хромомицина АЗ. Многолетние исследования биосинтеза производных АК обосновали рациональный поиск оптимизированных аналогов митрамицина, хромомицина АЗ и оливомицина А, основанный на знании механизмов биологического действия. Наиболее активные производные с модифицированной боковой цепью агликона выделены из продуцентов, полученных в результате инактивирующих мутаций генов кеторедуктазы. У таких производных повышена специфичность к внутриклеточным мишеням – GC-богатым областям в малой бороздке ДНК, снижена общерезорбтивная токсичность. Таким образом, имеются возможности направленной модификации структуры АК для получения производных с улучшенным терапевтическим индексом. Описаны первые оптимизированные соединения для клеток млекопитающих.

Молекулярные механизмы действия антибиотиков группы АК определяются образованием стабильных комплексов с мишенью, следовательно, ведущий механизм – множественные (genome wide) нарушения матричных процессов, главным образом, транскрипции. Это может происходить вследствие эпигенетической регуляции структуры хроматина, подавления экспрессии генов, кодирующих ТФ, а также из-за нарушений конформации ДНК, препятствующих связыванию ТФ и/или функционированию РНК-полимеразы II.

Установление механизмов действия на отдельные гены позволит использовать производные АК для исследований в фундаментальной биологии. Детальное изучение свойств антибиотиков этой группы перспективно для разработки противоопухолевых средств и, возможно, нейропротекторов.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-34-90064).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Турсунова Н.В., Чуринов Б.В., Клиникова М.Г.* // Современные проблемы науки и образования. 2018. Т. 5. С. 1–12.  
<https://doi.org/10.17513/spno.28056>
2. *Vardanyan R., Hruby V.* // In: Synthesis of Best-Seller Drugs. Academic Press, 2016. P. 495–574.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-411492-0.00028-6>
3. *Martins-Teixeira M., Carvalho I.* // Chem. Med. Chem. 2020. V. 15. P. 933–948.  
<https://doi.org/10.1002/cmde.202000131>
4. *Effertth T., Oesch F.* // Semin. Cancer Biol. 2019. V. 26. P. 143–163.  
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.12.010>
5. *Тренин А.С.* // Антибиотики и химиотерапия. 2015. Т. 60. С. 34–46.
6. *Grundy E., Goldstein W., Rickher J., Hanes M.E., Warren H.B., Sylvester J.C.* // Antibiot. Chemother. (Northfield). 1953. V. 3. P. 1215–1217.
7. *Berlin Y., Kiseleva O., Kolosov M., Shemyakin M.M., Soifer V.S., Vasina I., Yartseva I.V., Kuznetsov V.D.* // Nature. 1968. V. 218. P. 193–194.  
<https://doi.org/10.1038/218193a0>
8. *Куц А.А., Федосеева Г.Е., Киселева О.А., Зеленин А.В.* // Антибиотики. 1972. Т. 17. С. 504–513.
9. *Gause G., Ucholina R., Sveshnikova M.* // Antibiotiki. 1962. V. 7. P. 34–38.
10. *Rao K., Cullen W., Sobin B.* // Antibiot. Chemother. (Northfield). 1962. V. 12. P. 182–186.
11. *Kaziwara K., Watanabe J., Komeda T., Usui T.* // Ann. Rep. Takeda Research Laboratory. 1960. V. 19. P. 68.
12. *Gause G.* // In: Antineoplastic and Immunosuppressive Agents / Ed. Sartorelli A.C. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1975. P. 615–622.
13. *Hotter D., Bosso M., Jonsson K.L., Krapp C., Stürzel C.M., Das A., Littwitz-Salomon E., Berkhout B., Russ A., Wittmann S., Gramberg T., Zheng Y., Martins L.J., Planelles V., Jakobsen M.R., Hahn B.H., Dittmer U., Sauter D., Kirchhoff F.* // Cell Host Microbe. 2019. V. 25. P. 858–872.E13.  
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.05.002>
14. *Tevyashova A.N., Olsufyeva E.N., Turchin K.F., Balzarini J., Bykov E.E., Dezhenkova L.G., Shtil A.A., Preobrazhenskaya M.N.* // Bioorg. Med. Chem. 2009. V. 17. P. 4961–4967.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.05.076>
15. *Bianchi N., Rutigliano C., Passadore M., Tomassetti M., Pippo L., Mischiati C., Feriotto G., Gambari R.* // Biochem. J. 1997. V. 326. P. 919–927.  
<https://doi.org/10.1042/bj3260919>
16. *Kennedy B., Torkelson J.* // Med. Pediatr. Oncol. 1995. V. 24. P. 327–328.  
<https://doi.org/10.1002/mpo.2950240511>
17. *Zozer N., Keck A., Pecherstorfer M.* // Drug Safety. 1999. V. 21. P. 389–406.  
<https://doi.org/10.2165/00002018-199921050-00004>
18. *Perlia C.P., Gubisch N.J., Wolter J., Edelberg D., Dederick M.M., Taylor S.G.* // Cancer. 1970. V. 25. P. 389–394.  
[https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197002\)25:2<389::aid-cnrcr2820250217>3.0.co;2-x](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197002)25:2<389::aid-cnrcr2820250217>3.0.co;2-x)
19. *Condon J.R., Reith S.B., Nassim J.R., Millard F.J., Hilb A., Stainthorpe E.M.* // British Med. J. 1971. V. 1. P. 421–423.
20. *Ogawa M.* // Appl. Cancer Chemotherapy. 1978. V. 24. P. 149–159.  
<https://doi.org/10.1159/000401511>
21. *Новикова И., Савинова В.* // Вестник АМН СССР. 1968. Т. 6. С. 53–57.
22. *Sissung T.M., Huang P.A., Hauke R.J., McCrea E.M., Peer C.J., Barbier R.H., Strobe J.D., Ley A.M., Zhang M., Hong J.A., Venzon D., Jackson J.P., Brouwer K.R., Grohar P., Glod J., Widemann B.C., Heller T., Schrupp D.S., Figg W.D.* // Mol. Pharmacol. 2019. V. 96. P. 158–167.  
<https://doi.org/10.1124/mol.118.114827>
23. *Antequera F.* // CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 2003. V. 60. P. 1647–1658.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-003-3088-6>
24. *Ray R., Snyder R., Thomas S., Koller C.A., Miller D.M.* // J. Clin. Invest. 1989. V. 83. P. 2003–2007.  
<https://doi.org/10.1172/jci114110>
25. *Blume S., Snyder R., Ray R., Koller C.A., Miller D.M.* // J. Clin. Invest. 1991. V. 88. P. 1613–1621.  
<https://doi.org/10.1172/jci115474>
26. *Lambert M., Jambon S., Depauw S., David-Cordonnier M.* // Molecules. 2018. V. 23. P. 1479.  
<https://doi.org/10.3390/molecules23061479>
27. *Hou M.* // Nucleic Acids Res. 2004. V. 32. P. 2214–2222.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh549>
28. *Beniaminov A.D., Chashchina G.V., Livshits M.A., Kechko O.I., Mitkevich V.A., Mamaeva O.K., Tevyashova A.N., Shtil A.A., Shchyolkina A.K., Kaluzhny D.N.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 5299.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21115299>
29. *Carpenter L., Marks N., Fox R.* // Eur. J. Biochem. 1993. V. 215. P. 561–566.  
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18066.x>
30. *Cawley S., Bekiranov S., Ng H.H., Kapranov P., Sekinger E.A., Kampa D., Piccolboni A., Sementchenko V., Cheng J., Williams A.J., Wheeler R., Wong B., Drenkow J., Yamanaka M., Patel S., Brubaker S., Tammana H., Helt G., Struhl K., Gingeras T.R.* // Cell. 2004.

- V. 116. P. 499–509.  
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00127-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00127-8)
31. *Beishline K., Azizkhan-Clifford J.* // FEBS J. 2015. V. 282. P. 224–258.  
<https://doi.org/10.1111/febs.13148>
  32. *Jiang N.Y., Woda B.A., Banner B.F., Whalen G.F., Dresser K.A., Lu D.* // Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. 2008. V. 17. P. 1648–1652.  
<https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-07-2791>
  33. *Wang L., Wei D., Huang S., Peng Z., Le X., Wu T.T., Yao J., Ajani J., Xie K.* // Clin. Cancer Res. 2003. V. 9. P. 6371–6380.
  34. *Remsing L., Bahadori H., Carbone G., McGuffie E.M., Catapano C.V., Rohr J.* // Biochemistry. 2003. V. 42. P. 8313–8324.  
<https://doi.org/10.1021/bi034091z>
  35. *Ritchie S., Boyd F., Wong J., Bonham K.* // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 847–854.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.275.2.847>
  36. *Albertini V.* // Nucleic Acids Res. 2006. V. 34. P. 1721–1734.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkl063>
  37. *Durandin N., Vinogradov A., Shtil A., Kuzmin V.* // FEBS J. 2013. V. 280. P. 86–87.
  38. *Grohar P.J., Woldemichael G.M., Griffin L.B., Mendoza A., Chen Q.R., Yeung C., Currier D.G., Davis S., Khanna C., Khan J., McMahon J.B., Helman L.J.* // JNCI: J. Nat. Cancer Inst. 2011. V. 103. P. 962–978.  
<https://doi.org/10.1093/jnci/djr156>
  39. *Guillon N., Tirode F., Boeva V., Zynovyev A., Barillot E., Delattre O.* // PLoS One. 2009. V. 4. P. 4932.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004932>
  40. *Flores G., Everett J.H., Boguslawski E.A., Oswald B.M., Madaj Z.B., Beddows I., Dikalov S., Adams M., Klumpp-Thomas C.A., Kitchen-Goosen S.M., Martin S.E., Caplen N.J., Helman L.J., Grohar P.J.* // Mol. Cancer Ther. 2020. V. 19. P. 1183–1196.  
<https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-19-0775>
  41. *Hou M., Lu W., Lin H., Yuann J.* // Biochemistry. 2008. V. 47. P. 5493–5502.  
<https://doi.org/10.1021/bi701915f>
  42. *Tevyashov A.N., Olsufyeva E.N., Balzarini J., Shtil A.A., Dezhenskova L.G., Bukhman V.M., Zbarsky V.B., Preobrazhenskaya M.N.* // J. Antibiot. 2009. V. 62. P. 37–41.  
<https://doi.org/10.1038/ja.2008.7>
  43. *Isagulieva A., Beniaminov V., Tatarskiy V., Soshnikova N.V., Tevyashova A.N., Kaluzhny D.N., Shtil A.A.* // FEBS Open Bio. 2019. V. 9. P. 65–431.  
<https://doi.org/10.1002/2211-5463.12675>
  44. *Sleiman S.F., Langley B.C., Basso M., Berlin J., Xia L., Payappilly J.B., Kharel M.K., Guo H., Marsh J.L., Thompson L.M., Mahishi L., Ahuja P., MacLellan W.R., Geschwind D.H., Coppola G., Rohr J., Ratan R.R.* // J. Neurosci. 2011. V. 31. P. 6858–6870.  
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.0710-11.2011>
  45. *Choi E.S., Nam J.S., Jung J.Y., Cho N.P., Cho S.D.* // Sci. Rep. 2014. V. 4. P. 1–8.  
<https://doi.org/10.1038/srep07162>
  46. *Tominaga T., Tsuchiya T., Mochinaga K., Arai J., Yamasaki N., Matsumoto K., Miyazaki T., Nagasaki T., Nana-shima A., Tsukamoto K., Nagayasu T.* // BMC Cancer. 2016. V. 16. P. 1–9.  
<https://doi.org/10.1186/s12885-016-2392-0>
  47. *Fernández-Guizán A., López-Soto A., Acebes-Huerta A., Huergo-Zapico L., Villa-Álvarez M., Núñez L.E., Morís F., González S.* // PLoS One. 2015. V. 10. P. 1–19.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140786>
  48. *Otjacques E., Binsfeld M., Rocks N., Blacher S., Vanderkerken K., Noel A., Beguin Y., Cataldo D., Caers J.* // PLoS One. 2013. V. 8. P. 1–11.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062818>
  49. *Lin R., Hsu C., Wang Y.* // Anticancer Drugs. 2007. V. 18. P. 1157–1164.  
<https://doi.org/10.1097/cad.0b013e3282a215e9>
  50. *Kishikaw, S., Murata T., Kimura H., Shiota K., Yokoyama K.K.* // Eur. J. Biochem. 2002. V. 269. P. 2961–2970.  
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02972.x>
  51. *Federico A., Steinfass T., Larribère L., Novak D., Morís F., Núñez L.E., Umansky V., Utikal J.* // Mol. Therapy. Oncolytics. 2020. V. 18. P. 83–99.  
<https://doi.org/10.1016/j.omto.2020.06.001>
  52. *Сергеев А.Л., Тевяшова А.Н., Воробьев А.П., Громова Е.С.* // Биохимия. 2019. Т. 84. С. 229–239. [Sergeev A., Tevyashova A., Vorobyov A., Gromova E.] // Biochemistry (Moscow). 2019. V. 84. P. 62–70.]  
<https://doi.org/10.1134/s0006297919010085>
  53. *Ferrante R.* // J. Neurosci. 2004. V. 24. P. 10335–10342.  
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.2599-04.2004>
  54. *Stack E.C., Del Signore S.J., Luthi-Carter R., Soh B.Y., Goldstein D.R., Matson S., Goodrich S., Markey A.L., Cormier K., Hagerty S.W., Smith K., Ryu H., Ferrante R.J.* // Hum. Mol. Genet. 2007. V. 16. P. 1164–1175.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddm064>
  55. *Osada N., Kosuge Y., Ishige K., Ito Y.* // J. Pharmacol. Sci. 2013. V. 122. P. 251–256.  
<https://doi.org/10.1254/jphs.13r02cp>
  56. *Chatterjee S., Zaman K., Ryu H., Conforto A., Ratan R.R.* // Ann. Neurol. 2001. V. 49. P. 345–354.  
<https://doi.org/10.1002/ana.71>
  57. *Sastry M., Patel D.* // Biochemistry. 1993. V. 32. P. 6588–6604.  
<https://doi.org/10.1021/bi00077a012>
  58. *Andreeva E., Vinogradov A., Tevyashova A., Olsufyeva E.N., Burova T., Grinberg N.V., Grinberg V., Skuridin S., Preobrazhenskaya M., Shtil A., Kuzmin V.* // Dokl. Biochem. Biophys. 2010. V. 435. P. 334–338.  
<https://doi.org/10.1134/s1607672910060141>
  59. *Menéndez N., Nur-E-Alam M., Braña A.F., Rohr J., Salas J.A., Méndez C.* // Mol. Microbiol. 2004. V. 53. P. 903–915.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04166.x>
  60. *Chakrabarti S.* // Indian J. Biochem. Biophys. 2001. V. 38. P. 64–70.
  61. *Tevyashova A.N., Durandin N.A., Vinogradov A.M., Zbarsky V.B., Reznikova M.I., Dezhenskova L.G., Bykov E.E., Olsufyeva E.N., Kuzmin V.A., Shtil A.A., Preobrazhenskaya M.N.* // J. Antibiot. 2013. V. 66. P. 523–530.  
<https://doi.org/10.1038/ja.2013.39>

62. Behr W., Honikel K., Hartmann G. // Eur. J. Biochem. 1969. V. 9. P. 82–92.  
https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1969.tb00579.x
63. Hayasaka T., Inoue Y. // Biochemistry. 1969. V. 8. P. 2342–2347.  
https://doi.org/10.1021/bi00834a014
64. Lozano M.J., Remsing L.L., Quirós L.M., Braña A.F., Fernández E., Sánchez C., Méndez C., Rohr J., Salas J.A. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 3065–3074.  
https://doi.org/10.1074/jbc.275.5.3065
65. Rodríguez D., Quirós L., Salas J. // J. Biol. Chem. 2003. V. 279. P. 8149–8158.  
https://doi.org/10.1074/jbc.m312351200
66. Remsing L.L., González A.M., Nur-e-Alam M., Fernández-Lozano M.J., Braña A.F., Rix U., Oliveira M.A., Méndez C., Salas J.A., Rohr J. // J. Am. Chem. Soc. 2003. V. 125. P. 5745–5753.  
https://doi.org/10.1021/ja034162h
67. Menéndez N., Nur-e-Alam M., Braña A. F., Rohr J., Salas J. A., Méndez C. // Chem. Biol. 2004. V. 11. P. 21–32.  
https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2003.12.011
68. Tevyashova A.N., Shtil A.A., Olsufyeva E.N., Luzikov Y.N., Reznikova M.I., Dezhenkova L.G., Isakova E.B., Bukhman V.M., Durandin N.A., Vinogradov A.M., Kuzmin V.A., Preobrazhenskaya M.N. // Bioorg. Med. Chem. 2011. V. 19. P. 7387–7393.  
https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.10.055
69. Gibson M., Nur-e-alam M., Lipata F., Oliveira M.A., Rohr J. // J. Am. Chem. Soc. 2005. V. 127. P. 17594–17595.  
https://doi.org/10.1021/ja055750t
70. Beam M.P., Bosserman M.A., Noinaj N., Wehenkel M., Rohr J. // Biochemistry. 2009. V. 48. P. 4476–4487.  
https://doi.org/10.1021/bi8023509
71. Menéndez N., Nur-e-Alam M., Fischer C., Braña A.F., Salas J.A., Rohr J., Méndez C. // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 167–177.  
https://doi.org/10.1128/aem.72.1.167-177.2006
72. García B., González-Sabín J., Menéndez N., Braña A.F., Núñez L.E., Morís F., Salas J.A., Méndez C. // Microb. Biotechnol. 2010. V. 4. P. 226–238.  
https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00229.x
73. Ng B.L., Fu B., Graham J., Hall C., Thompson S. // Cytometry. Part A. 2018. V. 95. P. 323–331.  
https://doi.org/10.1002/cyto.a.23692
74. Arndt-Jovin D., Jovin T. // Cytometry. 1990. V. 11. P. 80–93.  
https://doi.org/10.1002/cyto.990110110
75. Schweizer D. // Chromosoma. 1976. V. 58. P. 307–324.  
https://doi.org/10.1007/bf00292840
76. Gray J.W., Trask B., van den Engh G., Silva A., Lozes C., Grell S., Schonberg S., Yu L.C., Golbus M.S. // Am. J. Hum. Genet. 1998. V. 42. P. 49–59.
77. Iranpour F., Nasr-Esfahani M., Valojerdi M., Taki Altaraihi T. // J. Assist. Reprod. Genet. 2000. V. 17. P. 60–66.  
https://doi.org/10.1023/a:1009406231811

## The Aureolic Acid Antibiotics: Perspectives of a Biologically Active Class

A. K. Isagulieva\*, \*\*, #, A. N. Tevyashova\*, \*\*\*, and A. A. Shtil\*\*\*\*

#Phone: +7 (916) 059-17-57; e-mail: kia2303@ya.ru

\*Federal State Budgetary Scientific Institution Gause Institute of New Antibiotics,  
ul. Bol'shaya Pirogovskaya 11/1, Moscow, 119021 Russia

\*\*Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 34/5, Moscow, 119334 Russia

\*\*\*Mendeleev University of Chemical Technology (Technical University), Miusskaya pl. 9, Moscow, 125047 Russia

\*\*\*\*N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation,  
Kashirskoe shosse 23, Moscow, 115478 Russia

The aureolic acid derived antibiotics such as mithramycin, chromomycin A3 and olivomycin A are the aromatic glycosylated polyketides produced by actinomycetes. The structure of aureolic acid is represented by the tricyclic aglycon conjugated with two oligosaccharide chains, and a pentyl side chain in the C3 position. Dissection of microbial biosynthesis identified the role of individual enzymes and synthetic steps in the biological properties of mithramycin and chromomycin A3. Currently this class is under investigation in search for novel clinically applicable compounds. This review addresses basic knowledge and recent advances in the class of aureolic acid antibiotics. In particular, we analyze modern approaches to chemical and semi-synthetic modifications, SAR studies, as well as molecular mechanisms of cytotoxicity and targeted drug design methodologies from the perspective of aureolic acid as potent antitumor antibiotics.

**Keywords:** antibiotics, mithramycin, olivomycin A, chromomycin A3, mechanism of action, biosynthesis, DNA ligands



УДК 602.68:578.23

## МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ТЕРАПИИ И ПРОФИЛАКТИКИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

© 2022 г. Ю. А. Меркульева\*, #, Д. Н. Щербаков\*, А. А. Ильичев\*

\*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора, Центр геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий, Россия, 630559 Новосибирская обл., Кольцово

Поступила в редакцию 18.05.2021 г.

После доработки 07.06.2021 г.

Принята к публикации 17.06.2021 г.

Вирусная угроза может возникнуть неожиданно и где угодно, быстро перейти в стадию эпидемии или пандемии, и тогда потребуются в короткие сроки разработать эффективные средства терапии и профилактики. Разработка вакцины занимает десятилетия, а применение противовирусных соединений часто малоэффективно и небезопасно. Быстрым ответом может быть использование иммунных сывороток переболевших лиц, однако ряд сложностей, связанных с их использованием, заставил исследователей переключиться на разработку более безопасных и эффективных препаратов на основе моноклональных антител (мАТ). Для того чтобы обеспечить защиту, подобные препараты должны обладать ключевой характеристикой – нейтрализующими свойствами, т.е. способностью блокировать заражение клеток вирусом. В настоящее время в арсенале исследователей имеется ряд подходов для получения мАТ, однако ни один из них нельзя назвать эталоном, каждый подход имеет собственные достоинства и недостатки. Выбор того или иного метода зависит как от особенностей вируса, так и от временных и технических ограничений. В предлагаемом обзоре проведен сравнительный анализ современных методов получения нейтрализующих мАТ, описаны актуальные тенденции дизайна антител для терапии и профилактики вирусных заболеваний.

*Ключевые слова:* моноклональные антитела, вирусные инфекции, гибридная технология, дисплейные методы, сортировка В-клеток

DOI: 10.31857/S0132342322020166

### СОДЕРЖАНИЕ

МЕХАНИЗМЫ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ВИРУСНЫХ ПАТОГЕНОВ АНТИТЕЛАМИ.....280

ИСТОЧНИК МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ.....282

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИТЕЛ.....283

*Дисплейные методы*.....285

*Сортировка единичных В-клеток и клонирование генов VH/VL*.....287  
*Иммортализация В-клеток*.....287  
*Культуры одиночных В-клеток*.....288  
*Новое поколение методов: высокопроизводительное секвенирование, протеомика и вычислительные технологии*.....289  
МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДИЗАЙН АНТИТЕЛ.....290  
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....292  
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....292

### ВВЕДЕНИЕ

Более века назад сыворотки крови человека и животных начали использовать для терапии и профилактики инфекционных заболеваний. Несмотря на успехи серотерапии, надежды на “волшебную пулю” оправдали себя не полностью. Так, сыворотки часто обладали слабой эффективностью, поскольку кроме специфических антител содержали большое количество неспецифических иммуноглобулинов и других белков, приводящих

Сокращения: ADCC – антителозависимая клеточная цитотоксичность; ADCP – антителозависимый клеточный фагоцитоз; ADCVI – антителозависимое клеточно-опосредованное вирусное ингибирование; APR – области, склонные к агрегации; FACS – сортировка флуоресцентно-активированных клеток; CDC – комплемент-зависимая цитотоксичность; Ig – иммуноглобулин; IL – интерлейкин; VL – переменный домен легкой цепи иммуноглобулина; VH – переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина; ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; мАТ – моноклональные антитела; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; оцАТ – одноцепочечные антитела.

# Автор для связи: (тел.: +7 (923) 777-15-86; эл. почта: j.a.merkulyeva@gmail.com).

к нежелательным эффектам в виде анафилактического шока или сывороточной болезни.

С появлением вакцин и антибиотиков серотерапия существенно сдала свои позиции. Спустя десятилетия антитела вновь заявили о себе после разработки G. Köhler и С. Milstein гибридной технологии получения моноклональных антител (мАТ) [1]. мАТ представляют собой иммуноглобулины, вырабатываемые клетками одного клона и связывающиеся с конкретным эпитопом целевого антигена. Использование мАТ исключало недостатки серотерапии, однако первые мАТ были получены из клеток мышей и потому часто вызвали иммунную реакцию при введении человеку. Позже благодаря развитию методов генной инженерии появилась возможность получать гуманизированные (химерные) мАТ [2]. Это в существенной степени снимало проблему нежелательного иммунного ответа.

Впоследствии новые технологии открыли возможность для получения мАТ человека, а также позволили менять биологические и физико-химические свойства антител и получать их варианты, которые не способна вырабатывать иммунная система.

Текущие активные разработки в области мАТ в существенной степени направлены на лечение онкологических заболеваний. В то же время вирусные заболевания, для которых нет доступных вакцин (например, ВИЧ-инфекция, лихорадка Ласса и Зика), заболевания, для которых эффективность противовирусных препаратов недостаточно выражена (COVID-19, грипп, бешенство и ряд других), также выступают объектом внимания многих ученых во всем мире [3].

На сегодняшний день ВОЗ и FDA одобрили к применению шесть препаратов на основе противовирусных мАТ (табл. 1). Несмотря на то, что первым одобренным мАТ был Palivizumab против респираторно-синцитиального вируса [4], все последующие разработки были сосредоточены на неинфекционных заболеваниях. Ежегодно десятки и сотни препаратов антител получали одобрение, но ни одного противовирусного мАТ одобрено не было. Однако в 2018 г. противовирусные антитела вновь заявили о себе. Впервые после долгого перерыва одобрен противовирусный препарат мАТ для лечения ВИЧ-инфекции, а в 2020 г. — сразу два препарата мАТ против вируса Эболы [5–8]. В 2020 г. FDA были одобрены мАТ Bamlanivimab и коктейль антител REGEN-COV для экстренного использования против новой коронавирусной инфекции COVID-19. Позже при расширенном исследовании было показано, что Bamlanivimab непригоден в качестве монотерапии (отмена разрешения FDA в апреле 2021 г.), но эффективен при совместном введении с Etesevimab [9–12]. Появление препаратов мАТ против SARS-CoV-2 стало опытом быстрой и эффективной разработки мАТ в условиях экстренной угрозы и напоминанием об эффективности терапии

мАТ для лечения и профилактики вирусных инфекций.

## МЕХАНИЗМЫ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ВИРУСНЫХ ПАТОГЕНОВ АНТИТЕЛАМИ

Антитела (иммуноглобулины, Ig) представляют собой гликопротеины, которые обладают антиген-связывающей активностью, а также рядом эффекторных функций: способностью активировать систему комплемента, взаимодействовать с различными типами клеток, усиливать фагоцитоз. Антитела продуцируются плазматическими клетками в ответ на попадание в организм антигена и присутствуют в виде мембраносвязанных рецепторов на поверхности В-лимфоцитов и свободных антител в сыворотке крови [13].

Нейтрализующими принято считать антитела, которые блокируют вирус на этапах, предшествующих транскрипции и трансляции вирусной нуклеиновой кислоты, и тем самым снижают его инфекционность [14]. Для защиты организма от вирусных инфекций этого может быть достаточно, однако в ряде случаев антитела действуют совместно с клеточным иммунитетом.

При нейтрализации оболочечных вирусов антитела блокируют прикрепление или проникновение вируса в клетку-мишень (рис. 1). Антитела могут связываться с поверхностными белками вируса и тем самым блокировать прикрепление к клетке-мишени (1) или вмешиваться в уже установившийся контакт белков вируса и клетки (2). Если адсорбция уже произошла, антитела могут помешать проникновению, связываясь с фьюзогенными белками вируса (3). После проникновения вируса в эндосому антитела могут блокировать слияние с везикулярной мембраной — такой эффект возможен и для суперкапсидных, и для лишенных капсида вирусов (4). В случае безоболочечных вирусов антитела могут связываться после прикрепления вируса и мешать экстракции вирусного генома (5) [14, 15].

Недавно был открыт еще один механизм нейтрализации, который реализуется после проникновения вируса в клетку. В цитозоле клеток обнаружен белок TRIM21 — внутриклеточный рецептор убиквитинлигазы и антител, который связывается с IgG с более высокой аффинностью, чем любой другой рецептор в организме человека, быстро рекрутирует комплекс патоген–антитело и направляет его на протеасомную деградацию (6) [16].

Обычно нейтрализующую активность антител измеряют в отсутствие комплемента, однако часто допускают опосредованное комплементом усиление нейтрализации [15]. Следует заметить, что антитела могут блокировать проникновение вируса в клетку и за счет связывания с клеточными рецепторами, в таком случае корректнее ис-

Таблица 1. Препараты мАТ, одобренные для терапии и/или профилактики вирусных инфекций

№	Препарат мАТ (торговое название)	Применение	Мишень	Вариант антитела	Технология	Производитель	Год/Статус
1	Palivizumab (Synagis)	Респираторно-синциальный вирус, профилактика инфекции у младенцев из группы высокого риска	Гликопротеин F	Гуманиз. (IgG1)	Гибридная технология	MedImmune Inc.	Одобен FDA в 1998 г. [4]
2	Ibalizumab (Trodatzo)	ВИЧ-1, лечение инфекции у взрослых при множественной лекарственной устойчивости ВИЧ-1	Рецептор CD4	Гуманиз. (IgG4)	Гибридная технология	TaiMed Biologics Inc., Theratechnologies Inc.	Одобен FDA в 2018 г. [5]
3	Ansuvimab (Ebanga)	Эболавирус Заир, лечение инфекции у взрослых и детей	Гликопротеин (GP)	Чел. (IgG1)	Иммортализация В-клеток вирусом Эпштейна-Барр	Ridgeback Biotherapeutics	Одобен FDA в 2020 г. [6, 7]
4	Atoltivimab, Maffivimab и Odesivimab-ebgn (Inmazeb)	Эболавирус Заир, лечение инфекции у взрослых и детей	Гликопротеин (GP)	Чел. (IgG1)	Гибридная технология (генно-модифицированные мыши)	Regeneron Pharmaceuticals	Одобен FDA в 2020 г. [8]
5	Etesevimab и Bamlanivimab	SARS-CoV-2, лечение инфекции любой степени тяжести	Гликопротеин S (домен RBD)	Чел. (IgG1)	Нет данных	Eli Lilly and Company	Разрешен FDA для экстренного использования в 2021 г. [9, 10]
6	Casirivimab и Imdevimab (REGEN-COV)	SARS-CoV-2, экстренное использование у амбулаторных пациентов из группы риска развития серьезных осложнений	Гликопротеин S (домен RBD)	Чел. (IgG1)	Сортировка единичных В-клеток и ОТ-ПЦР (человек и генно-модифицированные мыши)	Regeneron Pharmaceuticals	Разрешен FDA для экстренного использования в 2021 г. [11, 12]

Примечание: Гуманиз. — гуманизированное антитело, Чел. — антитело человека, RBD — рецептор-связывающий домен.

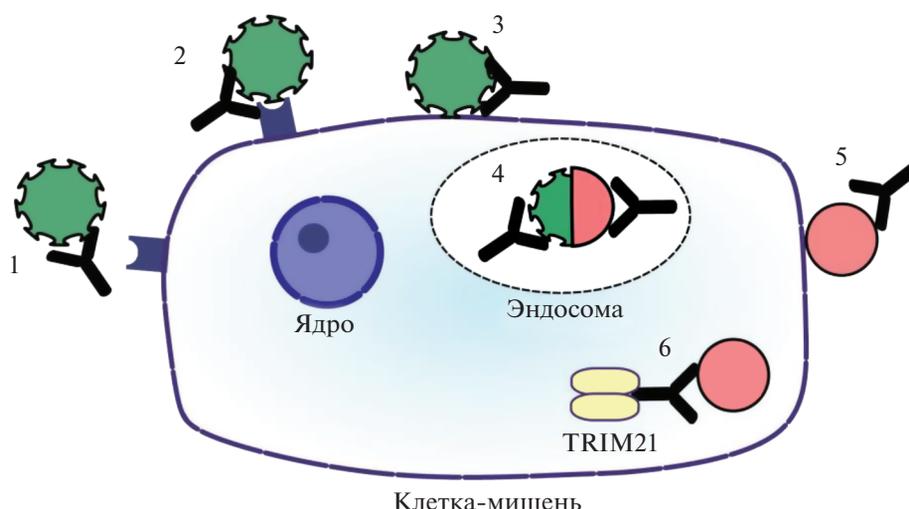


Рис. 1. Механизмы нейтрализации суперкапсидных (1–4) и безоболочечных (4–6) вирусов антителами.

пользовать термин “антитело, блокирующее инфекцию” [14].

Антитела, не обладающие нейтрализующей активностью, также могут препятствовать вирусной репликации, активируя механизмы клеточного иммунитета. Опсонизация вирусных частиц и инфицированных клеток антителами через Fc-рецептор запускает комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) или антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). В результате этих процессов разрушается вирусная оболочка или активируется фагоцитоз зараженных клеток [15, 17, 18]. Антитела также способны препятствовать вирусной инфекции за счет антителозависимого клеточно-опосредованного вирусного ингибирования (ADCVI). ADCVI включает большее количество механизмов и может объединять цитолитическую активность ADCC, фагоцитоз иммунных комплексов и нецитолитические механизмы – секрецию вирус-ингибирующих хемокинов (рис. 2) [19]. Кроме того, появляется все больше свидетельств иммуномодулирующего (вакциноподобного) эффекта препаратов моноклональных антител [20].

В последнее время большое внимание приковано к так называемым “супер-антителам” – антителам, обладающим высокой эффективностью и/или широкой перекрестной реактивностью и способным, вопреки устоявшемуся мнению, быть эффективными не только до и вскоре после заражения, но и воздействовать на текущую инфекцию [21].

#### ИСТОЧНИК МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Разработка препарата мАТ, как правило, состоит из следующих этапов: 1) выделение антите-

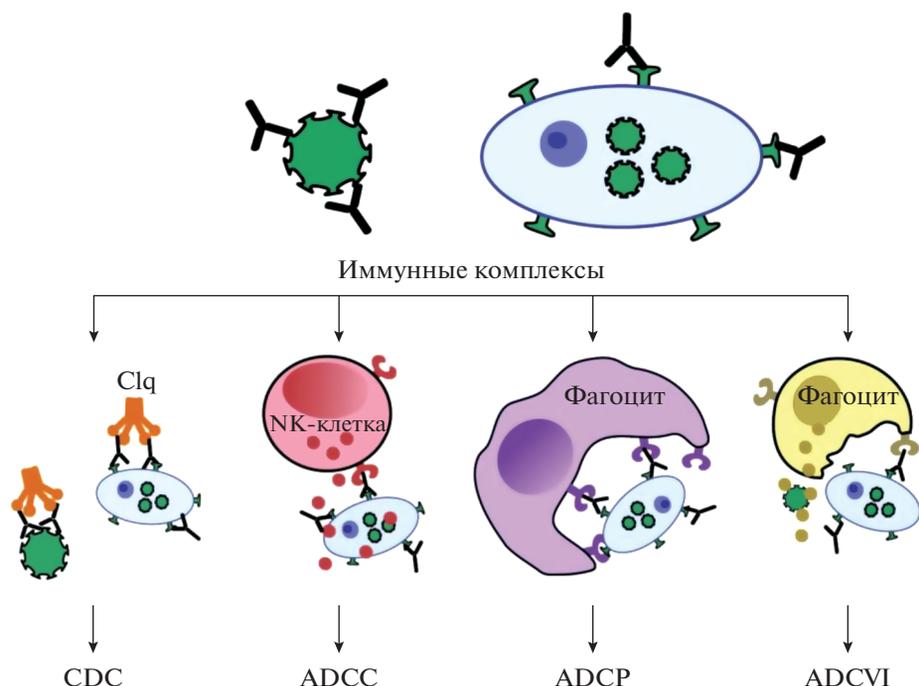
ла с нужными свойствами, 2) инженерия белка для улучшения его целевых свойств, 3) получение продуцентов со стабильной продукцией антител, 4) подбор условий культивирования продуцентов и очистки мАТ.

Противовирусные мАТ получают, как правило, из крови инфицированных или иммунизированных доноров, а также из синтетических библиотек, представляющих собой набор вариативных фрагментов иммуноглобулинов.

Иммунная система донора (человека или животного), инфицированного патогеном, вырабатывает огромное количество антител ко всем возможным эпитопам, к тому же такие антитела проходят созревание в организме, что увеличивает их аффинность и специфичность. В-клетки памяти инфицированных доноров успешно используют для выделения антител. Однако не всегда при заражении вирусом развивается сильный иммунный ответ, и часто необходимо искать более подходящих доноров либо их вовсе нет. В таком случае прибегают к иммунизации донора самим патогеном или его антигенами. Повторные иммунизации позволяют стимулировать вторичный иммунный ответ и получить антитела, обладающие большей аффинностью.

Несмотря на то, что использование иммунных библиотек предпочтительнее, для получения противовирусных мАТ иногда используют наивный репертуар антител, основное преимущество которого – огромное разнообразие антител. Это делает его универсальным источником антител против любого антигена и дает возможность обнаружить антитела против антигенов, которые не вызывают сильный иммунный ответ [22].

В отличие от источников естественных антител, библиотеки синтетических фрагментов антител обладают уникальными преимуществами, включая полный контроль над дизайном библио-



**Рис. 2.** Механизмы ингибирования репликации вирусов ненейтрализующими антителами: CDC – комплемент-зависимая цитотоксичность, ADCP – антителозависимый клеточный фагоцитоз, ADCC – антителозависимая клеточная цитотоксичность, ADCVI – антителозависимое клеточно-опосредованное вирусное ингибирование.

теки и условиями отбора. Технология позволяет генерировать огромное разнообразие антител, которое не может быть выработано иммунной системой донора. Однако такой вариант сопряжен с рисками получения антител, небезопасных для организма и неспособных выполнять свои функции *in vivo*. Несмотря на указанные недостатки, была продемонстрирована возможность применения мАТ, полученных из синтетических библиотек, для борьбы с вирусами и бактериальными токсинами [23].

## МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИТЕЛ

При выборе стратегии выделения антител необходимо учитывать ряд параметров: источник антител, желаемый уровень аффинности и область применения антител, временные и бюджетные ограничения. Каждый метод имеет свои преимущества и недостатки (табл. 2).

Первые мАТ были получены в 1976 г. с помощью гибридной технологии, предложенной G. Köhler и C. Milstein [1]. Данная технология заключается в получении специализированных клеток для продукции мАТ – гибридом. Для этого выделяют В-лимфоциты из селезенки донора и гибридируют с клеточной линией бессмертной миеломы с помощью агента, нарушающего клеточные мембраны, например, полиэтиленгликоля или вируса Сендай (рис. 3).

Далее клетки культивируют *in vitro* в селективной среде, где выживают только гибридные клетки, способные потенциально бесконечно расти и размножаться (как миелома) и синтезировать антитела (как В-лимфоциты). Индивидуальные клоны можно получить, например, методом предельного разведения, затем проводят скрининг индивидуальных клонов на наличие специфической активности антител и отбирают положительные варианты [24]. С помощью гибридной технологии было получено первое противовирусное мАТ – Palivizumab [4].

Преимущество данной технологии заключается в использовании зрелых В-клеток, которые позволяют получить антитела, прошедшие селекцию и аффинное созревание в организме и обладающие естественным спариванием Н-, L-цепей [25]. Такие антитела с большей вероятностью проявляют активность *in vivo*.

Вместе с тем этот подход имеет и ряд недостатков. Так, было показано, что гибридомы в ~32% случаев синтезируют дополнительные Н- и L-цепи иммуноглобулинов, а это значит, что такие антитела не будут моноспецифичными [26].

Недостаток также заключается в трудоемкости технологии и низком выходе гибрида (~0.43% от всех В-клеток), а зависимость процесса от митоза замедляет сроки разработки мАТ [27].

Проблема получения мАТ человека при помощи гибридной технологии заключается в отсутствии подходящей клеточной линии для слия-

Таблица 2. Сравнительная характеристика методов получения антител

№	Метод	Время	Относительная стоимость	Специфичность мАТ	Исходный репертуар антител	Источник антител	Плюсы	Минусы
1	Фатовый дисплей	2–3 недели	Низкая	Низкая	$10^{10} - 10^{13}$ (иммунная система и синтетические библиотеки)	Человек, животные, синтетические библиотеки	Легко доступен ген, кодирующий VH/VL	Нет естественного спаривания VH/VL, ограничения бактериальной системы экспрессии
2	Гибридная технология	6–8 месяцев	Средняя	Средняя	$10^{10} - 10^{11}$ (иммунная система)	Человек и животные	Высокая вероятность работы мАТ <i>in vivo</i>	Часто необходимо гуманизировать, синтезируются дополнительные цепи Ig, низкая выживаемость клонов
3	Культуры одноклеточных В-клеток	2–3 недели	Высокая	Высокая	$10^{10} - 10^{11}$ (иммунная система)	Человек и животные	Прямой функциональный скрининг	Смертность клонов, нет возможности обогатить
4	Иммортализованные В-клетки	2–3 недели	Высокая	Высокая	$10^{10} - 10^{11}$ (иммунная система)	Человек и животные	Прямой функциональный скрининг	Онкогенные вирусы и прочие технические сложности, низкий выход итоговых клонов
5	Сортировка В-клеток	1–2 недели	Высокая	Высокая	$10^{10} - 10^{11}$ (иммунная система)	Человек и животные	Обогащенное разнообразие специфических антител	Необходима разработка антигена

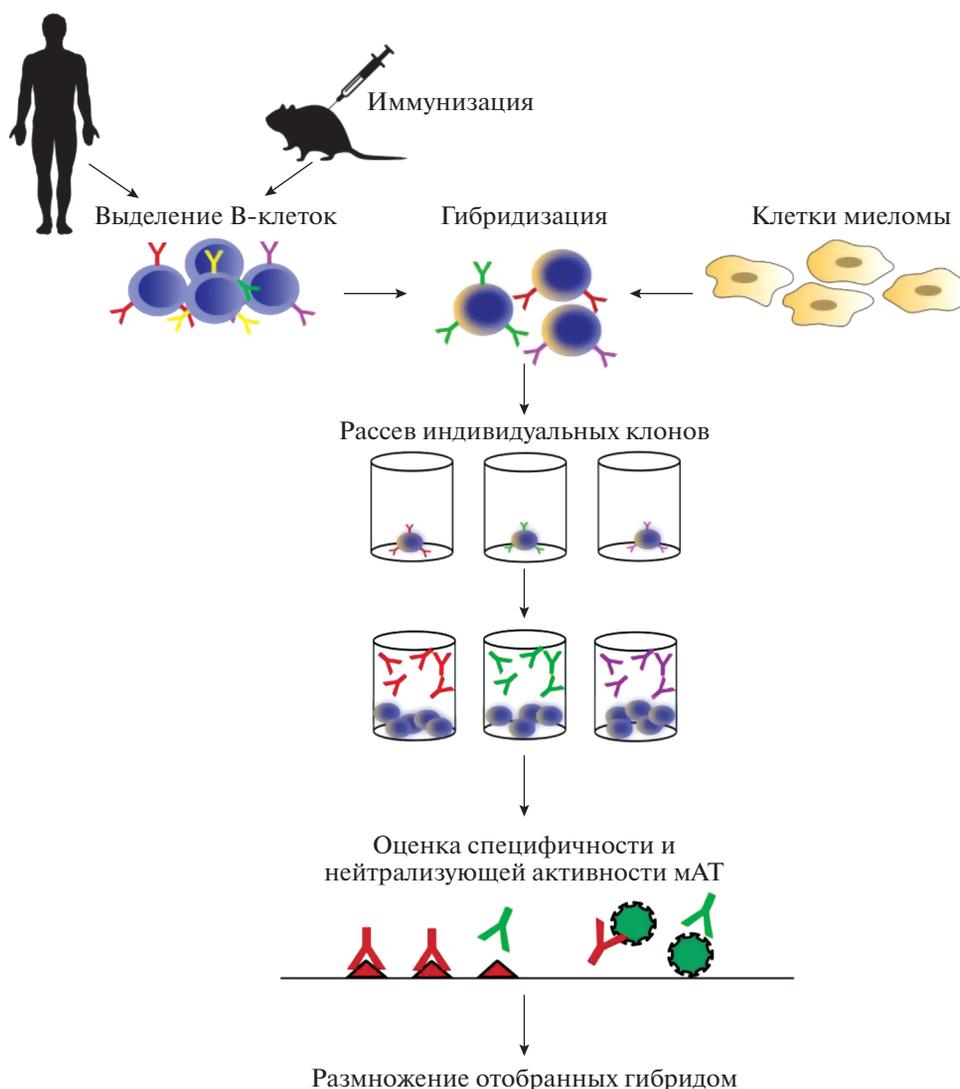


Рис. 3. Схема получения моноклональных антител с помощью гибридомной технологии.

ния с В-клетками. Некоторые группы исследователей получали стабильные гибридомы при слиянии В-клеток человека с несекретирующими гетеромиеломами мыши (например, НММА 2.5 [28]).

Несмотря на существующие недостатки, гибридомная технология с использованием методов генной инженерии остается весьма популярной. Так, с ее помощью был разработан ZMarr – препарат трех моноклональных антител, предназначенный для лечения инфекции, вызванной вирусом Эбола [29].

#### Дисплейные методы

Впервые концепцию пептидного фагового дисплея предложил в 1985 г. G.P. Smith. Подход заключается в получении популяции нитчатых фагов, экспонирующих на своей поверхности исследуемые белки, слитые с капсидным белком РЗ

фаговой частицы. Отбор целевых молекул проводят методом аффинной селекции с использованием специфических лигандов (рис. 4) [30].

Первые антитела с использованием фагового дисплея были получены в 1990-е гг. [31]. Для получения фаговой библиотеки из лимфоцитов донора выделяют мРНК, в реакции обратной транскрипции получают фрагменты кДНК, кодирующие разнообразие VH- и VL-доменов иммуноглобулинов, и встраивают в фагмидный вектор. Такой вектор представляет собой минимальную плазмиду, содержащую ген фагового белка рIII, слитый с нуклеотидной последовательностью фрагмента антитела, фактор резистентности к селективному антибиотику и сайт упаковки генома фага M13. Библиотекой фагмид трансформируют клетки *Escherichia coli*, а затем инфицируют фагом-помощником. Фаг-помощник содержит полный геном M13, кодирующий

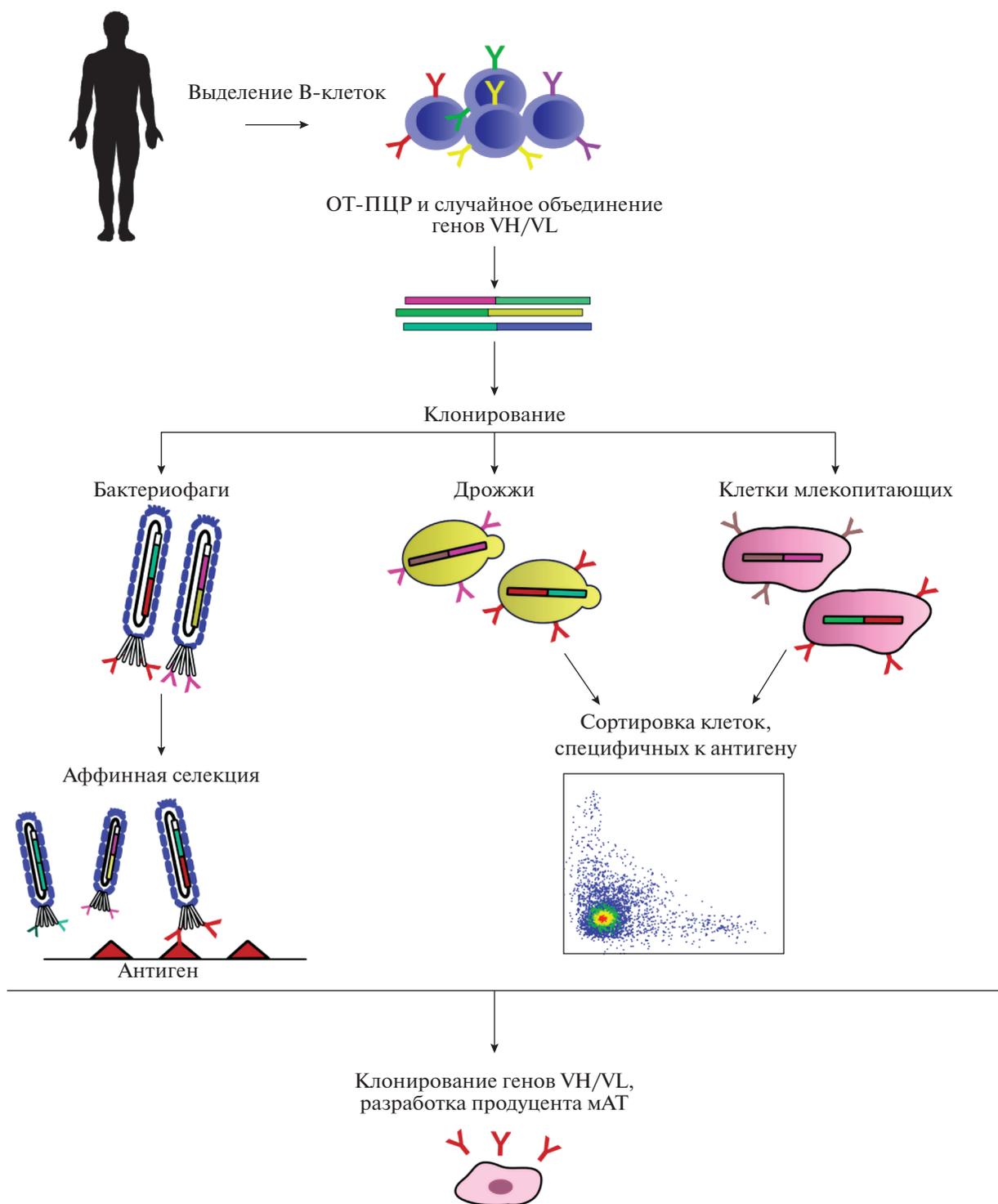


Рис. 4. Дисплейные методы для получения моноклональных антител.

все фаговые белки, но имеет дефектный сигнал упаковки. При сборке новых частиц рПД дикого типа и химерный белок рПД конкурируют за включение в фаг. Таким образом получают огромную коллекцию фаговых частиц с упакованной фагмидной ДНК, несущих (в подавляющем большинстве) только одну копию фрагмента

антитела. Далее проводят аффинную селекцию с использованием целевых антигенов, а отобранные варианты фрагментов антител реконструируют в полноразмерные mAb [32].

Такой подход стал популярным благодаря эффективности, простоте и низкой стоимости. Разнообразие комбинаторных библиотек составляет

$> 10^{10}$  молекул. Эффективность подхода была продемонстрирована при исследовании вирусов гриппа. В работе были получены редкие антитела, нейтрализующие вирусы гриппа с использованием уникального механизма, что открывает новые возможности для разработки средств терапии и вакцин [33].

С помощью технологии фагового дисплея получен ряд противовирусных антител, например, m102.4 для профилактики и лечения заболеваний, вызванных вирусами Нипа и Хендра, Dridavumab против вируса гриппа и Foravirumab против вируса бешенства [34–36].

Важный недостаток фагового дисплея – проблемы, связанные с бактериальной системой экспрессии, основные из них – некорректный фолдинг молекул антител и отсутствие некоторых посттрансляционных модификаций (например, гликозилирования и образования дисульфидных связей) [37].

Второй по популярности дисплейный метод – дрожжевой дисплей, в котором фрагменты антител экспрессируются на поверхности дрожжевых клеток. Специфические антитела отбирают через последовательные раунды мутагенеза и точной контролируемой селекции клеток с помощью проточной цитометрии [38]. Преимущество дрожжевой библиотеки – эукариотический посттрансляционный процессинг секретируемых белков. На сегодняшний день разработаны линии дрожжевых клеток, обеспечивающие более корректное гликозилирование антител [39].

Также для получения мАТ предложены дисплейные методы на основе фага  $\lambda$  и вируса осповакцины, дисплей на поверхности бактериальных клеток, а также бесклеточные дисплейные системы на основе мРНК и рибосом [40–44].

Разработаны дисплейные системы и на основе клеток млекопитающих. Этот подход обеспечивает получение терапевтических мАТ, отличающихся высоким уровнем экспрессии в клетках млекопитающих и сохраняющих нативный фолдинг, биологические и физико-химические свойства, однако данный подход ограничен меньшим размером библиотеки. Предложен ряд улучшений (например, использование дисплея на поверхности клеток млекопитающих в сочетании с соматической гипермутацией *in vitro*, совершенствование трансфекции и использование сортировки флуоресцентно-активированных клеток – FACS), позволяющих получать варианты антител с более высокой аффинностью [45, 46].

Существенный недостаток всех дисплейных методов – потеря нативного VH/VL-спаривания исходного репертуара антител. Поскольку было показано, что антитела с нативными легкими цепями с большей вероятностью связывают антиген, чем антитела с ненативным спариванием, считается, что дисплейные библиотеки содержат большой процент низкоаффинных антител и, как

следствие, требуют многократных циклов созревания аффинности, отнимающих много времени [47, 48].

Для решения этой проблемы в дисплейных методах используют инкапсулирование единичных В-клеток в водно-жидкостной эмульсии с последующей амплификацией генов в эмульсионной ПЦР. Затем такое нативное разнообразие антител воспроизводят с помощью фагового дисплея [49].

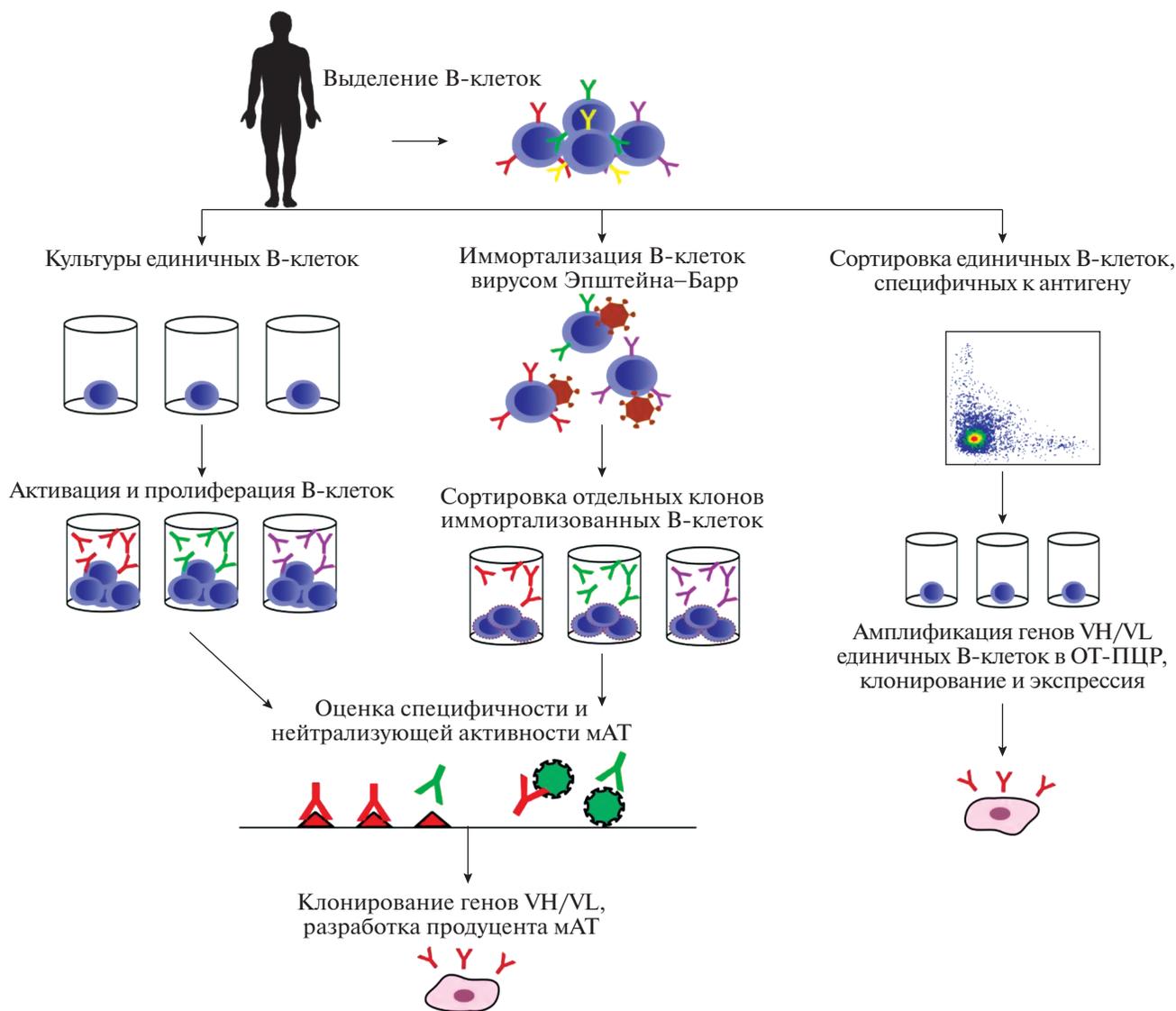
#### *Сортировка единичных В-клеток и клонирование генов VH/VL*

В 1996 г. был предложен эффективный способ получения мАТ, основанный на сортировке единичных В-клеток (рис. 5) [50]. Отдельные клетки, как правило, выделяют с помощью FACS-сортировки [51]. При этом используют антигены, меченные флуоресцентным красителем. Специфические В-клетки связываются с меченым белком и сортируются в отдельные ячейки. Затем из единичных В-клеток методом ОТ-ПЦР получают последовательности VH/VL-генов иммуноглобулинов и конструируют полноразмерные мАТ. ОТ-ПЦР с единичных клеток сохраняет пары VH/VL, к тому же этот метод позволяет получать мАТ в короткие сроки [52].

Еще один подход к изоляции отдельных клеток – микрофлюидные технологии на основе микрокапель и клапанных систем – приобрел популярность благодаря использованию небольших количеств входного материала, низкой стоимости процесса, его высокой скорости и точному контролю [51, 53, 54].

#### *Иммортализация В-клеток*

Использование вируса Эпштейна–Барр для иммортализации В-клеток человека впервые было описано более 40 лет назад. Технология заключается в получении В-клеток памяти доноров, демонстрирующих эффективный иммунный ответ, и последующем заражении клеток вирусом Эпштейна–Барр. Далее выделяют клоны В-клеток, продуцирующие антитела. Культуральную жидкость, содержащую секретируемые антитела, используют для скрининга специфичности и нейтрализующей активности. Прямой функциональный скрининг значительно сокращает временные затраты и повышает вероятность получения антител, обладающих желаемыми свойствами [55]. Этот подход был применен к выделению нейтрализующих антител против вируса бешенства, SARS-CoV и других вирусов [56, 57]. Однако применение метода осложнено рисками, связанными с онкогенностью вируса Эпштейна–Барр и низким выходом иммортализованных клеток. Последние улучшения (например, использование агониста TLR9) позволили увеличить выход иммортализованных клеток более чем до 30%. С помощью такой технологии получен ряд высокоэффектив-



**Рис. 5.** Получение моноклональных антител из В-клеток памяти: культуры единичных В-клеток, иммортализация и сортировка В-клеток.

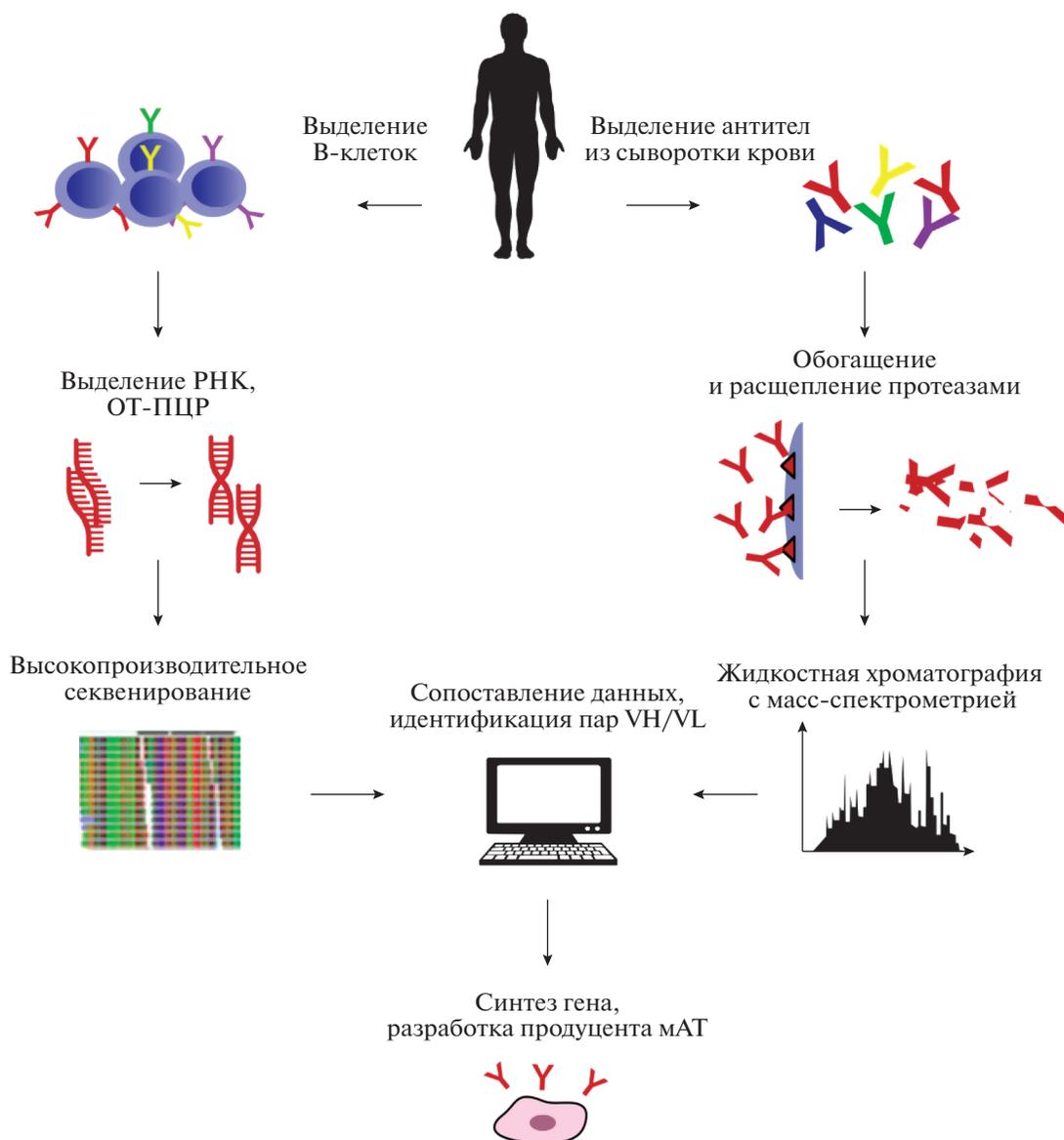
ных широконейтрализующих МАТ против вируса бешенства, SARS-CoV и других вирусов [58–60].

#### *Культуры одиночных В-клеток*

Использование иммортализации В-клеток считалось необходимым для получения функциональных В-клеточных культур. Однако был предложен альтернативный метод получения долгоживущих культур первичных одиночных В-клеток. Для этого В-клетки помещают на фидерный слой клеток, несущих на своей поверхности рецептор CD40L, а в питательную среду добавляют цитокины IL-2, IL-4, IL-21. В таких условиях одиночные В-клетки активируются и формируют клеточную культуру, продуцирующую МАТ. Далее проводят прямой функциональный скрининг культуральной среды, из отобранных клонов ме-

тодом ОТ-ПЦР получают нуклеотидные последовательности генов VH/VL и конструируют МАТ [61, 62]. Этот подход был применен для выделения нейтрализующих антител против ВИЧ-1, вирусов Денге и гриппа H1N1 [63–65].

Неоспоримое преимущество методов, основанных на скрининге В-клеток, — прямой функциональный анализ антител, полученных из естественных антителопродуцирующих клеток, что снижает ряд рисков, связанных с использованием других подходов (например, изменения структуры молекул антител или потеря некоторых вариантов антител из-за особенностей гетерологичной экспрессии). Тем не менее метод не лишен недостатков, среди которых низкая представленность специфичных В-клеток в сыворотке крови донора и их низкая выживаемость. Для повышения эффективности используют культуры плазм-



**Рис. 6.** Схема получения моноклональных антител с помощью методов высокопроизводительного секвенирования и протеомики.

матических клеток. Эти клетки содержат как минимум в 100 раз больше мРНК иммуноглобулинов и продуцируют антитела в конечной точке антиген-зависимого соматического гипермутационеза, что повышает вероятность обнаружения антитела, обладающего высокой аффинностью и специфичностью [66]. Дополнительно повысить эффективность скрининга позволяет автоматизация процесса [62].

*Новое поколение методов: высокопроизводительное секвенирование, протеомика и вычислительные технологии*

Методы высокопроизводительного секвенирования позволяют получать обширную инфор-

мацию о разнообразии репертуаров антител, которую используют для обнаружения специфических МАТ (рис. 6). Полагают, что частоты встречаемости последовательностей, полученных в результате секвенирования, отражают представленность клонов В-клеток в организме и, таким образом, дают материал для конструирования антител.

Так, на основе результатов массового параллельного секвенирования репертуара генов VH/VL плазматических клеток иммунизированных мышей были обнаружены наиболее часто встречающиеся аминокислотные последовательности VH и VL, на основе соразмерной распространенности они были объединены в пары, и получены scFv-фрагменты антител, из которых большая часть была специфична к антигену [67].

В другой работе из единичных В-клеток в перекрывающейся ОТ-ПЦР получали ДНК-фрагменты, кодирующие пары VH/VL, и секвенировали все полученные варианты. В результате было выявлено несколько наиболее широко представленных последовательностей антител, на основе которых были получены антитела, специфичные к гликопротеину вируса Эбола [68].

Сочетание методов геномики и протеомики также дает возможность идентифицировать специфичные МАТ из комбинаторного разнообразия репертуара антител донора. В таком случае данные секвенирования служат референсом/основой для интерпретации результатов, полученных при помощи масс-спектрометрии. Также для обнаружения антител объединяют результаты секвенирования с данными, полученными с использованием биоинформатических методов [69]. Например, используя известную последовательность антитела 10E8 против ВИЧ-1 и данные секвенирования репертуара нуклеотидных последовательностей VH/VL ВИЧ-положительного донора, построили эволюционные филогенетические деревья и на основе относительных генетических расстояний от дикого типа 10E8 осуществили селективное спаривание цепей *in silico*. В результате было выделено 11 функциональных 10E8-подобных МАТ с нейтрализующей активностью [70]. Позже с использованием этой стратегии из репертуара другого ВИЧ-положительного донора также было выделено несколько широконейтрализующих МАТ [71].

Биоинформатические подходы использовали для быстрого поиска антител против нового коронавируса SARS-CoV-2. Для этого были созданы модели взаимодействия вирусного S-белка с антителами, специфичными к SARS-CoV – наиболее близкому по антигенному составу коронавирусу. На основе результатов моделирования было выбрано антитело CR3022, специфичное к SARS-CoV, способное взаимодействовать с S-белком SARS-CoV-2. Специфичность взаимодействия этого антитела подтвердили *in vitro* [72].

Последние достижения в вычислительных методах позволяют не только сократить время и затраты на обнаружение антител, но и строго контролировать параллельный скрининг нескольких физико-химических свойств. Ожидается, что развитие этих методов позволит, в конечном счете, разрабатывать антитела с необходимыми свойствами *de novo* [73].

## МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДИЗАЙН АНТИТЕЛ

В последнее время активно развиваются методы, позволяющие проводить рациональный дизайн антител и изменять такие их свойства, как аффинность, число и специфичность паратопов, молекулярный вес, изоэлектрическая точка, подвижность молекулы и потенциальная иммуногенность, а также эффекторные свойства и время полужизни молекулы.

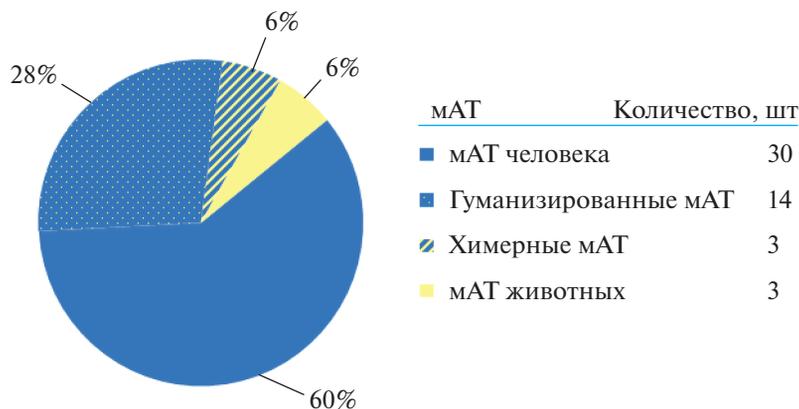
Необходимость инженерии антител возникла еще при получении первых МАТ, поскольку гибридная технология позволяла получать только антитела мыши, которые могли вызывать иммунный ответ в организме человека. В середине 1980-х гг. этот недостаток был частично устранен получением химерных, а затем и полностью гуманизированных (гиперхимерных) антител [74]. Под химерным антителом понимают молекулу иммуноглобулина животного, в которой структура белка модифицирована так, чтобы увеличить сходство с антителом человека. Как правило, заменяют константную область антитела животного на область антитела человека. В гиперхимерных антителах от иммуноглобулина животного остаются только петли гипервариабельных регионов (CDRs). Позже стало возможным получение антител человека с помощью технологий фагового дисплея и сортировки В-клеток, а также с использованием трансгенных животных [75].

Следует отметить, что последние пять лет в клиническую практику в основном вводятся именно антитела человека [76]. Тенденция характерна и для препаратов противовирусных антител. Согласно международной базе данных IMGT ([www.imgt.org](http://www.imgt.org)), подавляющее большинство препаратов противовирусных антител – это антитела человека или гуманизированные антитела (рис. 7).

Биологические свойства антител зависят от структуры Fc-фрагмента, поэтому данный регион часто подвергают модификациям. Для большинства терапевтических применений желателен длительный период полужизни антител в сыворотке, т.к. это уменьшает необходимость повторных инъекций и сродство Fc-области к различным рецепторам. Регулировать эти процессы удается благодаря аминокислотным заменам белкового остова молекулы [77, 78]. Изменения сродства к рецепторам позволяет также добиться гликоинженерия антител. Предполагается, что дефукозилированные антитела обладают повышенной аффинностью к некоторым рецепторам, однако клинические эффекты еще предстоит исследовать [79].

Растворимость антител и способность к агрегации также становятся управляемыми характеристиками. Аминокислотные замены в областях, склонных к агрегации (APR), экспериментально показали увеличение растворимости антител, что подтверждает правильность этой инженерной стратегии [80].

Получение фрагментов антител различного размера (рис. 8) помогло усовершенствовать МАТ под конкретные цели [81]. Фрагменты антител имеют несколько преимуществ по сравнению с полноразмерными МАТ: более низкую стоимость препарата, сниженную иммуногенность, высокую способность проникновения в ткани, что дает возможность молекуле достигать труднодоступных мест [82]. В настоящее время разрабатываются одноцепочечные антитела (оцАТ) против



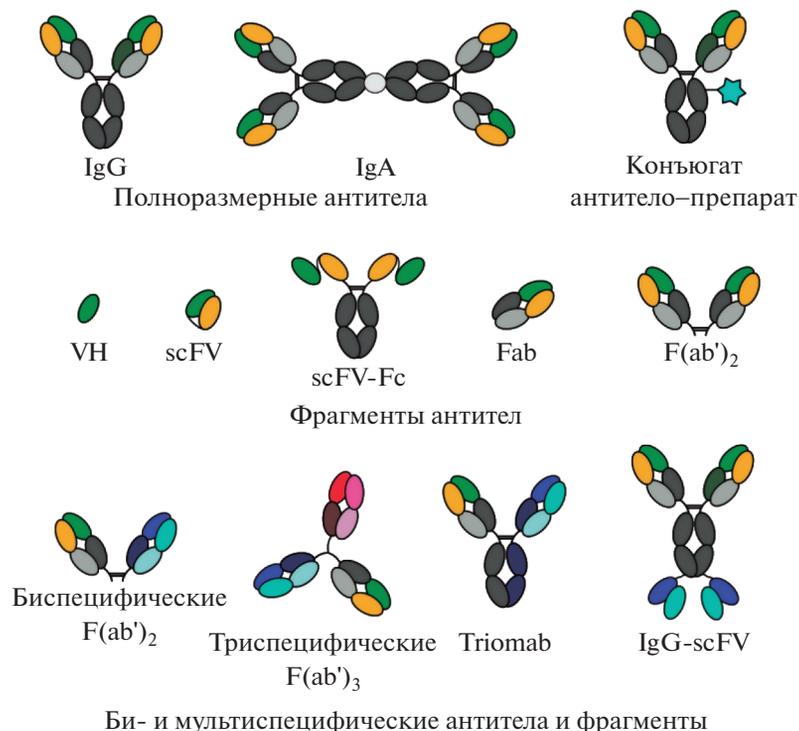
**Рис. 7.** Соотношение мАТ различной степени гуманизации, разработанных для терапии/профилактики вирусных инфекций (<https://www.imgt.org>, данные на ноябрь 2021 г.).

ряда вирусов, включая ВИЧ-1, вирусы гриппа и гепатита С, респираторно-синцитиальный вирус и энтеровирусы [83]. Хотя оцАТ – очень сильные ингибиторы вирусных инфекций, ни одно из них не было одобрено для клинического использования против вирусной инфекции.

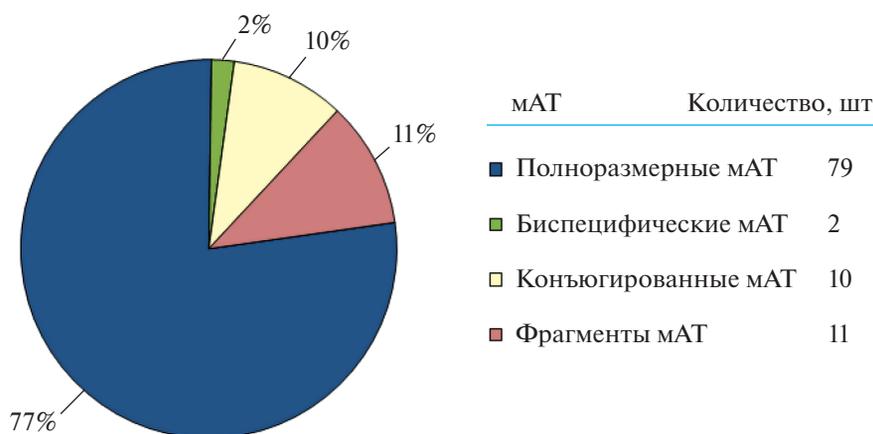
Еще один перспективный вариант мАТ – ододоменные антитела (наноантитела) и их производные. Такие антитела состоят из единственного переменного домена и способны связывать труднодоступные антигены, к тому же они обла-

дают хорошей стабильностью и растворимостью [84]. Прообразом для их создания послужили неканонические иммуноглобулины животных семейства Camelidae (верблюд, лама) и хрящевых рыб, полностью лишённые L-цепей [85, 86].

Несмотря на достоинства различных рекомбинантных фрагментов антител, почти все одобренные к применению мАТ на данный момент представляют собой полноразмерные иммуноглобулины (рис. 9).



**Рис. 8.** Схематическое изображение некоторых вариантов рекомбинантных моноклональных антител, фрагментов антител и их производных.



**Рис. 9.** Соотношение вариантов мАТ, одобренных для использования в терапии (<https://www.imgt.org>, данные на ноябрь 2021 г.).

Антитела можно использовать и как средство таргетной доставки лекарственного средства или токсина в конкретный участок, что может быть особенно полезно для уничтожения зараженных клеток [87].

Иммуноконъюгаты активно исследовали при лечении рака, несколько вариантов получили одобрение FDA [88]. В настоящее время разработано несколько конъюгатов на основе антител для эффективной и высокоспецифичной терапии различных вирусов, включая ВИЧ, цитомегаловирус, герпесвирусы, вирусы гриппа и бешенства [89].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день терапевтические мАТ – быстрорастущий класс биофармацевтических препаратов, демонстрирующий высокую эффективность в отношении многих онкологических, воспалительных и аутоиммунных заболеваний. Несомненные преимущества мАТ – их предсказуемое действие, высокая специфичность и чистота.

Несмотря на скромный опыт применения в противовирусной терапии, использование нейтрализующих мАТ остается одним из самых перспективных направлений в борьбе с вирусными инфекциями. При возникновении новых вирусных эпидемий или биотеррористических угроз получение и применение антител, несомненно, наиболее рациональное стратегическое решение.

В настоящее время улучшение и появление новых подходов к получению антител позволяет в кратчайшие сроки получать высокоэффективные мАТ, а рациональный дизайн с использованием методов геномной инженерии и биоинформатики открывает безграничные возможности их совершенствования.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2019-1665).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Köhler G., Milstein C. // *Nature*. 1975. V. 256. P. 495–497. <https://doi.org/10.1038/256495a0>
2. Riechmann L., Clark M., Waldmann H., Winter G. // *Nature*. 1988. V. 332. P. 323–327. <https://doi.org/10.1038/332323a0>
3. Zeitlin L., Cone R.A., Moench T.R., Whaley K.J. // *Microbes Infect.* 2000. V. 2. P. 701–708. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(00\)00355-5](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)00355-5)
4. Pollack P., Groothuis J.R. // *J. Infect. Chemotherapy*. 2002. V. 8. P. 201–206. <https://doi.org/10.1007/s10156-002-0178-6>
5. Rizza S.A., Bhatia R., Zeuli J., Temesgen Z. // *Drugs Today (Barc)*. 2019. V. 55. P. 25–34. <https://doi.org/10.1358/dot.2019.55.1.2895651>
6. Corti D., Misasi J., Mulangu S., Stanley D.A., Kanekiyo M., Wollen S., Ploquin A., Doria-Rose N.A., Staube R.P., Bailey M., Shi W., Choe M., Marcus H., Thompson E.A., Cagigi A., Silacci C., Fernandez-Rodriguez B., Perez L., Sallusto F., Vanzetta F., Agatic G., Cameroni E., Kisalu N., Gordon I., Ledgerwood J.E., Mascola J.R., Graham B.S., Muyembe-Tamfun J.J., Trefry J.C., Lanzavecchia A., Sullivan N.J. // *Science*. 2016. V. 351.

- P. 1339–1342.  
<https://doi.org/10.1126/science.aad522413>
7. Lee A. // *Drugs*. 2021. V. 81. P. 595–598.  
<https://doi.org/10.1007/s40265-021-01483-4>
  8. Sivapalasingam S., Kamal M., Slim R., Hosain R., Shao W., Stoltz R., Yen J., Pologe L.G., Cao Y., Partridge M., Sumner G., Lipsich L. // *Lancet Infect Dis*. 2018. V. 18. P. 884–893.  
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30397-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30397-9)
  9. Gottlieb R.L., Nirula A., Chen P., Boscia J., Heller B., Morris J., Huhn G., Cardona J., Mocherla B., Stosor V., Shawa I., Kumar P., Adams A.C., Van Naarden J., Custer K.L., Durante M., Oakley G., Schade A.E., Holzer T.R., Ebert P.J., Higgs R.E., Kallewaard N.L., Sabo J., Patel D.R., Klekotka P., Shen L., Skovronsky D.M. // *JAMA*. 2021. V. 325. P. 632–644.  
<https://doi.org/10.1001/jama.2021.0202>
  10. Jones B.E., Brown-Augsburger P.L., Corbett K.S., Westendorf K., Davies J., Cujec T.P., Wiethoff C.M., Blackburne J.L., Heinz B.A., Foster D., Higgs R.E., Balasubramaniam D., Wang L., Bidshahri R., Kraft L., Hwang Y., Zentelis S., Jepson K.R., Goya R., Smith M.A., Collins D.W., Hinshaw S.J., Tycho S.A., Pellacani D., Xiang P., Muthuraman K., Sobhanifar S., Piper M.H., Triana F.J., Hendle J., Pustilnik A., Adams A.C., Berens S.J., Baric R.S., Martinez D.R., Cross R.W., Geisbert T.W., Borisevich V., Abiona O., Belli H.M., de Vries M., Mohamed A., Dittmann M., Samanovic M., Mulligan M.J., Goldsmith J.A., Hsieh C.L., Johnson N.V., Wrapp D., McLellan J.S., Barnhart B.C., Graham B.S., Mascola J.R., Hansen C.L., Falconer E. // *Sci. Transl. Med.* 2021. V. 13. P. eabf1906.  
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abf1906>
  11. Hansen J., Baum A., Pascal K.E., Russo V., Giordano S., Wloga E., Fulton B.O., Yan Y., Koon K., Patel K., Chung K.M., Hermann A., Ullman E., Cruz J., Rafique A., Huang T., Fairhurst J., Libertiny C., Malbec M., Lee W.Y., Welsh R., Farr G., Pennington S., Deshpande D., Cheng J., Watty A., Bouffard P., Babb R., Levenkova N., Chen C., Zhang B., Romero Hernandez A., Saotome K., Zhou Y., Franklin M., Sivapalasingam S., Lye D.C., Weston S., Logue J., Haupt R., Frieman M., Chen G., Olson W., Murphy A.J., Stahl N., Yancopoulos G.D., Kyratous C.A. // *Science*. 2020. V. 369. P. 1010–1014.  
<https://doi.org/10.1126/science.abd082711>
  12. Weinreich D.M., Sivapalasingam S., Norton T., Ali S., Gao H., Bhore R., Musser B.J., Soo Y., Rofail D., Im J., Perry C., Pan C., Hosain R., Mahmood A., Davis J.D., Turner K.C., Hooper A.T., Hamilton J.D., Baum A., Kyratous C.A., Kim Y., Cook A., Kampman W., Kohli A., Sachdeva Y., Graber X., Kowal B., DiCioccio T., Stahl N., Lipsich L., Braunstein N., Herman G., Yancopoulos G.D. // *N. Engl. J. Med.* 2021. V. 384. P. 238–251.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035002>
  13. Поём А. // Основы иммунологии. М.: Мир, 1991. 328 с.
  14. Klasse P.J. // *Adv. Biol.* 2014. V. 2014. P. 1–24.  
<https://doi.org/10.1155/2014/157895>
  15. Mandel B. // *Adv. Virus Res.* 1978. V. 23. P. 205–268.  
[https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60101-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60101-3)
  16. Mallery D., McEwan W.A., Bidgood S.R., Towers G.J., Johnson C.M., James L.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 19985–19990.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1014074107>
  17. von Bredow B., Arias J.F., Heyer L.N., Moldt B., Le K., Robinson J.E., Zolla-Pazner S., Burton D.R., Evans D.T. // *J. Virol.* 2016. V. 90. P. 6127–6139.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.00347-16>
  18. Linscott W.D., Levinson W.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1969. V. 64. P. 520–527.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.64.2.520>
  19. Schmaljohn A.L. // *Curr. HIV Res.* 2013. V. 11. P. 345–353.  
<https://doi.org/10.2174/1570162x113116660057>
  20. Pelegrin M., Naranjo-Gomez M., Piechaczyk M. // *Trends Microbiol.* 2015. V. 23. P. 653–665.  
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.07.005>
  21. Walker L.M., Burton D.R. // *Nat. Rev. Immunol.* 2018. V. 18. P. 297–308.  
<https://doi.org/10.1038/nri.2017.148>
  22. Chan S.K., Rahumatullah A., Lai J.Y., Lim T.S. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017. V. 1053. P. 35–59.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-72077-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-72077-7_3)
  23. Wu Y., Li S., Du L., Wang C., Zou P., Hong B., Yuan M., Ren X., Tai W., Kong Y., Zhou C., Lu L., Zhou X., Jiang S., Ying T. // *Emerg. Microbes Infect.* 2017. V. 6. P. e89.  
<https://doi.org/10.1038/em.2017.79>
  24. Little M., Kipriyanov S.M., Le Gall F., Moldenhauer G. // *Immunol. Today*. 2000. V. 21. P. 364–370.  
[https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01668-6](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01668-6)
  25. Zaroff S., Tan G. // *Biotechniques*. 2019. V. 67. P. 90–92.  
<https://doi.org/10.2144/btn-2019-0054>
  26. Bradbury A.R.M., Trinklein N.D., Thie H., Wilkinson I.C., Tandon A.K., Anderson S., Bladen K.L., Jones B., Force Aldred S., Bestagno M., Burrone O., Maynard J., Ferrara F., Trimmer J.S., Gornemann J., Glanville J., Wolf P., Frenzel A., Wong J., Koh X.Y., Eng H.Y., Lane D., Lefranc M.P., Clark M., Dübel S. // *MAbs*. 2018. V. 10. P. 539–546.  
<https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1445456>
  27. Yu X., McGraw P.A., House F.S., Crowe J.E. // *J. Immunol. Methods*. 2008. V. 336. P. 142–151.  
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2008.04.008>
  28. Gorny M. // *Antib. Technol. J.* 2012. V. 2. P. 1–5.  
<https://doi.org/10.2147/ANTI.S30489>
  29. Qiu X., Wong G., Audet J., Bello A., Fernando L., Alimonti J.B., Fausther-Bovendo H., Wei H., Aviles J., Hiatt E., Johnson A., Morton J., Swope K., Bohorov O., Bohorova N., Goodman C., Kim D., Pauly M.H., Velasco J., Pettitt J., Olinger G.G., Whaley K., Xu B., Strong J.E., Zeitlin L., Kobinger G.P. // *Nature*. 2014. V. 514. P. 47–53.  
<https://doi.org/10.1038/nature13777>
  30. Smith G.P. // *Science*. 1985. V. 228. P. 1315–1317.  
<https://doi.org/10.1126/science.4001944>
  31. McCafferty J., Griffiths A.D., Winter G., Chiswell D.J. // *Nature*. 1990. V. 348. P. 552–554.  
<https://doi.org/10.1038/348552a0>
  32. Ledsgaard L., Kilstrup M., Karatt-Vellatt A., McCafferty J., Laustsen A.H. // *Toxins*. 2018. V. 10. P. 236.  
<https://doi.org/10.3390/toxins10060236>
  33. Lerner R.A. // *Mol. BioSystems*. 2011. V. 7. P. 1004–1012.  
<https://doi.org/10.1039/C0MB00310G>
  34. Zhu Z., Bossart K.N., Bishop K.A., Crameri G., Dimitrov A.S., McEachern J.A., Feng Y., Middleton D., Wang L.-F., Broder C.C., Dimitrov D.S. // *J. Infect. Dis.* 2008. V. 197. P. 846–853.  
<https://doi.org/10.1086/528801>
  35. Nachbagauer R., Shore D., Yang H., Johnson S.K., Gabbard J.D., Tompkins S.M., Wrammert J., Wilson P.C., Stevens J., Ahmed R., Krammer F., Ellebedy A.H. // *J. Virol.* 2018. V. 92. P. e00949-18.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.00949-18>

36. Frenzel A., Schirrmann T., Hust M. // MAbs. 2016. V. 8. P. 1177–1194.  
https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1212149
37. Joseph B.C., Pichaimuthu S., Srimeenakshi S., Murthy M., Selvakumar M., Ganesan M., Manjunath S.R. // J. Cell Sci. Ther. 2015. V. 6. P. 221.  
https://doi.org/10.4172/2157-7013.1000221
38. Sun Y., Ban B., Bradbury A., Ansari G.A.S., Blake D.A. // Anal. Chem. 2016. V. 88. P. 9181–9189.  
https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02334
39. Li H., Sethuraman N., Stadheim T. A., Zha D., Prinz B., Ballew N., Bobrowicz P., Choi B.K., Cook W.J., Cukan M., Houston-Cummings N.R., Davidson R., Gong B., Hamilton S.R., Hoopes J.P., Jiang Y., Kim N., Mansfield R., Nett J.H., Rios S., Strawbridge R., Wildt S., Gerngross T.U. // Nat. Biotechnol. 2006. V. 24. P. 210–215.  
https://doi.org/10.1038/nbt1178
40. Huse W.D., Sastry L., Iverson S.A., Kang A.S., Altling-Mees M., Burton D.R., Benkovic S.J., Lerner R.A. // Science. 1989. V. 246. P. 1275–1281.  
https://doi.org/10.1126/science.2531466
41. Daugherty P.S., Chen G., Olsen M.J., Iverson B.L., Georgiou G. // Protein Eng. 1998. V. 11. P. 825–832.  
https://doi.org/10.1093/protein/11.9.825
42. Smith E., Zauderer M. // Curr. Drug Discov. Technol. 2014. V. 11. P. 48–55.  
https://doi.org/10.2174/157016381101140124163634
43. Kanamori T., Fujino Y., Ueda T. // Biochim. Biophys. Acta – Prot. Proteomics. 2014. V. 1844. P. 1925–1932.  
https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.04.007
44. Lipovsek D., Plückerthun A. // J. Immunol. Methods. 2004. V. 290. P. 51–67.  
https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.04.008
45. King D., Bowers P., Kehry M., Horlick R. // Curr. Drug Discov. Technol. 2014. V. 11. P. 56–64.  
https://doi.org/10.2174/15701638113109990037
46. Zhou C., Jacobsen F.W., Cai L., Chen Q., Shen W.D. // MAbs. 2010. V. 2. P. 508–518.  
https://doi.org/10.4161/mabs.2.5.12970
47. Adler A.S., Bedinger D., Adams M.S., Asensio M.A., Edgar R.C., Leong R., Leong J., Mizrahi R.A., Spindler M.J., Bandi S.R., Huang H., Tawde P., Brams P., Johnson D.S. // MAbs. 2018. V. 10. P. 431–443.  
https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1426422
48. Hu D., Hu S., Wan W., Xu M., Du R., Zhao W., Gao X., Liu J., Liu H., Hong J. // PLoS One. 2015. V. 10. P. e0129125.  
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129125
49. Rajan S., Kierny M.R., Mercer A., Wu J., Tovchigrechko A., Wu H., Dall'Acqua W.F., Xiao X., Chowdhury P.S. // Commun. Biol. 2018. V. 1. P. 1–8.  
https://doi.org/10.1038/s42003-017-0006-2
50. Babcook J.S., Leslie K.B., Olsen O.A., Salmon R.A., Schrader J.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 7843–7848.  
https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.7843
51. Perry S.T., Keogh E., Morton M., Koudstaal W., Pascual G. // J. Vis. Exp. 2019. V. 150. P. e59809.  
https://doi.org/10.3791/59809
52. Thorsen T., Roberts R., Arnold F.H., Quake S.R. // Phys. Rev. Lett. 2001. V. 86. P. 4163–4166.  
https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.86.4163
53. Honjo T., Alt F., Neuberg M. // Molecular Biology of B Cells. Academic Press, 2003. 600 p.
54. Singhal A., Haynes C.A., Hansen C.L. // Anal. Chem. 2010. V. 82. P. 8671–8679.  
https://doi.org/10.1021/ac101956e
55. Lanzavecchia A., Corti D., Sallusto F. // Curr. Opin. Biotechnol. 2007. V. 18. P. 523–528.  
https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.10.011
56. Traggiai E., Becker S., Subbarao R., Kolesnikova L., Uematsu Y., Gismondo M.R., Murphy B.R., Rappuoli R., Lanzavecchia A. // Nat. Med. 2004. V. 10. P. 871–875.  
https://doi.org/10.1038/nm1080
57. Ueki Y., Goldfarb I.S., Harindranath N., Gore M., Koprowski H., Notkins A.L., Casali P. // J. Exp. Med. 1990. V. 171. P. 19–34.  
https://doi.org/10.1084/jem.171.1.19
58. Traggiai E., Becker S., Subbarao K., Kolesnikova L., Uematsu Y., Gismondo M.R., Murphy B.R., Rappuoli R., Lanzavecchia A. // Nat. Med. 2004. V. 10. P. 871–875.  
https://doi.org/10.1038/nm1080
59. Ueki Y., Goldfarb I.S., Harindranath N., Gore M., Koprowski H., Notkins A.L., Casali P. // J. Exp. Med. 1990. V. 171. P. 19–34.  
https://doi.org/10.1084/jem.171.1.19
60. Corti D., Lanzavecchia A. // Annu. Rev. Immunol. 2013. V. 31. P. 705–742.  
https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095916
61. Jin A., Ozawa T., Tajiri K., Obata T., Kondo S., Kinoshita K., Kadowaki S., Takahashi K., Sugiyama T., Kishi H., Muraguchi A. // Nat. Med. 2009. V. 15. P. 1088–1092.  
https://doi.org/10.1038/nm.1966
62. Huang J., Doria-Rose N.A., Longo N.S., Laub L., Lin C.-L., Turk E., Kang B.H., Migueles S.A., Bailer R.T., Mascola J.R., Connors M. // Nat. Protoc. 2013. V. 8. P. 1907–1915.  
https://doi.org/10.1038/nprot.2013.117
63. Dejnirattisai W., Wongwiwat W., Supasa S., Zhang X., Dai X., Rouvinski A., Jumnainsong A., Edwards C., Than Ha Quyen N., Duangchinda T., Grimes J.M., Tsai W.Y., Lai C.Y., Wang W.K., Malasit P., Farrar J., Simmons C.P., Zhou Z.H., Rey F.A., Mongkolsapaya J., Screaton G.R. // Nat. Immunol. 2015. V. 16. P. 170–177.  
https://doi.org/10.1038/ni.3058
64. Wrammert J., Smith K., Miller J., Langley W.A., Kokko K., Larsen C., Zheng N.-Y., Mays I., Garman L., Helms C., James J., Air G.M., Capra J.D., Ahmed R., Wilson P.C. // Nature. 2008. V. 453. P. 667–671.  
https://doi.org/10.1038/nature06890
65. Walker L.M., Phogat S.K., Chan-Hui P.-Y., Wagner D., Phung P., Goss J.L., Wrin T., Simek M.D., Fling S., Mitcham J.L., Lehrman J.K., Priddy F.H., Olsen O.A., Frey S.M., Hammond P.W., Protocol G Principal Investigators, Kaminsky S., Zamb T., Moyle M., Koff W.C., Poirgnard P., Burton D.R. // Science. 2009. V. 326. P. 285–289.  
https://doi.org/10.1126/science.1178746
66. Herzenberg L.A., De Rosa S.C. // Immunol. Today. 2000. V. 21. P. 383–390.  
https://doi.org/10.1016/s0167-5699(00)01678-9
67. Reddy S.T., Ge X., Miklos A.E., Hughes R.A., Hyun Kang S., Hon Hoi K., Chrysostomou C., Hunicke-Smith S.P., Iverson B.L., Tucker P.W., Ellington A.D., Georgiou G. // Nat. Biotechnol. 2010. V. 28. P. 965–969.  
https://doi.org/10.1038/nbt.1673
68. Wang B., Kluwe C.A., Lungu O.I., DeKosky B.J., Kerr S.A., Johnson E.L., Tanno H., Lee C.-H., Jung J., Rezig A.B., Carroll S.M., Reyes A.N., Bentz J.R., Villanueva I., Altman A.L., Davey R.A., Ellington A.D., Georgiou G. // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 13926.  
https://doi.org/10.1038/srep13926

69. Parola C., Neumeier D., Reddy S.T. // *Immunology*. 2018. V. 153. P. 31–41.  
https://doi.org/10.1111/imm.12838
70. Zhu J., Ofek G., Yang Y., Zhang B., Louder M.K., Lu G., McKee K., Pancera M., Skinner J., Zhang Z., Parks R., Eudailey J., Lloyd K.E., Blinn J., Alam S.M., Haynes B.F., Simek M., Burton D.R., Koff W.C., NISC Comparative Sequencing Program, Mullikin J.C., Mascola J.R., Shapiro L., Kwong P.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. P. 6470–6475.  
https://doi.org/10.1073/pnas.1219320110
71. Zhu J., Wu X., Zhang B., McKee K., O'Dell S., Soto C., Zhou T., Casazza J.P., Mullikin J.C., Kwong P.D., Mascola J.R., Shapiro L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. P. E4088–E4097.  
https://doi.org/10.1073/pnas.1306262110
72. Tian X., Li C., Huang A., Xia S., Lu S., Shi Z., Lu L., Jiang S., Yang Z., Wu Y., Ying T. // *Emerg. Microbes Infect.* 2020. V. 9. P. 382–385.  
https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1729069
73. Sormanni P., Aprile F.A., Vendruscolo M. // *Chem. Soc. Rev.* 2018. V. 47. P. 9137–9157.  
https://doi.org/10.1039/c8cs00523k
74. McCarthy M. // *The Lancet*. 1997. V. 349. P. 405.  
https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)80027-X
75. Lonberg N. // *Handb. Exp. Pharmacol.* 2008. V. 181. P. 69–97.  
https://doi.org/10.1007/978-3-540-73259-4\_4
76. Grilo A.L., Mantalaris A. // *Trends Biotechnol.* 2019. V. 37. P. 9–16.  
https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.05.014
77. Vaccaro C., Zhou J., Ober R.J., Ward E.S. // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. P. 1283–1288.  
https://doi.org/10.1038/nbt1143
78. Lazar G.A., Dang W., Karki S., Vafa O., Peng J.S., Hyun L., Chan C., Chung H.S., Eivazi A., Yoder S.C., Vielmetter J., Carmichael D.F., Hayes R.J., Dahiyat B.I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 4005–4010.  
https://doi.org/10.1073/pnas.0508123103
79. Irvine E.B., Alter G. // *Glycobiology*. 2020. V. 30. P. 241–253.  
https://doi.org/10.1093/glycob/cwaa018
80. van der Kant R., Karow-Zwick A.R., Van Durme J., Blech M., Gallardo R., Seeliger D., Aßfalg K., Baatsen P., Comper-nolle G., Gils A., Studts J.M., Schulz P., Garidel P., Schymkowitz J., Rousseau F. // *J. Mol. Biol.* 2017. V. 429. P. 1244–1261.  
https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.03.014
81. Holliger P., Hudson P.J. // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. P. 1126–1136.  
https://doi.org/10.1038/nbt1142
82. Bates A., Power C.A. // *Antibodies*. 2019. V. 8. P. 28.  
https://doi.org/10.3390/antib8020028
83. Wu Y., Jiang S., Ying T. // *Front. Immunol.* 2017. V. 8. P. 1802.  
https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01802
84. Туллиб С.В. // *Мол. биология*. 2020. Т. 54. № 3. P. 362–373.  
https://doi.org/10.31857/S0026898420030167
85. Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hammers C., Bajyana Songa E., Bendahman N., Hammers R. // *Nature*. 1993. V. 363. P. 446–448.  
https://doi.org/10.1038/363446a0
86. Greenberg A.S., Avila D., Hughes M., Hughes A., McKinney E.C., Flajnik M.F. // *Nature*. 1995. V. 374. P. 168–173.  
https://doi.org/10.1038/374168a0
87. Bakhtiar R. // *Biotechnol. Lett.* 2016. V. 38. P. 1655–1664.  
https://doi.org/10.1007/s10529-016-2160-x
88. Chau C.H., Steeg P.S., Figg W.D. // *The Lancet*. 2019. V. 394. P. 793–804.  
https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31774-X
89. Spiess K., Jakobsen M.H., Kledal T.N., Rosenkilde M.M. // *J. Leukoc. Biol.* 2016. V. 99. P. 911–925.  
https://doi.org/10.1189/jlb.2MR1015-468R

## Methods for Obtaining Monoclonal Antibodies for the Prevention and Treatment of Viral Infections

Iu. A. Merkuleva\*, #, D. N. Shcherbakov\*, and A. A. Ilyichev\*

#Phone: +7 (923) 777-15-86; e-mail: j.a.merkulyeva@gmail.com

\*State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Rospotrebnadzor, World-Class Genomic Research Center for Biological Safety and Technological Independence, Federal Scientific and Technical Program on the Development of Genetic Technologies, Koltsovo, Novosibirsk region, 630559 Russia

The viral threat can arise suddenly and quickly turn into a major epidemic or pandemic. In this case, it will be necessary to develop effective means of therapy and prevention in a short time. Vaccine development takes decades, and the use of antiviral compounds is often ineffective and unsafe. A quick response may be use of convalescent plasma but a number of difficulties associated with their use forced researchers to switch to the development of safer and more effective drugs based on monoclonal antibodies (mAb). In order to provide protection, such drugs must have a key characteristic – neutralizing properties, i.e. the ability to block viral infection. Currently, in the arsenal of researchers there are a number of approaches for obtaining mAbs, however, none of them is not standard. Each approach has its own advantages and disadvantages. The choice of method depends both on the characteristics of the virus and on time constraints and technical challenges. This review provides a comparative analysis of modern methods for the obtaining of neutralizing mAbs, and describes the current trends in the design of antibodies for therapy and prevention of viral diseases.

*Keywords: monoclonal antibodies, viral infections, hybridoma technology, display technology, B-cell sorting*



УДК 547.458.25

## СИНТЕЗ ДИСАХАРИДА $\text{Ху}\beta\text{1-2Man}\beta$ – КОРОВОГО ФРАГМЕНТА РАСТИТЕЛЬНЫХ *N*-ГЛИКОПРОТЕИНОВ<sup>1</sup>

© 2022 г. С. В. Цыганкова\*, Г. В. Пазынина\*, А. С. Парамонов\*, А. О. Чижов\*\*, Н. В. Бовин\*.\*

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

\*\*Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Россия, 119991 Москва, Ленинский просп., 47

Поступила в редакцию 09.11.2021 г.

После доработки 30.11.2021 г.

Принята к публикации 11.12.2021 г.

Впервые синтезирован дисахарид  $\text{Ху}\beta\text{1-2Man}\beta$  в виде спейсерного производного. Этот структурный фрагмент гликопротеиновых *N*-цепей типичен для растительной клетки и не встречается у млекопитающих. Предполагается, что у растений есть белки, специфически узнающие  $\text{Ху}\beta\text{1-2Man}\beta$ , поэтому молекулярные пробы на основе этого дисахарида представляют интерес для поиска, выделения и выяснения клеточной локализации соответствующих белков – лектинов и ферментов.

*Ключевые слова:* синтез олигосахаридов,  $\beta$ -маннозилрование, растительные *N*-гликаны

DOI: 10.31857/S0132342322030204

### ВВЕДЕНИЕ

Гликан-связывающие белки (лектины, белки-транспортеры, ферменты углеводного обмена) растительной клетки изучены значительно хуже, чем соответствующие белки млекопитающих, несмотря на то, что представленность углеводной составляющей в растительной клетке существенно выше. Хотя *N*-гликаны в гликопротеинах животных и растений имеют схожее строение, у последних есть специфическая особенность –  $\beta$ -ксилозный остаток, соединенный с коровой  $\beta$ -маннозой [1, 2]. Наличие необычного  $\text{Ху}\beta$ -заместителя предполагает выполнение специфических функций в жизнедеятельности растительной клетки и, соответственно, функционирование специфических углевод-связывающих белков.

Цель данной работы – синтез типичного для растительной клетки структурного фрагмента *N*-гликопротеиновых цепей – дисахарида  $\text{Ху}\beta\text{1-2Man}\beta$  в виде 3-аминопропилгликозида для последующего поиска, выделения и выяснения клеточной локализации ксилоза-узнающих белков в растительных экстрактах. Наличие аминогруппы в составе спейсера дисахарида  $\text{Ху}\beta\text{1-2Man}\beta$ -sp делает возможной иммобилизацию на чипе [3–5], получение

из него флуоресцентного зонда, аффинного адсорбента и других инструментов исследования.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Стереоселективное химическое  $\beta$ -маннозилрование – одна из наиболее сложных задач олигосахаридного синтеза. Существует несколько путей ее решения, в частности, Lichtenthaler et al. в своих работах применяли подход [6], суть которого заключается в 4-стадийном получении 2-оксогликозилбромидов из D-глюкозы, гликозилрование им гликозил-акцептора в присутствии нерастворимых солей серебра и последующее стереоселективное восстановление боргидридом натрия до получения  $\beta$ -маннозида. В работах [7–9] показано, что 4,6-*O*-бензилиденные тиогликозиды с несоучаствующими группами (Bn, 2,3-изопротилиденная, триметилсилильная) при C2 и C3 обеспечивают более высокую  $\beta$ -селективность в сравнении с донорами, не обладающими этими группами. Известно также, что при использовании в качестве гликозил-донора диизопротилиденного производного тиогликозида маннозы гликозилрование протекает почти с количественным выходом (89%), но с низкой селективностью ( $\alpha/\beta$ , 1 : 1) [9].

Поскольку взаимодействие 3-трифторацетамидопропанола с полностью бензилированным бромидом или тиогликозидом маннозы в наших экспериментах привело к преимущественному

<sup>1</sup> Дополнительные материалы для этой статьи доступны по doi 10.31857/S0132342322030204 для авторизованных пользователей.

# Автор для связи: (тел.: +7 (495) 330-03-00; эл. почта: professorbovin@yandex.ru).

**Таблица 1.** Данные спектров <sup>1</sup>H-ЯМР соединений (III) и (VII) (CDCl<sub>3</sub>), (IV) и (VIII) (D<sub>2</sub>O)

Соединение	Остаток	КССВ, $J_{1,2}$ , Гц	$\delta$ , НЗ, м.д.
(III $\alpha$ )	Man $\alpha$	1.8	5.30
(III $\beta$ )	Man $\beta$	1.1	5.06
(VII $\alpha$ )	Man $\alpha$	1.9	5.34
(VII $\beta$ )	Man $\beta$	<1.0	5.06
(IV $\alpha$ )	Man $\alpha$	1.7	3.81
(IV $\beta$ )	Man $\beta$	1.1	3.65
(VIII $\alpha$ )	Man $\alpha$	1.7	3.80
(VIII $\beta$ )	Man $\beta$	<1.0	3.66

образованию  $\alpha$ -аномера ( $\alpha/\beta \approx 2 : 1$ ), мы решили использовать для этой реакции дибензилиденное производное (II), которое легко получить из полного ацетата (I) [10] дез-*O*-ацетилированием и последующим введением бензилиденных групп (Vd) по схеме 1. Реакция гликозилирования 3-трифторацетамидопропанола производным (II) в дихлорметане в присутствии *N*-иодсукцинимиды (NIS) и трифторметансульфокислоты (TfOH) при комнатной температуре с последующей заменой Vd-групп на ацетильные привела к получению смеси аномеров, из которой после хроматографического разделения (здесь и далее – на силикагеле) выделены индивидуальные  $\beta$ - и  $\alpha$ -маннозиды (III $\beta$ ) и (III $\alpha$ ) с выходом 33 и 46% соответственно. После их дезацетилирования и снятия *N*-трифторацетильной защиты получены аминопропильные производные маннозы (IV $\beta$ ) и (IV $\alpha$ ) с выходом >90%. Конфигурацию аномерного центра остатка маннозы определяли с помощью <sup>1</sup>H-ЯМР: величины КССВ сигналов аномерных протонов при C1 для  $\beta$ -маннозидов ( $J_{1,2} < 1.1$  Гц) и  $\alpha$ -маннозидов ( $J_{1,2} 1.8$  Гц), положение химического сдвига сигнала протона при C3 [11] ( $\alpha$ -маннозиды характеризуются более слабопольным химическим сдвигом сигналов протонов при C3 по сравнению с положением этого сигнала в  $\beta$ -маннозидах) (табл. 1). Кроме того, положения сигналов протонов углеводного цикла в соединениях (III $\alpha$ ) и (IV $\alpha$ ) совпадают с таковыми для аминозетильного производного маннозы [12].

Для получения целевого дисахарида проводили удаление всех ацильных групп обработкой защищенного производного (III $\beta$ ) 0.5 М раствором метилата натрия в метаноле с последующим введением Vd-группы обработкой  $\alpha, \alpha$ -диметокситолуолом в присутствии толуолсульфокислоты. Во избежание образования дибензилиденного производного реакцию проводили с небольшим избытком реагента, и даже в этом случае образуется бис-аддукт, и остается исходное соединение, что снижает выход целевого продукта (V $\beta$ ). Для се-

лективной защиты гидроксила при C3 маннозного остатка была выбрана бензоильная группа (Bz) [13], которую вводили обработкой 4,6-*O*-бензилиденного производного (V $\beta$ ) бензоилхлоридом в хлористом метиле при  $-18^\circ\text{C}$  в присутствии пиридина, и после хроматографической очистки получили гликозил-акцептор (VI $\beta$ ) с выходом 54% (на три стадии). Положение бензоильной группы подтверждено химическим сдвигом сигнала протона при C3 ( $\delta$  5.30 м.д.), он находится в том же месте, что и в полном ацетате (III $\beta$ ). О наличии свободной OH-группы при C2 свидетельствует химический сдвиг сигнала протона при C2 в сильном поле ( $\delta$  4.41 м.д.), в то время как соответствующий сигнал в полном ацетате (III $\beta$ ) составляет величину  $\delta$  5.49 м.д.

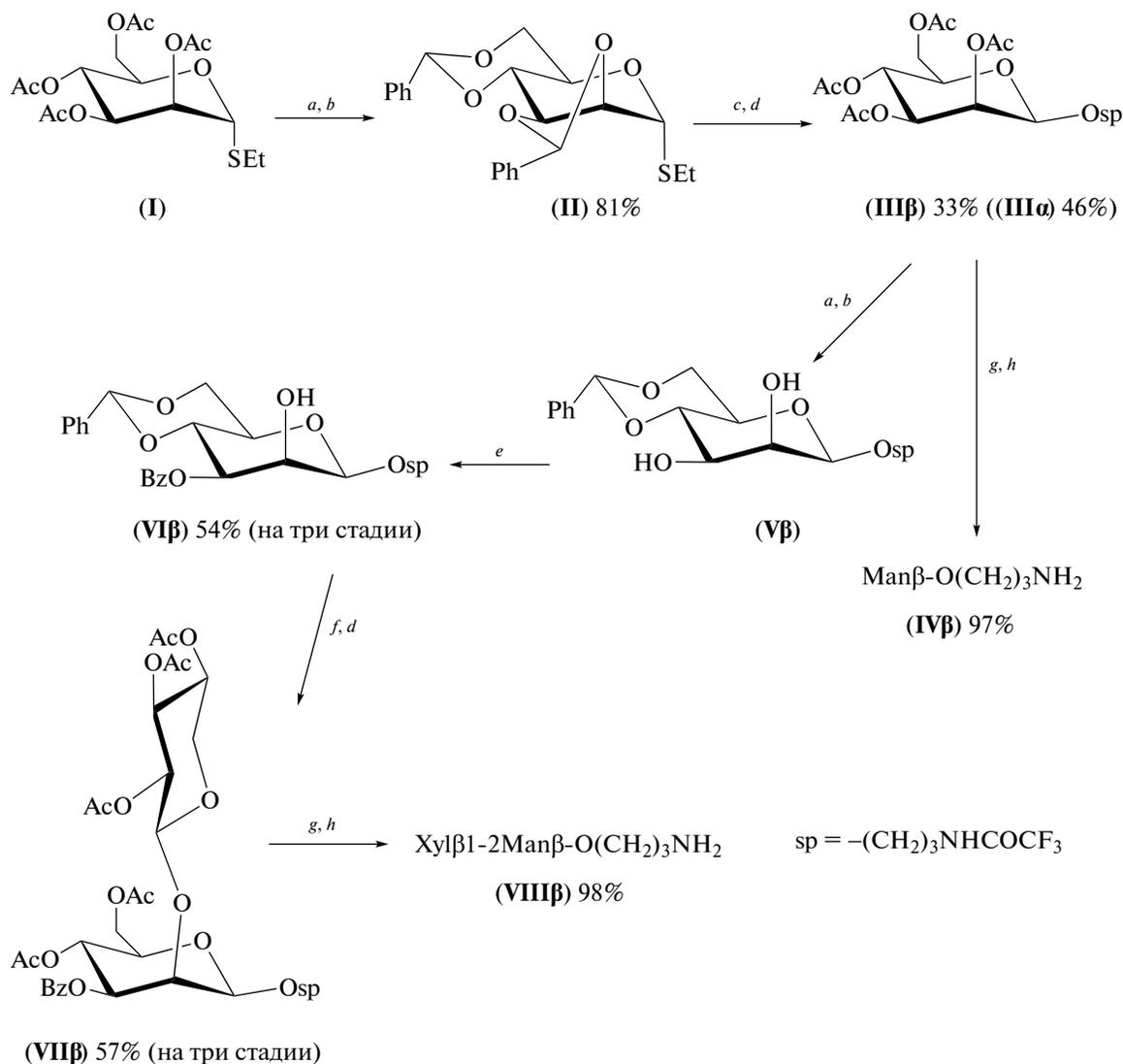
Соединение (VI $\beta$ ) гликозилировали ацетобромксилозой (X) (полученной из соответствующего полного ацетата (IX) [14] действием бромистого водорода в уксусной кислоте) методом Кенигса–Кнорра в присутствии трифлата серебра (AgOTf) и тетраметилмочевины (ТММ) в сухом хлористом метиле [15]. После удаления бензилиденной защитной группы, ацетилирования реакционной смеси и хроматографического выделения получили дисахарид (VII $\beta$ ) с выходом 57%. В спектре <sup>1</sup>H-ЯМР ацетата (VII $\beta$ ) сигналы протонов при C1, C2 и C3 ксилозного остатка представлены в виде двух уширенных синглетов, в которых КССВ  $J_{1,2}$  не определяется. Сильнопольное положение сигнала протона при C2 маннозы ( $\delta$  4.39 м.д.) свидетельствует о гликозилировании по этому положению. Конфигурацию остатка ксилозы в полученном дисахариде доказывали после его дезацетилирования и снятия *N*-трифторацетильной защиты. В спектре <sup>1</sup>H-ЯМР аминопропильного производного (VIII $\beta$ ) величины КССВ сигналов протонов при C1b ( $J_{1,2} 7.8$  Гц) и при C1a ( $J_{1,2} < 1$  Гц) подтверждают  $\beta$ -конфигурацию обоих пиранозных циклов.

Для оценки вклада  $\beta$ -маннозного фрагмента в связывание дисахарида (VIII $\beta$ ) с белками по аналогичной схеме из  $\alpha$ -маннозида (III $\alpha$ ) был синтезирован дисахарид с  $\alpha$ -маннозным остатком (VIII $\alpha$ ). В спектре <sup>1</sup>H-ЯМР величины КССВ сигналов протонов при C1b ( $J_{1,2} 7.8$  Гц) и при C1a ( $J_{1,2} 1.7$  Гц), а также химический сдвиг протона при C3 маннозного остатка ( $\delta$  3.80 м.д., табл. 1) подтверждают  $\beta$ -конфигурацию терминального ксилозного звена и  $\alpha$ -конфигурацию маннозного остатка в полученном дисахариде.

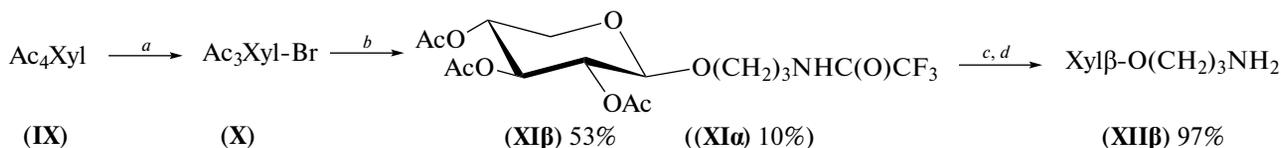
Для подтверждения специфичности связывания растительных белков с дисахаридом необходимо исключить взаимодействие с его моносахаридными фрагментами, для этого были получены маннозиды (описаны выше) и ксилозиды (описаны далее) в виде 3-аминопропилгликозидов. Гликозилированием 3-трифторацетамидопропанола

ацетобромксилозой (**X**) в хлористом метиле в присутствии  $\text{AgOTf}$  и ТММ после хроматографического разделения получили гликозид (**XI $\beta$** ) с выходом 53% и его аномер (**XI $\alpha$** ) с выходом 10% (схема 2). После их деацетилирования и снятия *N*-трифторацетильной защиты получили аминопропильные производные ксилозы (**XII $\beta$** ) и (**XII $\alpha$** ). Конфигурацию аномерного центра остат-

ка ксилозы определяли с помощью характеристической величины  $J_{1,2}$  в спектрах  $^1\text{H-NMR}$ : 7.8 Гц для  $\beta$ -аномера и 3.7 Гц для  $\alpha$ -аномера. Кроме того, положения сигналов протонов пиранозного цикла для соединений (**XI $\beta$** ) и (**XII $\beta$** ) практически совпадают с таковыми для аминоэтильного производного ксилозы [12].



**Схема 1.** Синтез дисахарида Xyl $\beta$ 1-2Man $\beta$ -Osp и его фрагмента Man $\beta$ -Osp. Реагенты и условия: *a* – 0.05 М MeONa/MeOH, 1 ч; *b* – PhCH(OMe)<sub>2</sub>, TsOH, MeCN; *c* – CF<sub>3</sub>C(O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>OH, NIS, TfOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20 мин; *d* – 80% водн. AcOH, 70°C, 2 ч, затем Ac<sub>2</sub>O/Py; *e* – BzCl, Py, –18°C, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; *f* – Ac<sub>3</sub>XylBr, AgOTf, ТММ, MS-4 $\text{\AA}$ , CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20°C, 16 ч; *g* – 0.1 М MeONa/MeOH 1 ч; *h* – 0.1 М водн. NaOH, 16 ч.



**Схема 2.** Синтез 3-аминопропильных ксилозидов. Реагенты и условия: *a* – AcBr, AcOH, MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; *b* – CF<sub>3</sub>C(O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>OH, AgOTf, ТММ, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MS-4 $\text{\AA}$ ; *c* – 0.1 М MeONa/MeOH, 1 ч; *d* – 0.1 М водн. NaOH, 16 ч.

Анализ спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР (DEPT) синтезированных соединений подтверждает структуру целевого дисахарида (**VIII $\beta$** ): сигналы C1a ( $\delta$  100.3 м.д.) маннозного фрагмента и C1b ( $\delta$  104.1 м.д.) ксилозного фрагмента хорошо согласуются с данными для 3-аминопропилгликозидов моносахаридов ( $\delta$  100.0 м.д. – C1 в соединении (**IV $\beta$** ), 103.0 м.д. – C1 в соединении (**XIII $\beta$** ) соответственно). Для его аномера (**VIII $\alpha$** ): сигналы C1a ( $\delta$  97.9 м.д.) маннозного фрагмента и C1b ( $\delta$  102.5 м.д.) ксилозного фрагмента хорошо согласуются с данными для 3-аминопропилгликозидов моносахаридов ( $\delta$  98.9 м.д. – C1 в соединении (**IV $\alpha$** ), 103.0 м.д. – C1 в соединении (**XIII $\beta$** ) соответственно). О наличии аминопропильного агликона во всех полученных соединениях свидетельствуют положения сигналов углеродов ( $\delta$  37.5–37.8 м.д.  $\text{C}_\text{N}_2\text{NH}_2$ ; 26.7–28.3 м.д.  $\text{OCH}_2\text{C}_\text{N}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ).

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Очистку и высушивание растворителей проводили по стандартным методикам и хранили над молекулярными ситами. Оптическое вращение измеряли на цифровом поляриметре DIP-360 (Jasco, Япония) при 20°C. Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР (DEPT) регистрировали на спектрометре AVANCE (Bruker BioSpin GmbH, Германия) при 25°C с рабочими частотами 700 и 176 Гц соответственно, значения химических сдвигов ( $\delta$ , м.д.) приведены с использованием  $\text{D}_2\text{O}$  ( $\delta = 4.75$ ) и  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta = 7.27$ ) в качестве внутренних стандартов, константы спин-спинового взаимодействия измерены в герцах. Отнесение сигналов в спектрах  $^1\text{H}$ -ЯМР проводили с помощью эксперимента 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY. Масс-спектры регистрировали на MALDI-TOF-спектрометре Vision-2000 (Thermo Bioanalysis Corp., Великобритания), в качестве матрицы использовали дигидроксibenзойную кислоту. Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на пластинках Kieselgel-60 (Merck, Германия), вещества обнаруживали 5%-ным водным раствором ортофосфорной кислоты при 150°C (углеводы) или раствором ninгидрина (5 г/л в смеси ацетон–уксусная кислота–вода, 95 : 1 : 4, амины). Колоночную хроматографию осуществляли на силикагеле Kieselgel 60 (0.004–0.063 мм; Merck, Германия). ТСХ свободных 3-аминопропилгликозидов проводили в системе А (метанол–1 М водный раствор  $\text{Ru}\cdot\text{AcOH}$ , 5 : 1).

**Ацетилирование (общая методика)** осуществляли смесью пиридина (Py) и уксусного ангидрида (2 : 1) при 20°C в течение 12–24 ч, затем реагенты соупаривали с толуолом.

**О-дезацетилирование (общая методика)** проводили по Земплени в сухом метаноле, добавляя к раствору ацилпроизводного раствор 2 М метилата натрия в метаноле до pH 8–9. По окончании ре-

акции ионы  $\text{Na}^+$  удаляли катионитом DOWEX 50X-400- $\text{H}^+$  (Acros, Бельгия), раствор упаривали.

**О-дезацетилирование и удаление N-трифтор-ацетильной защиты (общая методика)** проводили добавлением 100 мкл 2 М раствора метилата натрия в метаноле к раствору 0.05 ммоль защищенного соединения в 2 мл сухого метанола; через 1 ч раствор упаривали и добавляли 2 мл воды, через 16 ч хроматографировали на колонке с катионитом DOWEX 50X-400- $\text{H}^+$  (элюция 1 М водным раствором аммиака), раствор упаривали и лиофилизовали.

**Получение ацетобромксилозы (X).** К раствору 67 мг (0.21 ммоль) полного ацетата D-ксилозы (**IX**) в 2 мл сухого дихлорметана и 0.5 мл уксусной кислоты добавляли 0.25 мл (3.4 ммоль) бромистого ацетила, охлаждали до 0°C и добавляли 0.13 мл (3.2 ммоль) метанола; реакционную смесь выдерживали 1 ч при комнатной температуре и выливали в лед; органический слой разбавляли хлороформом и промывали последовательно водой, насыщенным раствором бикарбоната натрия, водой, фильтровали через слой ваты, упаривали, соупаривали с толуолом, сушили в вакууме и без дополнительной очистки в тот же день использовали в реакциях гликозилирования, считая выход бромида количественным.

**Гликозилирование (общая методика) в присутствии  $\text{AgOTf/TMM}$ :** смесь гликозилакцептора (0.1 ммоль), трифлата серебра (0.2 ммоль), TMM (0.2 ммоль) и 300 мг свежeproкаленных молекулярных сит 4 Å в 5 мл сухого хлористого метилена при комнатной температуре перемешивали 30 мин в темноте, добавляли раствор гликозилбромида (0.2 ммоль) в 2 мл хлористого метилена и перемешивали при комнатной температуре в течение 15–20 ч. Затем реакционную смесь фильтровали, фильтрат концентрировали в вакууме и выделяли продукт реакции хроматографией на силикагеле.

**(3-Трифторацетиламинопропил)-2,3,4,6-тетра-О-ацетил- $\beta$ -D-маннопиранозид (III $\beta$ ).** О-дезацетилирование 330 мг (0.84 ммоль) полного ацетата (**I**) [10] проводили по Земплени, без хроматографической очистки сухой остаток растворяли в 10 мл сухого ацетонитрила, добавляли 320 мг (2.1 ммоль)  $\alpha,\alpha$ -диметокситолуола и каталитические количества толуолсульфокислоты, через 1 ч реакционную смесь нейтрализовали пиридином, упаривали, соупаривали с толуолом. После хроматографического выделения (элюция толуол, затем толуол : этилацетат, 20 : 1) получили 270 мг (81%) тиогликозида (**II**). Смесь 3-трифторацетиламинопропанола (165 мкл, 1.35 ммоль), тиогликозида (**II**) (270 мг, 0.68 ммоль) и молекулярных сит 4 Å в 5 мл сухого хлористого метилена перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, добавляли 225 мг (1 ммоль) NIS и TfOH

(0.1 ммоль) в виде 0.1 М раствора в сухом хлористом метиле, перемешивали при комнатной температуре в течение 20–30 мин, фильтровали, фильтрат промывали последовательно 10%-ным раствором  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , водой, упаривали, соупаривали с толуолом. Без хроматографической очистки сухой остаток растворяли в 5 мл 80%-ной водной уксусной кислоты, выдержали 2 ч при 70°C, затем соупаривали с толуолом и проводили ацетилирование в 6 мл смеси пиридина и уксусного ангидрида (2 : 1). После хроматографического разделения реакционной смеси (элюция толуол–этилацетат, 1 : 1) получили 110 мг (33%) продукта (IIIβ) и 152 мг (46%) его аномера (IIIα).

**(3-Аминопропил)-β-D-маннопиранозид (IVβ).** Дез-*O*-ацетилированием и удалением *N*-трифтороацетильной защиты из 50 мг (0.1 ммоль) моносахарида (IIIβ) получили 23 мг (98%) продукта (IVβ).

**(3-Аминопропил)-α-D-маннопиранозид (IVα).** Дез-*O*-ацетилированием и удалением *N*-трифтороацетильной защиты из 50 мг (0.1 ммоль) моносахарида (IIIα) получили 21 мг (90%) продукта (IVα).

**(3-Трифторацетамидопропил)-4,6-бензилиден-3-бензоил-β-D-маннопиранозид (VIβ).** *O*-дезацетилирование 220 мг (0.44 ммоль) полного ацетата (IIIβ) проводили по Земплену, без хроматографической очистки сухой остаток растворяли в 12 мл сухого ацетонитрила, добавляли 80 мг (0.53 ммоль) α,α-диметокситолуола и каталитические количества толуолсульфонокислоты, через 1 ч реакционную смесь нейтрализовали пиридином, упаривали, соупаривали с толуолом. Сухой остаток растворяли в 4 мл сухого дихлорметана, содержащего пиридин (0.8 мл), охлаждали до –18°C и добавляли 56 мкл (0.48 ммоль) бензоилхлорида. Через 1 ч реакционную смесь разбавляли дихлорметаном, промывали 1 М раствором HCl, затем водой. Органический слой фильтровали через слой ваты, соупаривали с толуолом, хроматографировали на силикагеле (элюция толуол–этилацетат, 2 : 1) и получили 125 мг (54%) продукта (VIβ).

**(3-Трифторацетамидопропил)-2,3,4-три-*O*-ацетил-β-D-ксилопиранозил-(1→2)-3-бензоил-4,6-ди-*O*-ацетил-β-D-маннопиранозид (VIIβ).** Гликозилирование акцептора (VIβ) (125 мг, 0.24 ммоль) ацетобромксилозой (X), полученной из 151 мг (0.48 ммоль) полного ацетата (IX), проводили по общей методике, без хроматографической очистки сухой остаток растворяли в 5 мл 80%-ной водной уксусной кислоты, выдерживали 2 ч при 70°C, соупаривали с толуолом и ацетилировали 6 мл смеси пиридина и уксусного ангидрида (2 : 1). Хроматографией на силикагеле (элюция толуол–этилацетат, 3 : 2 → 1 : 1) получили 105 мг (57%) дисахарида (VIIβ).

**(3-Трифторацетамидопропил)-2,3,4-три-*O*-ацетил-β-D-ксилопиранозил-(1→2)-3-бензоил-4,6-ди-*O*-ацетил-α-D-маннопиранозид (VIIα).** Как описано

выше для синтеза (VIIIβ), из 200 мг соединения (IIIα) получили 60 мг продукта (VIIα).

**(3-Аминопропил)-β-D-ксилопиранозил-(1→2)-β-D-маннопиранозид (VIIIβ).** Дез-*O*-ацетилированием и удалением *N*-трифторацетильной защиты из 45 мг (0.058 ммоль) дисахарида (VIIβ) получили 20.5 мг (98%) продукта (VIIIβ).

**(3-Аминопропил)-β-D-ксилопиранозил-(1→2)-α-D-маннопиранозид (VIIIα).** Дез-*O*-ацетилированием и удалением *N*-трифторацетильной защиты из 50 мг (0.064 ммоль) дисахарида (VIIα) получили 22 мг (95%) продукта (VIIIα).

**(3-Трифторацетамидопропил)-2,3,4-три-*O*-ацетил-β-D-ксилопиранозид (XIβ).** Гликозилированием ацетобромксилозы (X), полученной из 318 мг (1 ммоль) полного ацетата (IX), 3-трифторацетамидопропанола (244 мкл, 2 ммоль) по общей методике после хроматографического разделения (элюция гексан–этилацетат, 1 : 1) получили 227 мг (53%) ксилопиранозид (XIβ) и 42 мг (10%) его аномера (XIα).

**(3-Аминопропил)-β-D-ксилопиранозид (XIIβ).** Дез-*O*-ацетилированием и удалением *N*-трифторацетильной защиты из 155 мг (0.36 ммоль) полного ацетата (XIβ) получили 72 мг (97%) моносахарида (XIIβ).

**(3-Аминопропил)-α-D-ксилопиранозид (XIIα).** Дез-*O*-ацетилированием и удалением *N*-трифторацетильной защиты из 42 мг (0.1 ммоль) полного ацетата (XIα) получили 18 мг (90%) моносахарида (XIIα).

Физико-химические характеристики (данные  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР, масс-спектров, оптическое вращение) синтезированных соединений приведены в дополнительных материалах.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Был синтезирован характерный для растительных гликопротеиновых цепей дисахаридный фрагмент  $\text{Xyl}\beta\text{1-2Man}\beta\text{-O}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$  (VIIIβ), а также некоторые его аналоги и частичные структуры, также необходимые для характеристики белков, узнающих целевой дисахарид, а именно  $\text{Xyl}\beta\text{1-2Man}\alpha\text{-O}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$  (VIIIα),  $\text{Xyl}\beta\text{-O}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$  (XIIβ),  $\text{Xyl}\alpha\text{-O}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$  (XIIα),  $\text{Man}\alpha\text{-O}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$  (IVα) и  $\text{Man}\beta\text{-O}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$  (IVβ). Строение всех полученных соединений подтверждено данными  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии (700 МГц) с использованием эксперимента COSY и данными масс-спектрометрии.

Полученные соединения вместе с другими (ранее синтезированными) гликанами и фрагментами полисахаридов вошли в состав гликанового эррея, с помощью которого в настоящее время изучается специфичность выделенных ранее индивидуальных лектинов, а также проводится по-

иск ксилоза-узнающих белков в составе растительных экстрактов.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-63-47110).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bardor M., Faveeuw C., Fichette A.C., Gilbert D., Galas L., Trottein F., Faye L., Lerouge P. // *Glycobiology*. 2003. V. 13. P. 427–434. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg024>
2. Gomord V., Fichette A.-C., Menu-Bouaouiche L., Saint-Jore-Dupas C., Plasson C., Michaud D., Faye L. // *Plant Biotechnol. J.* 2010. V. 8. P. 564–587. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00497.x>
3. Galanina O.E., Mecklenburg M., Nifantiev N.E., Pazylnina G.V., Bovin N.V. // *Lab. Chip.* 2003. V. 3. P. 260–265. <https://doi.org/10.1039/B305963D>
4. Blixt O., Head S., Mondala T., Scanlan C., Huflejt M.E., Alvarez R., Bryan M.C., Fazio F., Calarese D., Stevens J., Razi N., Stevens D.J., Skehel J.J., Die I., Burton D.R., Wilson I.A., Cummings R., Bovin N., Wong C., Paulson J.C. // *PNAS*. 2004. V. 101. P. 17033–17038. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407902101>
5. Navakouski M., Shilova N., Khasbiullina N., Feofanov A., Pudova E., Chen K., Blixt O., Bovin N. // *BioTechniques*. 2018. V. 64. P. 110–116. <https://doi.org/10.2144/btn-2017-0111>
6. Lichtenthaler F.W., Schneider-Adams T. // *J. Org. Chem.* 1994. V. 59. P. 6728–6734. <https://doi.org/10.1021/jo00101a035>
7. Mannino M.P., Demchenko A.V. // *Chem. Eur. J.* 2020. V. 26. P. 2927–2937. <https://doi.org/10.1002/chem.201905277>
8. Nigudkar S.S., Demchenko A.V. // *Chem. Sci.* 2015. V. 6. P. 2687–2704. <https://doi.org/10.1039/C5SC00280J>
9. Crich D., Sun S. // *Tetrahedron*. 1998. V. 54. P. 8321–8348. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(98\)00426-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(98)00426-8)
10. Alex C., Visansirikul S., Zhang Y., Yasomane J.P., Codee J., Demchenko A.V. // *Carbohydr. Res.* 2020. V. 488. P. 107900. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.107900>
11. Alex C., Visansirikul S., Demchenko A.V. // *Org. Biomol. Chem.* 2020. V. 18. P. 6682–6695. <https://doi.org/10.1039/D0OB01640C>
12. Sardzik R., Noble G.T., Weissenborn M.J., Martin A., Webb S.J., Flitsch S.L. // *Beilstein J. Org. Chem.* 2010. V. 6. P. 699–703. <https://doi.org/10.3762/bjoc.6.81>
13. Ma Z., Zhang J., Kong F. // *Carbohydr. Res.* 2004. V. 339. P. 1761–1771. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.04.012>
14. Bulman Page P.C., Chan Y., Liddle J., Elsegood M.R.J. // *Tetrahedron*. 2014. V. 70. P. 7283–7305. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2014.07.052>
15. Pazylnina G.V., Severov V.V., Bovin N.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2008. V. 34. P. 625–631. <https://doi.org/10.1134/S1068162008050129>

## Synthesis of Disaccharide Xyl $\beta$ 1-2Man $\beta$ , Which Is a Core Fragment of Plant N-Glycoproteins

S. V. Tsygankova\*, G. V. Pazylnina\*, A. S. Paramonov\*, A. O. Chizhov\*\*, and N. V. Bovin\* · #

# Phone: +7 (495) 330-03-00; e-mail: professorbovin@yandex.ru

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

\*\*N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 47, Moscow, 119991 Russia

The disaccharide Xyl $\beta$ 1-2Man $\beta$  was synthesized for the first time as a spacer-armed derivative. This structural fragment is typical of the N-chains of plant cell glycoproteins and is not found in mammals. It is assumed that plants have proteins that specifically recognize the Xyl $\beta$ 1-2Man $\beta$  motif; therefore, molecular probes based on this disaccharide are of interest for searching, isolating, and finding the cellular localization of such cognate proteins as lectins and enzymes.

*Keywords: synthesis of oligosaccharides,  $\beta$ -mannosylation, plant N-glycoproteins*



УДК 547.917:579.22

## ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРЫ И ГЕНОВ БИОСИНТЕЗА О-АНТИГЕНОВ *Azospirillum zeae* N7(T), *Azospirillum melinis* ТМСУ 0552(T) И *Azospirillum palustre* В2(T)

© 2022 г. Е. Н. Сигида\*, \*\*, #, В. С. Гринёв\*, Э. Л. Здоровенко\*\*, А. С. Дмитренко\*\*,  
Г. Л. Бурьгин\*, Н. К. Кондюрина\*\*\*, С. А. Коннова\*, \*\*\*, Ю. П. Федоненко\*

\*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ Саратовский научный центр РАН,  
Россия, 410049 Саратов, просп. Энтузиастов, 13

\*\*Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Россия, 119991 Москва, Ленинский просп., 47

\*\*\*Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского,  
Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83

Поступила в редакцию 09.11.2021 г.

После доработки 01.12.2021 г.

Принята к публикации 13.12.2021 г.

Впервые выделены и исследованы О-специфические полисахариды из липополисахаридов типовых штаммов трех видов бактерий: *Azospirillum zeae* N7, *Azospirillum melinis* ТМСУ 0552 и *Azospirillum palustre* В2. На основании результатов моносахаридного анализа, включающего определение абсолютной конфигурации моносахаридов, одномерной и двумерной спектроскопии <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-ЯМР установлено, что выделенные полисахариды состоят из разветвленных тетрасахаридных повторяющихся звеньев следующей структуры:  $\rightarrow 3$ - $\alpha$ -L-Rhap2OAc-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ ), описанной ранее для ряда штаммов азоспириллы, отнесенных к серогруппе III. Функции генов, ответственных за биосинтез О-антигенов, определены путем сравнения с последовательностями, представленными в доступных базах данных; показан высокий уровень их гомологии.

**Ключевые слова:** *Azospirillum*, липополисахарид, О-специфический полисахарид, структура бактериальных полисахаридов, кластер генов О-антигена

DOI: 10.31857/S0132342322030174

### ВВЕДЕНИЕ

Грамотрицательные альфа-протеобактерии рода *Azospirillum* широко распространены в ассоциациях с дикими и культурными злаками в различных климатических зонах [1]. Впервые азоспириллы были описаны в 1925 г., но получили широкую известность только после повторного “открытия” в 1970-х гг. в Бразилии [2], которое стало краеугольным камнем в изучении феномена ассоциативности и дало толчок развитию этой отрасли науки. За 40 лет исследований растительно-микробных ассоциаций с участием азоспириллы представления об их рост-стимулирующем действии эволюционировали от аддитивной гипотезы, заключающейся в способности фиксировать азот и продуцировать фитогормоны, до гипотезы множественных механизмов, включающей также улучшение минерального питания,

снижение биотических и абиотических стрессов, биоконтроль патогенов [1, 3]. На сегодняшний день род *Azospirillum* включает 22 вида [4], большинство из которых ризосферные, однако в последнее время все чаще сообщается о выделении новых видов из нехарактерных для азоспириллы экологических ниш, к примеру, сульфидных и термальных источников, оработанного дорожного покрытия, торфяных болот [5]. Высокий адаптационный потенциал этих бактерий объясняется избыточностью и пластичностью их генома и высокой долей генов, привнесенных путем горизонтального переноса [6].

Как наиболее изученные среди бактерий, стимулирующих рост и развитие растений, азоспириллы входят в состав биоудобрений и широко используются в ряде стран Южной Америки, приводя к значимому увеличению урожайности злаков – на 5–30% в 60–70% случаев полевых экспериментов [3, 7]. Для минимизации нежелательных эффектов при инокуляции азоспириллами необходимо учитывать ряд факторов, в их числе состояние аборигенной микрофлоры, уровень

Сокращения: ЛПБК – липополисахарид-белковый комплекс; ЛПС – липополисахарид; ОПС – О-специфический полисахарид.

# Автор для связи: (тел.: +7 (8452) 97-04-44; эл. почта: si\_elena@mail.ru).

минерального питания почвы, вариабельность сортов растений и характеристик используемых штаммов-иннокулятов с точки зрения оказываемого на растения рост-стимулирующего эффекта [8]. Расширение фундаментальных знаний о молекулярных механизмах ассоциативного взаимодействия растений и азоспирилл, с учетом штаммовой вариабельности, необходимо для повышения эффективности их использования в сельском хозяйстве.

Известно, что начальные стадии формирования ассоциаций, такие как прикрепление клеток, адсорбция и образование биопленок на поверхности корней, реализуются с участием гликополимеров, формирующих поверхность бактериальных клеток, — капсульных полисахаридов и липополисахаридов (ЛПС) [9]. ЛПС — основной структурный компонент внешней мембраны грамотрицательных бактерий, также он обнаруживается в составе экстраклеточных полимерных субстанций. В среде культивирования азоспирилл ЛПС находится в виде липополисахарид-белкового комплекса (ЛПБК) [9] и может использоваться бактериями в качестве источника углерода в условиях голодания [10]. Показана способность ЛПС азоспирилл к индукции деформации корневых волосков [10], повышению пероксидазной активности и продукции пероксида водорода, увеличению длины и массы корней у проростков пшеницы [11], а также их положительное влияние на морфогенность каллусов и выход растений-эксплантов [12].

ЛПС — амфифильная макромолекула, состоящая из трех доменов, связанных друг с другом ковалентными связями: гидрофобного липида А и гидрофильного полисахарида, включающего коровый олигосахарид и О-специфический полисахарид (ОПС) (О-антиген). Разнообразие природы моносахаридов, входящих в состав ОПС, в сочетании с различными типами связей между ними, предоставляет практически безграничные возможности структурного многообразия этих биополимеров, обуславливая серологическую вариабельность штаммов одного вида. В последние годы установлено более 20 типов повторяющихся звеньев ОПС для представителей семи видов азоспирилл: *A. brasilense*, *A. lipoferum* [13], *A. halopraeferens* [14], *A. dobereineriae* [15], *A. fermentarium* [16], *A. formosense* [17] и *A. rugosum* [18]. Большая часть ОПС — разветвленные гетерополисахариды, за исключением *A. baldaniorum* Sp245 и серологически родственной ему группы штаммов, а также типовых штаммов *A. dobereineriae* и *A. fermentarium*. Регулярность строения ОПС ряда штаммов азоспирилл маскируется наличием нескольких типов повторяющихся звеньев, а также нерегулярным метилированием и ацетилизацией моносахаридных остатков, что затрудняет применение данных о строении ОПС для построения хемо-

типических классификационных схем. В большинстве случаев типовые штаммы азоспирилл характеризуются наличием уникального по структуре ОПС, за исключением штамма *A. baldaniorum* Sp245(Т), для которого показано структурное родство ОПС с рядом штаммов *A. lipoferum* и *A. brasilense* [13], а также штамма *A. rugosum* DSM 19657(Т), имеющего в составе ОПС два полисахарида, обнаруженных ранее у *A. brasilense* Jm125A2 [18].

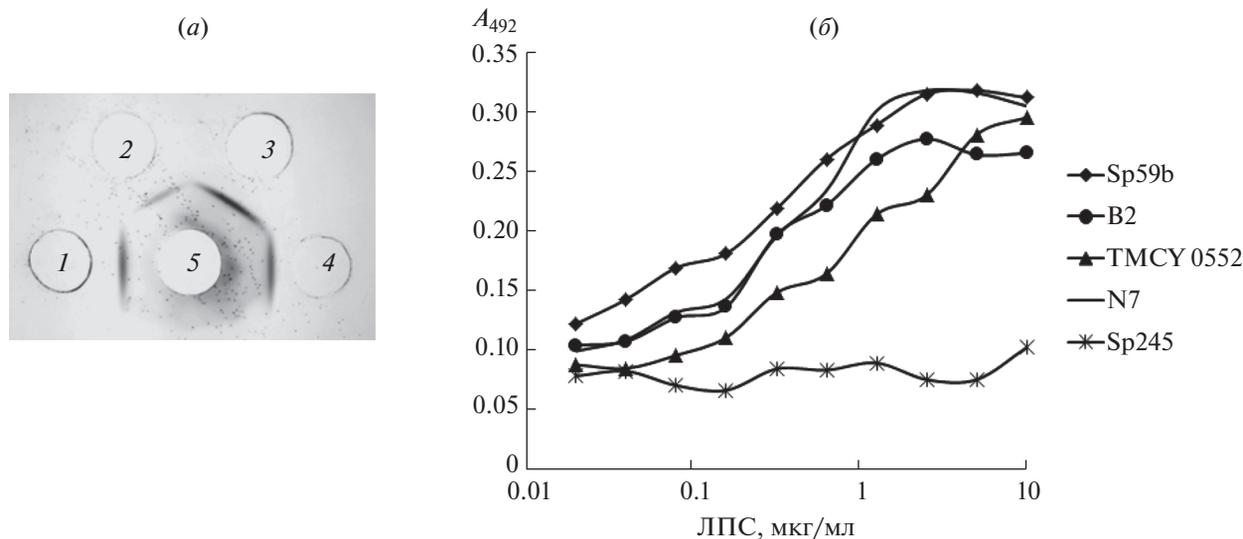
Биосинтез О-антигенов подробно изучен на примере энтеробактерий, у которых гены синтеза нуклеотидных предшественников моносахаридов, гены гликозилтрансфераз и гены трансмембранного переноса и полимеризации О-единиц, ответственные за синтез ОПС, обычно сгруппированы вместе в кластер, расположенный на хромосоме [19]. Сборка и синтез ОПС осуществляется по трем известным путям: Wzx/Wzy-зависимому пути, посредством ABC-транспортера или синтазы [19]. Для азоспирилл до сих пор не сообщалось о структуре кластера генов, ответственного за биосинтез О-антигена.

Цель настоящей работы — получение сведений о строении О-антигенов типовых штаммов ранее не изученных видов *A. zeaе* N7(Т) [20], *A. melinis* ТМСУ 0552(Т) [21] и *A. palustre* В2(Т) [5] и анализ генов, вовлеченных в биосинтез их ОПС.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате скрининга серологической специфичности экстрактов ЛПС ранее не изученных видов азоспирилл из Коллекции микробных культур ИБФРМ РАН были отобраны штаммы *A. zeaе* N7(Т), *A. melinis* ТМСУ 0552(Т) и *A. palustre* В2(Т), демонстрировавшие иммунохимический перекрест с антисыворотками к ЛПБК штамма *A. lipoferum* Sp59b. Наличие в составе поверхностных гликополимеров указанных штаммов эпитопов, обуславливающих серологический перекрест со штаммом *A. lipoferum* Sp59b, позволило отнести их к серогруппе III, представители которой характеризуются присутствием фрагмента  $\rightarrow 3$ - $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 3 в составе ОПС [13].

Детальный иммунохимический анализ был проведен с использованием препаратов ЛПС, выделенных водно-фенольной экстракцией из сухой биомассы исследуемых бактерий. В тесте двойной радиальной иммунодиффузии было детектировано слияние полос преципитации антител к ЛПБК штамма *A. lipoferum* Sp59b с гомологичными и исследуемыми антигенами (рис. 1а) и отсутствие взаимодействия с ЛПС *A. baldaniorum* Sp245 и *A. brasilense* Sp7, *A. brasilense* Jm6B2, *A. brasilense* SR80. В ИФА наблюдались межштаммовые различия в интенсивности взаимодействия антиген-антитело, однако тенденция взаимодействия



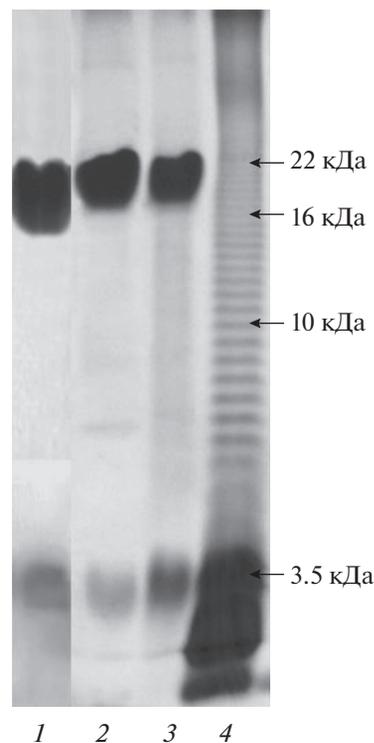
**Рис. 1.** (а) – Результат двойной радиальной иммунодиффузии препаратов липополисахаридов *A. palustre* B2 (1), *A. melinis* TMCY 0552 (2), *A. zeae* N7 (3) и *A. lipoferum* Sp59b (4) с антителами к липополисахарид-белковому комплексу *A. lipoferum* Sp59b (5); (б) – результат иммуноферментного анализа препаратов липополисахаридов исследуемых штаммов с антителами к липополисахарид-белковому комплексу *A. lipoferum* Sp59b.

ЛПС изучаемых штаммов с антителами была сходна гомологичному антигену (рис. 1б).

Электрофоретический анализ выделенных препаратов ЛПС в SDS-ПААГ с последующим окрашиванием нитратом серебра демонстрировал превалирование ОПС-содержащих фракций, визуализирующихся в верхней части трека, а также наличие в нижней части трека высокоподвижных фракций, содержащих кор и липид А (рис. 2). В отличие от ЛПС гамма-протеобактерии *Pseudomonas putida* TSh-18, представлявшего собой смесь молекул в широком диапазоне молекулярной массы, отличающихся на одно повторяющееся звено, у ЛПС азоспирилл наблюдалось преобладание фракций ЛПС в диапазоне молекулярных масс 20–25 кДа. Высокомолекулярная природа ЛПС исследуемых штаммов свидетельствует о доминировании S-форм молекул, следовательно, идентичные или сходные антигенные детерминанты, обуславливающие перекрест со штаммом Sp59b, могут быть локализованы в составе их ОПС.

Выполнен анализ состава и физико-химических свойств ЛПС и структуры ОПС исследуемых штаммов для выявления химической природы серологического перекреста. Анализ состава жирных кислот ЛПС методом ГЖХ после получения соответствующих метиловых эфиров выявил преобладание во всех препаратах 3-гидрокситетрадекановой и 3-гидроксигексадекановой кислот, суммарное содержание которых превышало 70% от суммы всех идентифицированных производных, а также присутствие гексадекановой, гексадеценовой и октадеценовой кислот. Учитывая

консервативность строения липида А в пределах бактериального рода, профиль жирных кислот исследуемых штаммов согласовывался с данны-



**Рис. 2.** Электрофореграмма препаратов липополисахаридов в 13.5%-ном ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия: *A. palustre* B2 (1), *A. zeae* N7 (2), *A. melinis* TMCY 0552 (3), *P. putida* TSh-18 (4).

**Таблица 1.** Данные динамического рассеяния света для водных растворов липополисахаридов *A. palustre* B2 и *A. zeae* N7

Штамм	Показатели динамического рассеяния света				
	$I$ , kcps	$d_m$ , нм	$\zeta$ -потенциал, мВ	$N_{отн}$ , %	$C_{отн}$ , %
<i>A. zeae</i> N7(T)	$644 \pm 4$	$27.5 \pm 0.9$	$-9.02 \pm 0.24$	$100.0 \pm 17.9$	$100.0 \pm 8.7$
<i>A. palustre</i> B2(T)	$951 \pm 7$	$41.0 \pm 2.6$	$-5.50 \pm 0.10$	$10.6 \pm 3.4$	$37.1 \pm 6.7$

ми, полученными ранее для ЛПС представителей других видов азоспиррилл [15–18].

В силу амфифильной природы в водных растворах препараты ЛПС могут формировать надмолекулярные комплексы (мицеллы). Основная движущая сила самоагрегации ЛПС – гидрофобное взаимодействие между ацильными цепями липида А. Размер мицелл определяется строением липида А и ОПС и соотношением этих компонентов в препарате ЛПС [22], таким образом, при схожести строения отдельных структурных компонентов ЛПС могут существенно отличаться по функциональной активности, т.к. различным образом агрегируют в водных растворах. Измерение методом динамического рассеяния света размера и  $\zeta$ -потенциала мицелл (табл. 1), образованных из молекул ЛПС *A. zeae* N7(T) и *A. palustre* B2(T), выявило, что оба препарата в концентрации 2 мг/мл при температуре 37°C в водной среде образовывали отрицательно заряженные мицеллы размером 27.5 и 41.0 нм соответственно. Интенсивность рассеяния света ( $I$ ) раствора ЛПС *A. palustre* была в 1.5 раза выше таковой для ЛПС *A. zeae*. Поскольку электрофоретический анализ не выявил значительных отличий в степени полимеризации ОПС исследуемых штаммов, наблюдаемые отличия в размере мицелл их ЛПС могут быть обусловлены микрогетерогенностью строения липида А (соотношением форм с различной степенью ацилирования). Определение относительной численной концентрации ( $N_{отн}$ ) и относительной массово-объемной концентрации ( $C_{отн}$ ) по формулам, описанным нами ранее [23], показало, что в исследованных условиях количество мицелл, образованных ЛПС *A. palustre* B2(T), и количество ЛПС, участвующего в мицеллообразовании, существенно ниже, чем ЛПС *A. zeae* N7(T).

ОПС исследуемых штаммов были получены мягким кислотным гидролизом ЛПС с последующей гель-фильтрацией. Анализ моносахаридного состава методом ГЖХ ацетатов полиолов, полученных после полного кислотного гидролиза всех препаратов ОПС, позволил идентифицировать в их составе наличие Rha и Glc в соотношении ~3 : 1 (отклик детектора). В результате анализа ГЖХ ацетилированных (S)-2-октилглицозидов

была установлена D-конфигурация Glc и L-конфигурация остатков Rha.

Структура ОПС изучаемых штаммов была установлена с применением 1D и 2D  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии. Спектры  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ОПС исследуемых штаммов были практически идентичны (рис. 3), что свидетельствовало о структурном сходстве О-антигенов.

$^1\text{H}$ -ЯМР-спектр содержал пять сигналов в слабopольной области при  $\delta$  4.63–5.24, сигналы метильных групп рамнозы при  $\delta$  1.26–1.32, сигнал О-ацетильной группы при  $\delta$  2.21 и сигналы протонов моносахаридных циклов при  $\delta$  3.31–4.39.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр содержал сигналы четырех аномеров при  $\delta$  99.8–105.3, сигналы метильных групп рамнозы при  $\delta$  17.8–18.0, сигнал О-ацетильной группы при  $\delta$  22.2 ( $\text{CH}_3$ ),  $\delta$  175.5 (CO), сигнал  $\text{CH}_2\text{OH}$ -группы при  $\delta$  62.2 и сигналы углерода моносахаридных циклов при  $\delta$  70.3–81.3. Отсутствие в спектре сигналов углерода моносахаридных циклов в области  $\delta$  83–88 свидетельствовало о пиранозной форме моносахаридных остатков [24].

Сигналы  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров были отнесены с применением 2D-спектров ЯМР (гомядерные эксперименты  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY, TOCSY, ROESY и гетероядерные эксперименты  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC и HMBSC). Химические сдвиги сигналов моносахаридных остатков приведены в табл. 2. На основании внутризвеньевых корреляций H, H и H, C и констант спин-спиновой взаимодействия  $^3J_{\text{H,H}}$  были идентифицированы спин-спиновые системы четырех моносахаридов: А, В и С, имеющих манно-конфигурацию, и D, имеющего глюко-конфигурацию. Спектр TOCSY продемонстрировал наличие H1/H2 и H2/H3 – H-6 кросспиков для остатков А–С и H1/H2 – H-6 кросспики для остатка D. Сигналы внутри каждой спин-спиновой системы были отнесены с помощью спектров COSY.

Альфа-конфигурация остатков А–С и бета-конфигурация остатка D были установлены на основании характеристических химических сдвигов сигналов C-5 при сравнении с литературными данными [24, 25].

Позиции замещения моносахаридов были установлены на основании сдвига в слабое поле сигналов C2 и C3 остатка А, C-3 остатков В и С

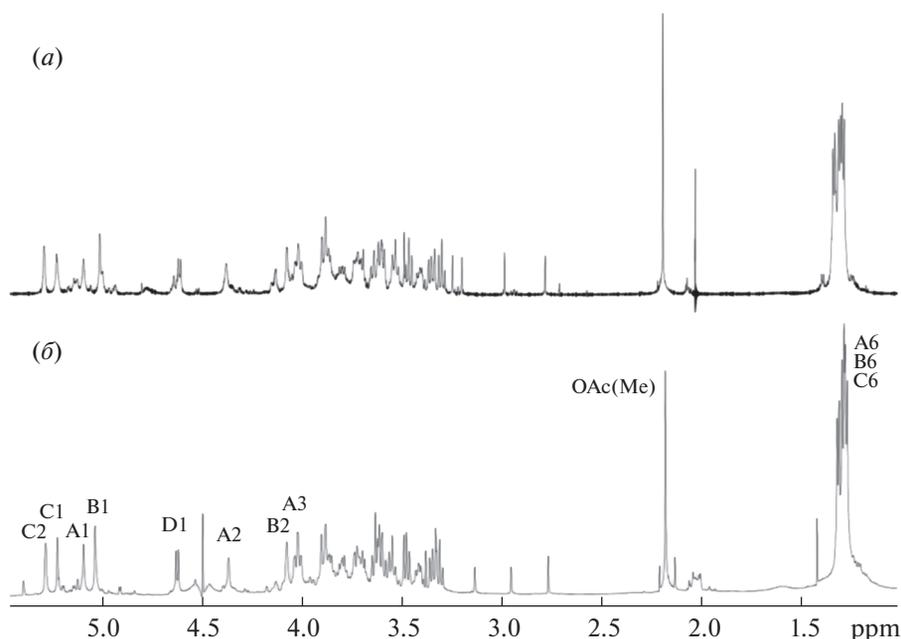


Рис. 3.  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектры O-специфических полисахаридов *A. palustre* B2 (а) и *A. zeae* N7 (б).

по сравнению с соответствующими незамещенными моносахаридами [24, 25]. Химические сдвиги C2–C6 остатка **D** были близки к таковым O-метил- $\beta$ -Glcр [24] и указывали на то, что остаток **D** занимает терминальное положение в боковой цепи. Последовательность моносахаридов была установлена на основании спектров ROESY, которые демонстрировали межзвеньевые корреляции между аномерными протонами и протонами при трансгликозидных связях: **A** H1/B H3 при  $\delta$  5.11/3.74; **B** H1/C H3 при  $\delta$  5.03/4.04, **C** H1/A H2 при  $\delta$  5.24/4.39, **D** H1/A H3 при  $\delta$  4.63/4.03. В спектрах  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -HMBC наблюдались соответствующие корреляции между аномерными протонами и атомами углерода при гликозидной связи: **A** H1/B C3 при  $\delta$  5.11/78.6; **B** H1/C C3 при  $\delta$

5.03/77.0, **C** H1/A C2 при  $\delta$  5.24/78.5, **D** H1/A C3 при  $\delta$  4.63/81.3.

На основании проведенных исследований была идентифицирована структура повторяющегося звена ОПС исследуемых микроорганизмов: три остатка рамнозы в основной цепи и остаток глюкозы в боковой цепи (рис. 4). На основании интегральной интенсивности сигналов аномерного протона остатка **C** с ацетильной и без ацетильной групп ( $\delta_{\text{H}}$  5.13 м.д. [26]) степень ацетилирования остатка **C** составила  $\sim 75\%$ . Данная структура повторяющихся звеньев ОПС распространена среди азоспирилл серогруппы III, для которых продемонстрирована различная степень ацетилирования остатка Rha [13]. Наблюдаемое сходство строения O-антигенов различных видов бактерий может служить косвенным подтверждением ши-

Таблица 2. Данные  $^2\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров O-специфического полисахарида *A. zeae* N7(T) (химические сдвиги, м.д.)

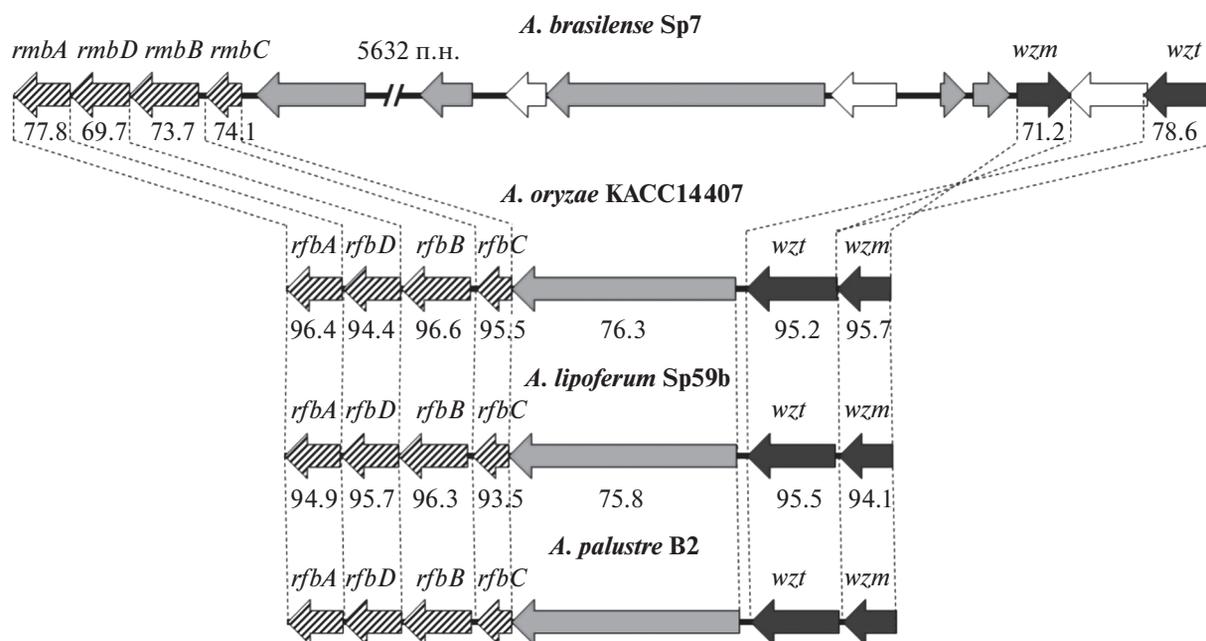
Моносахаридный остаток	H1	H2	H3	H4	H5	H6 (6a; 6b)
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
$\rightarrow 2,3$ - $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ <b>A</b>	5.11 102.2	4.39 78.5	4.03 81.3	3.64 72.4	3.88 70.3	1.32 18.0
$\rightarrow 3$ - $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ <b>B</b>	5.03 103.3	4.08 71.1	3.74 78.6	3.55 72.7	3.72 70.7	1.28 17.9
$\rightarrow 3$ - $\alpha$ -L-Rhap2OAc-(1 $\rightarrow$ <b>C</b>	5.24 99.8	5.30 73.0	4.04 77.0	3.61 73.1	3.81 70.6	1.26 17.8
$\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ <b>D</b>	4.63 105.3	3.35 74.9	3.48 76.9	3.31 71.0	3.42 77.1	3.61; 3.90 62.2



Таблица 3. Белки биосинтеза О-антигена *A. oryzae* КАСС 14407, *A. lipoferrum* Sp59b и *A. palustre* B2 и их ближайшие гомологи

Ген	Кодируемый белок	Штамм (код доступа)					
		<i>A. oryzae</i> КАСС 14407 (CP054615.1)		<i>A. lipoferrum</i> Sp59b (VTTN01000010.1)		<i>A. palustre</i> B2 (GCF_002573965.1)	
		CDS (ID белка)	ближайший гомолог* покрытие/ идентичность, % (длина совпадающего фрагмента, п.н.)	CDS (ID белка)	ближайший гомолог* покрытие/ идентичность, % (длина совпадающего фрагмента, п.н.)	CDS (ID белка)	ближайший гомолог* покрытие/ идентичность, % (длина совпадающего фрагмента, п.н.)
<i>wzm</i>	ABC-транспортная пермеаза	9766..10596 (QKS48944.1)	<i>Nitrospira</i> sp. (МСА9458094.1) 97/62 (271)	218879..219706 (КАА0593813.1)	<i>Nitrospira</i> sp. (МСА9458094.1) 97/61 (271)	296241..297647 (WP_204561567.1)	<i>Nitrospira</i> sp. (МСА9458094.1) 94/62 (271)
<i>wzi</i>	ABC-транспортный АТР-связывающий белок	8349..9710 (QKS49155.1)	<i>Nitrospira</i> sp. (МСА9497562.1) 97/65 (450)	217471..218874 (КАА0593866.1)	<i>Nitrospira</i> sp. (МСА9497562.1) 96/64 (450)	297652..298500 (WP_098734702.1)	<i>Oleisolibacter albus</i> (WP_114395858.1) 94/67 (449)
GT	Гликозилтрансфераза	4647..8171 (QKS48943.1)	<i>Mesorhizobium</i> sp. LNHC221B00 (ESY81438.1) 93/47 (1121)	213844..217302 (КАА0593812.1)	<i>Mesorhizobium</i> sp. LNHC232B00 94/46 (1121)	292593..296072 (WP_092859550.1)	<i>Mesorhizobium</i> sp. (TIR25666.1) 94/46 (1115)
<i>rfbC</i>	dTDP-4-дегидроманнозо-3,5-эпимераза	4092..4643 (QKS48942.1)	<i>Methylobacterium</i> sp. B34 (WP_042673940.1) 100/94 (183)	213289..213840 (КАА0593811.1)	<i>Methylobacterium</i> sp. B34 (WP_042673940.1) 100/91 (183)	292038..292589 (WP_098734700.1)	<i>Albimonas pacifica</i> (WP_092859550.1) 100/73 (183)
<i>rfbB</i>	dTDP-глюкозо-4,6-дегидратаза	2951..4018 (QKS48941.1)	<i>Pararhodospirillum photometricum</i> (WP_051013520.1) 98/80 (353)	212136..213203 (КАА0593810.1)	<i>P. photometricum</i> DSM 122 (CCG06590.1) 98/80 (358)	289986..290876 (WP_098734699.1)	<i>P. photometricum</i> DSM 122 (CCG06590.1) 98/80 (358)
<i>rfbD</i>	dTDP-4-дегидроманнозоредуктаза	2052..2942 (QKS49154.1)	<i>P. photometricum</i> DSM 122 (CCG06589.1) 97/63 (300)	211237..212127 (КАА0593809.1)	<i>P. photometricum</i> DSM 122 (CCG06589.1) 97/63 (300)	290873..291940 (WP_098734698.1)	<i>P. photometricum</i> DSM 122 (CCG06589.1) 97/62 (300)
<i>rfbA</i>	Глюкозо-1-фосфат-тимидилтрансфераза	1177..2040 (QKS48940.1)	<i>P. photometricum</i> (WP_041795448.1) 100/79 (288)	210362..211225 (КАА0593808.1)	<i>P. photometricum</i> (WP_041795448.1) 100/79 (288)	289108..289971 (WP_098734697.1)	<i>P. photometricum</i> (WP_041795448.1) 98/81 (288)

Примечание: CDS — кодирующая последовательность (CoDing Sequence). \* Бактериальный таксон (код GenBank ближайшего гомолога).



**Рис. 5.** Схематическое расположение кластеров генов биосинтеза L-Rha. Заштрихованными стрелками обозначены гены синтеза L-Rha, серыми — аннотированные гликозилтрансферазы, темно-серыми — гены процессинга *wzl* и *wzm*, белыми — гены с неизвестными функциями.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Культивирование бактерий.** Штаммы *A. melinis* TMCY 0552 (IBPPM 547), *A. zeaе* N7 (IBPPM 550) и *A. palustre* B2(T) (IBPPM 633) предоставлены Коллекцией ризосферных микроорганизмов Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (г. Саратов, Россия). Культивирование бактерий проводили в жидкой малотно-солевой среде с витаминами [27] до окончания экспоненциальной фазы роста при температуре 30°C и перемешивании на вибростенде. Клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали в 0.15 М растворе NaCl и смывали с поверхности капсульный материал механическим перемешиванием в течение 5 сут с ежедневной сменой отмывающего раствора.

**Выделение ЛПС и ОПС.** ЛПС выделяли из высушенных ацетоном бескапсульных клеток горячим 45%-ным водным раствором фенола без разделения слоев [28]. Примеси белков осаждали из раствора ЛПС добавлением 40%-ной  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  до конечного значения pH 2.7. Растворы диализовали против дистиллированной воды, концентрировали на роторном испарителе Laborota 4000 (Heidolph, Германия) и лиофилизовали на лиофильной сушке Bench Top VirTis (США). Деградацию ЛПС проводили 2%-ной  $\text{CH}_3\text{COOH}$  при 100°C в течение 4 ч. Супернатант, содержащий ОПС, разделяли гель-хроматографией на колонке с Sephadex G-50 Fine (GE Healthcare, США) в 0.025 М пиридин-ацетатном буфере, контроли-

руя элюцию с помощью дифференциального проточного рефрактометра (Кнауер, Германия). Фракцию высокомолекулярного О-специфического полисахарида концентрировали и лиофилизовали.

**Электрофорез** препаратов ЛПС выполняли в 13.5%-ном SDS-ПААГ [29]. Визуализацию компонентов осуществляли окрашиванием гелей красителем на основе азотнокислого серебра [30].

**Динамическое рассеяние света** растворами, приготовленными из лиофилизованных препаратов ЛПС в деионизованной воде (Milli-Q) в концентрации 2.0 мг/мл, измеряли с использованием установки Malvern Nano-ZS (Malvern, Великобритания) в пластиковых 4-сторонних кюветах (10 мм) (Sarstedt, Германия). Измерения проводили при 37°C и фиксированной фокусировке гелей-неонового лазера ( $\lambda = 633$  нм в вакууме) в центре кюветы (4.65 мм) и постоянном диаметре диафрагмы (установленный аттенюатор: 7). Определяли интенсивность рассеяния света под углом 173° (выраженную в единицах скорости счета числа фотонов —  $\text{kcps}$ ) и поправочную функцию флуктуаций интенсивности рассеяния во времени. По этим данным производили оценку наиболее вероятного мода гидродинамического диаметра ( $d_m$ ) мицелл. Относительные значения числовой концентрации ( $N_{\text{отн}}$ ) и массово-объемной концентрации диспергированных биополимерных веществ ( $C_{\text{отн}}$ ) определяли по уравнению из работы Burygin et al. [23].  $\zeta$ -Потен-

циал мицелл ЛПС (2.0 мг/мл) измеряли при 37°C с помощью системы Malvern Nano-ZS (Malvern, Великобритания). Измерения проводили с настройками по умолчанию, рекомендованными производителем.

**Иммунохимические исследования** ЛПС проводили с использованием поликлональных антител кролика к ЛПБК *A. lipoferum* Sp59b методами двойной радиальной иммунодиффузии [31] и твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Преципитат в иммунодиффузии окрашивали кумасси голубым R-250. Взаимодействие антигенов и антител в ИФА детектировали в полистироловых 96-луночных планшетах, используя козы антикроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, при добавлении перекиси водорода и *o*-фенилендиамина. Измерения оптической плотности исследуемых проб проводили при длине волны 490 нм на иммуноферментном анализаторе Tescan (Thermo Fisher Scientific, США).

**Анализ моносахаридного состава и абсолютных конфигураций сахаров** после гидролиза ОПС 2 М CF<sub>3</sub>COOH (120°C, 2 ч) осуществляли методом ГЖХ ацетатов полиолов [32] и ацетилированных 2-(*S*)-октилглюкозидов [33] на хроматографе Hewlett-Packard 7820A с капиллярной колонкой HP-5 (Hewlett-Packard, США). Градиент температуры от 160°C (1 мин) до 290°C, скорость нагрева 7°C/мин.

**Состав жирных кислот.** Состав жирных кислот ЛПС в виде метиловых эфиров жирных кислот определяли с помощью ГЖХ на хроматографе GC-2010 (Shimadzu, Япония), снабженном колонкой DB-5 (Agilent, США). Метилирование выполняли методом, описанным в работе Mayer et al. [34].

**ЯМР-спектроскопия.** Спектры ЯМР записывали на спектрометре DRX-600 (Bruker, Германия) в растворе 99.96%-ной D<sub>2</sub>O при 30°C (внутренний стандарт – триметилсилилпропаноат-*d*<sub>4</sub>, δ<sub>C</sub> – 1.6 и δ<sub>H</sub> 0.0). Образцы предварительно лиофилизовали дважды из 99.9%-ной D<sub>2</sub>O. Двумерные спектры записывали с использованием стандартного математического обеспечения компании Bruker (Германия); для сбора и обработки данных использовали программу TOPSPIN 2.1. В экспериментах TOCSY и NOESY время смешивания составляло 150 и 200 мс соответственно.

**Анализ генов биосинтеза О-антигенов.** Гены биосинтеза L-Rha были извлечены из полногеномных сиквенсов *A. brasilense* Sp7 (GenBank: AN013753.2), *A. oryzae* KACC 14407 (CP054615.1) и *A. lipoferum* Sp59b (VTTN01000010.1) и из доступных предварительных данных полногеномного сиквенса *A. palustre* B2 (GCF\_002573965.1, сборка ASM257396v1). Предсказание функций идентифицированных последовательностей генов про-

водили путем выравнивания соответствующих и известных белковых последовательностей (полученных из GenBank), участвующих в биосинтезе О-антигенов других бактерий, с помощью инструмента BLASTn [35]. Трех- и четырехбуквенные обозначения генов *A. brasilense* Sp7 приведены в соответствии с аннотацией GenBank. Трехбуквенные (*wzm* и *wzi*) и четырехбуквенные обозначения (*rfaA–rfbD*) присвоены генам *A. oryzae* KACC 14407, *A. lipoferum* Sp59b и *A. palustre* B2 в соответствии с их аннотациями, а также результатами попарных выравниваний их нуклеотидных последовательностей. Изображение генных кластеров изучаемых штаммов азоспирилл было получено с помощью визуализатора Easyfig версии 2.2.5 [36]. Гомологию нуклеотидных последовательностей генов оценивали с помощью попарных выравниваний соответствующих последовательностей, выполненных с помощью программы BLASTn.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гликанам клеточной поверхности ризобактерий отводится важная роль на всех этапах существования популяции клеток, как при жизни в почве и ризосфере, так и при формировании симбиотических отношений с растениями. Липополисахариды – конструктивные компоненты клеточной стенки бактерий, которые могут экспортироваться в окружающую среду. Полисахариды, формируя внешний слой клеточной поверхности грамотрицательных бактерий, составляют основу для защиты клетки от неблагоприятного воздействия экстраклеточного окружения, а в случае симбиотических микроорганизмов они играют важную роль во взаимодействии с эукариотическими клетками организма-хозяина.

Прогресс в изучении структурных особенностей строения ЛПС (в том числе их ОПС) грамотрицательных бактерий во многом обусловлен их ролью в развитии патофизиологических процессов, сопровождающих бактериальные инфекции человека и животных. Эти молекулы вызывают иммунный ответ организма животных и человека и распознаются их антителами, что успешно применяется в клинике для идентификации и классификации патогенных бактерий. Коллекции О-антиген-специфичных антисывороток используются для классификации грамотрицательных организмов в серологическом тестировании, что эффективно и для непатогенных микроорганизмов, к которым относятся и почвенные диазотрофы рода *Azospirillum*.

У *E. coli* нуклеотидные последовательности генных кластеров биосинтеза О-антигенов могут использоваться в качестве генетических маркеров для штаммовой идентификации этих бактерий [37]. Бактерии рода *Azospirillum* в этом отношении исследованы явно недостаточно. В настоящей ра-

боте представлены результаты анализа структур ОПС представителей трех ранее не изученных в этом отношении видов азоспирилл, а также выявления в их геномах генных кластеров, ответственных за биосинтез О-антигенов, с высоким уровнем идентичности. Используемый подход может быть весьма эффективным для дальнейшей молекулярной серодиагностики азоспирилл по генным кластерам их О-антигенов, учитывая тот факт, что для представителей этого рода весьма характерно явление молекулярной мимикрии [13]. При этом следует отметить, что идентичность структур О-антигенов не приводит к унификации свойств поверхности этих микроорганизмов, возможно, в силу многообразия экспонированных биомакромолекул либо в силу выявленных в ходе представленных исследований различий в мицеллообразовании амфифильных молекул ЛПС в водном растворе.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность д.х.н., проф. А.С. Шашкову за регистрацию ЯМР-спектров *A. zeaе* и *A. melinis*.

В работе использованы ресурсы Центра коллективного пользования “Симбиоз” при Институте биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cassán F., Coniglio A., López G., Molina R., Nievas S., Le Noir de Carlan C., Donadio F., Torres D., Rosas S., Olivera P.F., de Souza E., Díaz Zorita M., de-Bashan L., Mora V. // Biol. Fertil. Soils. 2020. V. 56. P. 461–479. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>
2. Döbereiner J., Marriel I.E., Nery M. // Can. J. Microbiol. 1976. V. 22. P. 1464–1473. <https://doi.org/10.1139/m76-217>
3. Bashan Y., de-Bashan L.E. // Adv. Agron. 2010. V. 108. P. 77–136. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(10\)08002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)08002-8)
4. Genus *Azospirillum* // In: List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (LPSN). <https://bacterio.net/genus/azospirillum>
5. Tikhonova E.N., Grouzdev D.S., Kravchenko I.K. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2019. V. 69. P. 2787–2793. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003560>
6. Wisniewski-Dyé F., Borziak K., Khalsa-Moyers G., Alexandre G., Sukharnikov L.O., Wuichet K., Hurst G.B., McDonald W.H., Robertson J.S., Barbe V., Calteau A., Rouy Z., Mangenot S., Prigent-Combaret C., Normand P., Boyer M., Siguier P., Dessaux Y., Elmerich C., Condemine G., Krishnen G., Kennedy I., Paterson A.H., González V., Mavingui P., Zhulin I.B. // PLoS Genet. 2011. V. 7. P. e1002430. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002430>
7. Bomfim C.A., Coelho L.G.F., do Vale H.M.M., de Carvalho Mendes I., Megias M., Ollero F.J., Dos Reis Junior F.B. // Braz. J. Microbiol. 2021. V. 52. P. 2215–2232. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00618-9>
8. Cassán F., Diaz-Zorita M. // Soil Biol. Biochem. 2016. V. 103. P. 117–130. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13150.x>
9. Skvortsov I.M., Ignatov V.V. // FEMS Microbiol Lett. 1998. V. 165. P. 223–229. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13150.x>
10. Sigida E.N., Fedonenko Y.P., Shashkov A.S., Toukach P.V., Shelud'ko A.V., Zdorovenko E.L., Knirel Y.A., Konnova S.A. // Int. J. Biol. Macromol. 2019. V. 126. P. 246–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.229>
11. Hernández-Esquivel A.A., Castro-Mercado E., García-Pineda E. // J. Plant Growth Regul. 2021. V. 40. P. 1903–1911. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10241-x>
12. Tkachenko O.V., Burygin G.L., Evseeva N.V., Fedonenko Y.P., Matora L.Y., Lobachev Y.V., Shchyogolev S.Y. // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2021. V. 147. P. 147–155.
13. Fedonenko Y.P., Sigida E.N., Konnova S.A., Ignatov V.V. // Russ. Chem. Bull. 2015. V. 64. P. 1024–1031. <https://doi.org/10.1007/s11172-015-0971-x>
14. Sigida E.N., Fedonenko Y.P., Shashkov A.S., Arbatsky N.P., Zdorovenko E.L., Konnova S.A., Ignatov V.V., Knirel Y.A. // Beilstein J. Org. Chem. 2016. V. 12. P. 636–642. <https://doi.org/10.3762/bjoc.12.62>
15. Sigida E.N., Fedonenko Y.P., Shashkov A.S., Zdorovenko E.L., Konnova S.A., Knirel Y.A. // Carbohydr. Res. 2019. V. 478. P. 54–57. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.04.009>
16. Sigida E.N., Fedonenko Y.P., Shashkov A.S., Konnova S.A., Ignatov V.V. // Carbohydr. Res. 2018. V. 465. P. 40–43. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2018.06.003>
17. Sigida E.N., Shashkov A.S., Zdorovenko E.L., Konnova S.A., Fedonenko Y.P. // Carbohydr. Res. 2020. V. 494. P. 108060. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108060>
18. Сигида Е.Н., Кокоулин М.С., Дмитренко П.С., Гринёв В.С., Федоненко Ю.П., Коннова С.А. // Биоорг. химия. 2020. Т. 46. С. 65–76. [Sigida E.N., Kokoulin M.S., Dmitrenok P.S., Grinev V.S., Fedonenko Y.P., Konnova S.A. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 60–70.] <https://doi.org/10.1134/S1068162020010112>
19. Samuel G., Reeves P. // Carbohydr. Res. 2003. V. 338. P. 2503–2519. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.07.009>

20. Mehnaz S., Weselowski B., Lazarovits G. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. V. 57. P. 2805–2809. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65128-0>
21. Peng G., Wang H., Zhang G., Hou W., Liu Y., Wang E.T., Tan Z. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. V. 56. P. 1263–1271. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64025-0>
22. D'Errico G., Silipo A., Mangiapia G., Vitiello G., Radulescu A., Molinaro A., Lanzetta R., Paduano L. // Phys. Chem. Chem. Phys. 2010. V. 12. P. 13574–13585. <https://doi.org/10.1039/c0cp00066c>
23. Burygin G.L., Sigida E.N., Fedonenko Y.P., Khlebtsov B.N., Shchyogolev S.Y. // Biophysics. 2016. V. 61. 547–557. <https://doi.org/10.1134/S0006350916040059>
24. Bock K., Pedersen C. // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1983. V. 41. P. 27–66.
25. Lipkind G.M., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Vinogradov E.V., Kochetkov N.K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 175. P. 59–75. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(88\)80156-3](https://doi.org/10.1016/0008-6215(88)80156-3)
26. Choma A., Komaniecka I., Sowinski P. // Carbohydr. Res. 2009. V. 344. P. 936–939. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.02.021>
27. Konnova S.A., Makarov O.E., Skvortsov I.M., Ignatov V.V. // FEMS Microbiol. Lett. 1994. V. 118. P. 93–99.
28. Westphal O., Jann K. // Methods Carbohydr. Chem. 1965. V. 5. P. 83–91.
29. Hitchcock P.J., Brown T.M. // J. Bacteriol. 1983. V. 154. P. 269–277.
30. Tsai C.M., Frasch C.E. // Anal. Biochem. 1982. V. 119. P. 115–119.
31. Ouchterlony O., Nilsson L.-A. // In: Handbook of Experimental Immunology / Ed. Weir D.M. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1978. P. 19.16–19.23.
32. Sawardeker J.S., Sloneker J.H., Jeanes A. // Anal. Chem. 1965. V. 37. P. 1602–1603.
33. Leontein K., Lindberg B., Lönnngren J. // Carbohydr. Res. 1978. V. 62. P. 359–362.
34. Mayer H., Merkofer T., Warth C., Weckesser J. // J. Endotox. Res. 1996. V. 3. P. 345–352. <https://doi.org/10.1177/096805199600300409>
35. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. P. 3398–3402.
36. Sullivan M.J., Petty N.K., Beatson S.A. // Bioinformatics. 2011. V. 27. P. 1009–1010.
37. Liu B., Furevi A., Perepelov A.V., Guo X., Cao H., Wang Q., Reeves P.R., Knirel Y.A., Wang L., Widmalm G. // FEMS Microbiol. Rev. 2020. V. 44. P. 655–683. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz028>

## O-Antigens of *Azospirillum zeae* N7(T), *Azospirillum melinis* TMCY 0552(T) and *Azospirillum palustre* B2(T): Structure Elucidation and Analysis of Biosynthesis Genes

E. N. Sigida\*, \*\*, #, V. S. Grinev\*, E. L. Zdorovenko\*\*, A. S. Dmitrenok\*\*, G. L. Burygin\*, N. K. Kondurina\*\*\*, S. A. Konnova\*, \*\*\*, and Y. P. Fedonenko\*

#Phone: +7 (8452) 97-04-44; e-mail: si\_elen@mail.ru

\*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, FRC Saratov Scientific Centre of RAS, prosp. Entuziastov 13, Saratov, 410049 Russia

\*\*N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 47, Moscow, 119991 Russia

\*\*\*Chernyshevsky Saratov State University, ul. Astrakhanskaya 83, Saratov, 410012 Russia

O-specific polysaccharides were isolated from lipopolysaccharides of type bacterial strains *Azospirillum zeae* N7, *Azospirillum melinis* TMCY 0552 and *Azospirillum palustre* B2. Based on the results of sugar analysis, including the determination of the absolute configurations of monosaccharides, one- and two-dimensional <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy, it was found that the isolated polysaccharides built up of branched tetrasaccharide repeating units with the following structure: →3)-α-L-Rhap2OAc-(1→2)-[β-D-Glcp-(1→3)]-α-L-Rhap-(1→3)-α-L-Rhap-(1→, previously described for a number of *Azospirillum* strains, assigned to serogroup III. Functions of genes, responsible for the biosynthesis of O-antigens were identified by comparison with the sequences presented in the available databases; a high level of their homology was shown.

**Keywords:** *Azospirillum*, lipopolysaccharide, O-specific polysaccharide, structure of bacterial polysaccharides, O-antigen gene cluster



УДК 577.21

## ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ЦЕЛЛЮЛОЗОСИНТАЗ ПРИ ГРАВИСТИМУЛЯЦИИ РАСТЕНИЙ ЛЬНА (*Linum usitatissimum*) И ТОПОЛЯ (*Populus alba* × *tremula*)

© 2022 г. Н. Е. Мокшина\*, \*\*, #, П. В. Микшина\*, Т. А. Горшкова\*

\*Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение  
ФИЦ Казанский научный центр РАН, Россия, 420111 Казань, ул. Лобачевского, 2/31

\*\*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, 420008 Казань, ул. Кремлевская, 18

Поступила в редакцию 29.10.2021 г.

После доработки 29.11.2021 г.

Принята к публикации 13.12.2021 г.

Биосинтез растительной целлюлозы осуществляется мембранным комплексом изоферментов с участием ряда коферментов. Принято считать, что целлюлозосинтазные комплексы, синтезирующие первичную и вторичную клеточную стенку, различаются по составу изоферментов. Некоторые растительные волокна, включая флоэмные волокна льна и ксилемные волокна древесины натяжения тополя, формируют третичную клеточную стенку, которая характеризуется повышенным содержанием целлюлозы и пониженным содержанием ксилана и лигнина. Состав и типы целлюлозосинтазных комплексов, вовлеченных в биосинтез третичной клеточной стенки, до сих пор не установлены. Опираясь на транскриптомные данные для растений льна (*Linum usitatissimum*) и тополя (*Populus alba* × *tremula*), мы оценили экспрессию генов, кодирующих целлюлозосинтазы, в ходе развития гравитропической реакции с участием флоэмных и/или ксилемных волокон, формирующих третичную клеточную стенку. Изменения в экспрессии генов целлюлозосинтаз, характерных как для первичных, так и для вторичных клеточных стенок, в различных модельных системах свидетельствуют о подвижности ансамбля различных изоформ целлюлозосинтаз при реализации гравитропической реакции, который может затрагивать как отдельный тип клеток, так и совокупность тканей с различными типами клеточных стенок. На выделенных флоэмных волокнах льна продемонстрирована вовлеченность целлюлозосинтаз обоих типов в формирование третичной клеточной стенки на всех стадиях гравитропической реакции.

**Ключевые слова:** целлюлозосинтазы, третичная клеточная стенка, растительные волокна, транскриптомный анализ

DOI: 10.31857/S0132342322030137

### ВВЕДЕНИЕ

Целлюлоза, будучи неизменным компонентом клеточной стенки любой растительной клетки, выступает самым распространенным биополимером на нашей планете. Несмотря на то, что с химической точки зрения целлюлоза устроена достаточно просто и представляет собой β-1,4-D-

глюкан, элементарное звено которого – β-целлобиоза (β-D-глюкопиранозил-(1,4)-β-D-глюкопираноза), биосинтез ее молекул в растениях осуществляется сложноорганизованной многокомпонентной системой ферментов. Центральное положение в этой системе занимают целлюлозосинтазы (CESA), принадлежащие к семейству 2 гликозилтрансфераз (GT2, EC 2.4.1.12, согласно CAZy). CESA собраны в мембранные комплексы, так называемые “розетки”, при этом каждый фермент такого комплекса синтезирует отдельную глюкановую цепь. На данный момент принято считать, что розетка состоит из шести “лепестков”, а “лепесток” розетки – из трех индивидуальных белков CESA; таким образом, один комплекс синтезирует микрофибриллу целлюлозы, которая состоит из 18 глюкановых цепей [1, 2]. В геноме резуховидки (*Arabidopsis thaliana*) идентифицировано 10 генов, кодирующих CESA [3]. Из-

Сокращения: CESA – целлюлозосинтазы; PCW – первичная клеточная стенка; SCW – вторичная клеточная стенка; PCW CESA и SCW CESA – целлюлозосинтазы, синтезирующие целлюлозу первичных и вторичных клеточных стенок соответственно; PUL – тянущая сторона стебля гравитропизированного растения (pulling); OPP – сторона стебля, противоположная тянущей стороне (opposite); TW – древесина натяжения; OW – древесина, расположенная с противоположной стороны от древесины натяжения; NW – нормальная древесина; TGR – количество прочтений, картируемых на каждый ген (total gene reads).

# Автор для связи: (тел.: +7 (843) 231-90-39; эл. почта: ne\_mokshina@kibb.knc.ru).

вестно, что набор изоформ CESA отличается для первичных и вторичных клеточных стенок, формирующихся на разных стадиях развития клеток и имеющих различные свойства и функции. Так, целлюлозу первичных клеточных стенок синтезируют изоформы CESA1, 3, 6 (далее PCW CESA, PCW – primary cell wall), а вторичных – CESA4, 7, 8 (далее SCW CESA, SCW – secondary cell wall) [4, 5]. CESA10 – близкий гомолог CESA1; CESA2, 5, 9 – близкие гомологи CESA6 [6]. Интересно, что *in vitro* каждая изоформа CESA может взаимодействовать с любой другой изоформой [7]. Кроме того, есть единичные сообщения, согласно которым экспрессия генов PCW CESA сохраняется в клетках ксилемных сосудов, которые формируют вторичную клеточную стенку. Это может быть связано с тем, что клеткам необходимо перестроиться с биосинтеза первичной клеточной стенки на биосинтез вторичной, и какое-то время оба типа комплекса могут функционировать на плазмалемме одновременно [8]. Некоторые ученые выдвигают и более смелые предположения, согласно которым вторичную клеточную стенку синтезируют оба типа комплексов [9].

“Поведение” целлюлозосинтазных комплексов в ходе формирования третичной клеточной стенки, которая обнаруживается только в волокнах и для которой характерно очень высокое содержание целлюлозы – до 85–90% [10], пока исследовано крайне слабо. Широко используемыми моделями для изучения формирования третичной клеточной стенки служат волокна льна (*Linum usitatissimum* L.) и древесина натяжения тополя (*Populus* sp.) [11, 12]. Флоэмные волокна льна после прекращения роста растяжением (интрузивный рост) формируют утолщенную третичную клеточную стенку; следует отметить, что этому процессу предшествует отложение тонкого слоя вторичной клеточной стенки, который выявляется только при иммуномечении [13]. Формирование третичной клеточной стенки во флоэмных волокнах льна происходит конститутивно, в ходе нормального развития растений. Высокая механическая прочность и собранность в пучки позволяют быстро извлекать флоэмные волокна льна, развивающиеся *in planta*, что дает возможность анализировать определенный тип клеток на определенной стадии их развития, и избежать проблем в интерпретации результатов, которые возникают при анализе гетерогенных образцов, состоящих из разных типов клеток.

В геноме льна (*L. usitatissimum*) выявлено 16 генов целлюлозосинтаз (*LusCESA*), из которых, судя по гомологии с генами резуховидки (*A. thaliana*), 11 генов кодируют PCW CESA, а 5 – SCW CESA [14]. Первые сведения, касающиеся экспрессии генов целлюлозосинтаз в волокнах льна [14], были получены вскоре после расшифровки генома льна [15]. С использованием количествен-

ной ПЦР было показано, что на стадии формирования третичной клеточной стенки экспрессия генов SCW *LusCESA* выше, чем в тканях, формирующих первичную клеточную стенку. Транскриптомный анализ позволил оценить экспрессию генов всех изоформ *LusCESA* в волокнах на разных стадиях развития и установить, что в волокнах, формирующих первичную клеточную стенку, экспрессируются только гены PCW *LusCESA*, тогда как в волокнах, формирующих третичную клеточную стенку, экспрессируются как гены PCW *LusCESA*, так и SCW *LusCESA* [16].

В ксилемных волокнах древесины натяжения тополя (*Populus* sp.) также формируется третичная клеточная стенка (альтернативное название – G-слой вторичной клеточной стенки [17]). По составу и структуре она схожа с третичной клеточной стенкой волокон льна [18], но ее формирование индуцируется гравистимуляцией (наклон стебля), в отличие от флоэмных волокон льна, в которых формирование третичной клеточной стенки происходит конститутивно. В ходе ответа на гравистимуляцию развитие стебля в участке, где формируется изгиб, происходит асимметрично: древесина натяжения и волокна с третичной клеточной стенкой, как ее характерный элемент, образуются только с одной, тянущей стороны стебля; с противоположной стороны такие изменения отсутствуют. В геноме тополя (*Populus trichocarpa*) идентифицировано 17 генов, кодирующих PtiCESA [19], их филогения сходна с филогенией целлюлозосинтаз льна [14]. Третичная клеточная стенка может индуцироваться в ксилемных волокнах и у растений льна, подвергнутых гравистимуляции [20, 21]. По механизмам формирования она должна быть близка к третичной клеточной стенке в ксилемных волокнах древесины натяжения тополя. При этом в ходе гравитропического ответа происходят существенные изменения и в конститутивно формируемой третичной клеточной стенке флоэмных волокон [20, 22]. Через 8 ч после гравистимуляции активируется экспрессия генов некоторых изоформ *LusCESA* во флоэмных волокнах, расположенных на верхней (тянущей) стороне стебля: *LusCESA1-A*, *LusCESA3-B,3-C*, *LusCESA4*, *LusCESA7-B*, *LusCESA8-B* [16].

Накопление и систематизация транскриптомных данных для льна и тополя привели к созданию онлайн-платформы FIBexDB (<https://ssl.crest.org/fibex/>, [23]), которая позволяет анализировать и сопоставлять экспрессию генов целлюлозосинтаз в различных тканях стебля льна и тополя в ходе развития гравитропического ответа. Цель данной работы – выявить особенности экспрессии генов целлюлозосинтаз в волокнах различного происхождения, формирующих утолщенную третичную клеточную стенку, обогащенную целлюлозой. В работе рассмотрены три различные системы: 1) флоэмные во-

(а) Механизмы формирования третичной клеточной стенки: экспрессия *CESA*

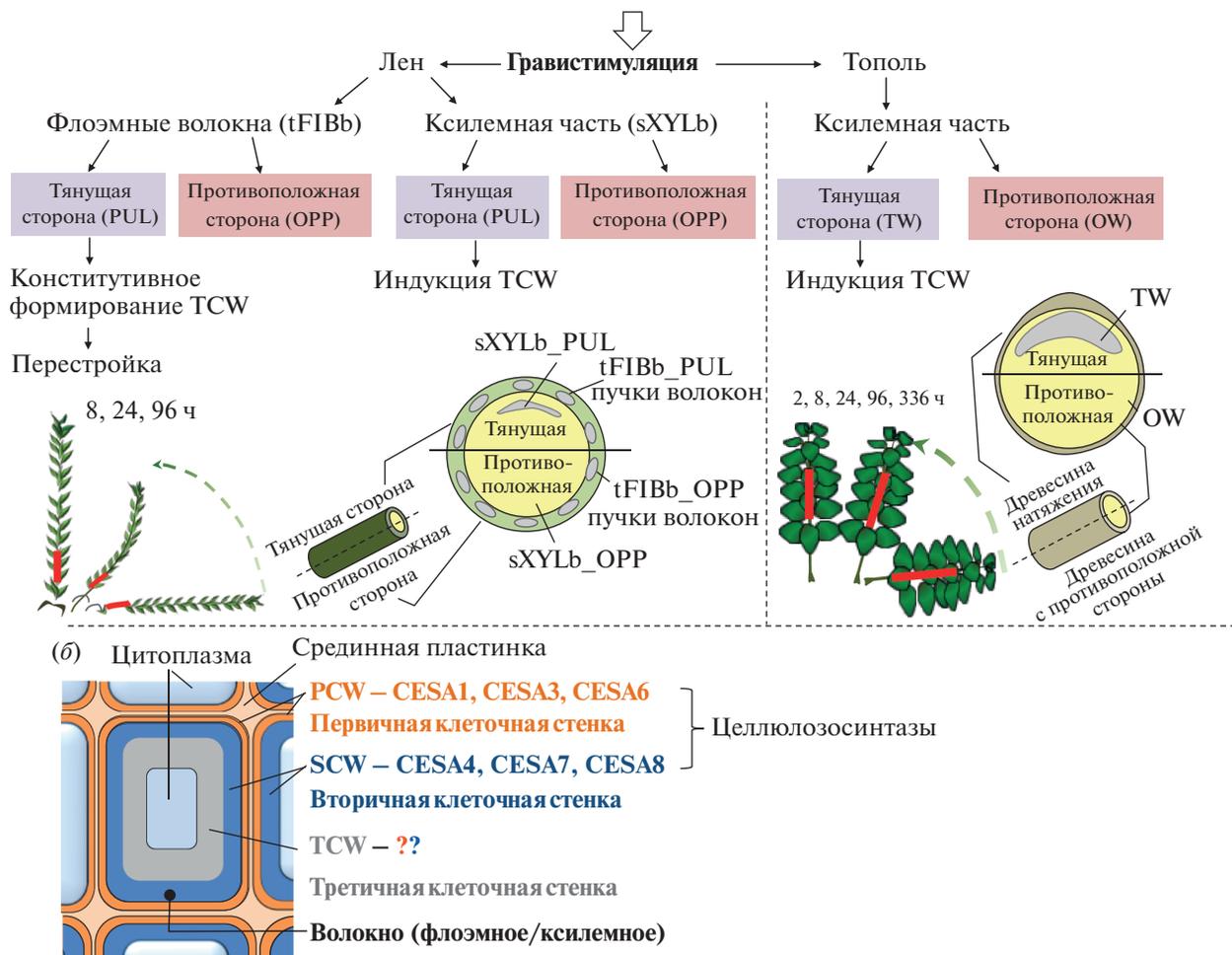


Рис. 1. (а) – Модели для исследования механизмов формирования третичной клеточной стенки и схема отбора образцов льна [16, 20, 21, 24] и тополя [25]; (б) – слои клеточной стенки и изоформы целлюлозосинтаз (CESA), вовлеченные в их формирование [4, 5].

локна льна в условиях гравистимуляции, которые в норме формируют третичную клеточную стенку (конститутивно); 2) ксилемная часть растений льна (*L. usitatissimum*), в ксилемных волокнах которой индуцируется формирование третичной клеточной стенки в ходе гравистимуляции; 3) древесина натяжения тополя (*Populus alba* × *tremula*), в ксилемных волокнах которой формируется третичная клеточная стенка (рис. 1). Сопоставление уровня экспрессии генов различных целлюлозосинтаз в этих системах позволяет приблизиться к пониманию механизмов биосинтеза целлюлозы в третичной клеточной стенке, которые до сих пор не расшифрованы.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Экспрессия генов целлюлозосинтаз в тканях стебля льна (*L. usitatissimum*) при гравистимуляции.** Сопоставление экспрессии генов целлюлозосин-

таз в ходе гравитропического ответа растений льна проводили на основе ранее проведенных экспериментов, первичные результаты которых депонированы в базе данных NCBI (PRJNA631357) и внесены в базу данных FIBexDB. Описание методики транскриптомного анализа приведено в соответствующих публикациях [16, 21, 24]. Гравистимуляция в этих работах достигалась путем наклона растений льна; при последующем развитии гравитропического ответа были отобраны образцы изолированных флоэмных волокон (tFIB) и ксилемной части стебля (sXYL) с тянушей (PUL, от англ. pulling) и противоположной стороны стебля (OPP, от англ. opposite) через 8, 24 и 96 ч после наклона (рис. 1). Через 96 ч стебель растения выше изгиба (сформирован в области 3–5 см выше семядольных листьев) принимал вертикальное положение. Ранее было показано, что гравистимуляция приводит к появлению видимых морфологических изменений во флоэмных волокнах (расширение люмена

волокон, формирование “перетяжек” [20]), а также к изменениям в экспрессии ряда генов, продукты которых вовлечены в формирование клеточной стенки [24], и модификациям в межмолекулярных взаимодействиях между полисахаридами клеточной стенки [22]. Также гравистимуляция индуцировала формирование третичной клеточной стенки в ксилемных волокнах [21].

Мы рассмотрели экспрессию генов *LusCESA* в ходе развития гравииответа в анализируемых тканях льна. И во флоэмных волокнах, и в ксилемной части стебля экспрессировались гены *LusCESA*, продукты которых синтезируют целлюлозу как первичной, так и вторичной клеточной стенки (рис. 2а). При этом в ксилемной части стебля гены *SCW LusCESA* были активированы в большей степени по сравнению с флоэмными волокнами, тогда как гены *PCW LusCESA* экспрессировались примерно на одинаковом уровне во всех анализируемых образцах. Ксилемная часть стебля представляет собой смесь тканей, в которой присутствуют клетки с первичной клеточной стенкой, при этом большая часть представлена сосудами и волокнами, которые формируют вторичную клеточную стенку. В таком случае, если опираться на классические представления о формировании клеточных стенок, в ксилемной части стебля экспрессию генов *PCW LusCESA* мы можем ассоциировать с формированием клеточных стенок паренхимы, молодых сосудов и волокон, а повышенную экспрессию генов *SCW LusCESA* – с формированием вторичной клеточной стенки в зрелых сосудах и волокнах, которые преобладают в этой части стебля. Более того, известно, что при переходе от синтеза первичной клеточной стенки к отложению вторичной какое-то время возможно сосуществование двух типов комплексов [8].

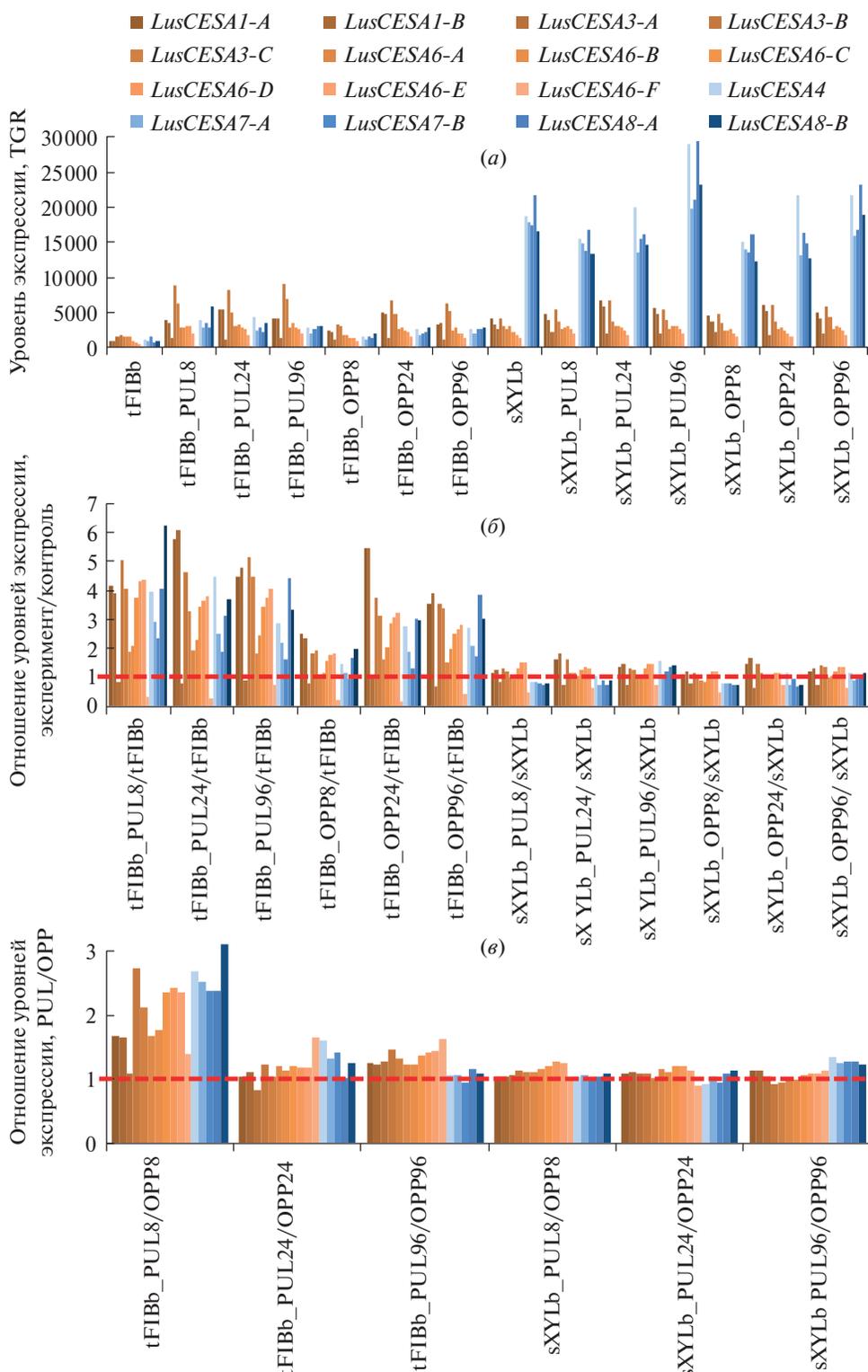
Во флоэмных волокнах, формирующих третичную клеточную стенку, экспрессия генов *PCW LusCESA* была примерно на том же уровне, что и в ксилемной ткани, и даже более выражена для некоторых изоформ на ранних стадиях гравииответа (8 и 24 ч) в волокнах с тянущей части стебля. При этом образцы изолированных волокон обогащены именно волокнами с третичной клеточной стенкой, а не выступают смесью тканей, как ксилемная часть. Это означает, что по крайней мере в одном типе клеток – волокнах, формирующих третичную клеточную стенку, – одновременно экспрессируются и *PCW LusCESA*, и *SCW LusCESA*, причем это наблюдается и в контрольных растениях, и на разных стадиях развития гравииответа.

Если сравнить экспрессию *LusCESA* во флоэмных волокнах и ксилемной части гравистимулированных и контрольных растений (рис. 2б), то существенные изменения в экспрессии *LusCESA* отчетливо детектировались в изолированных

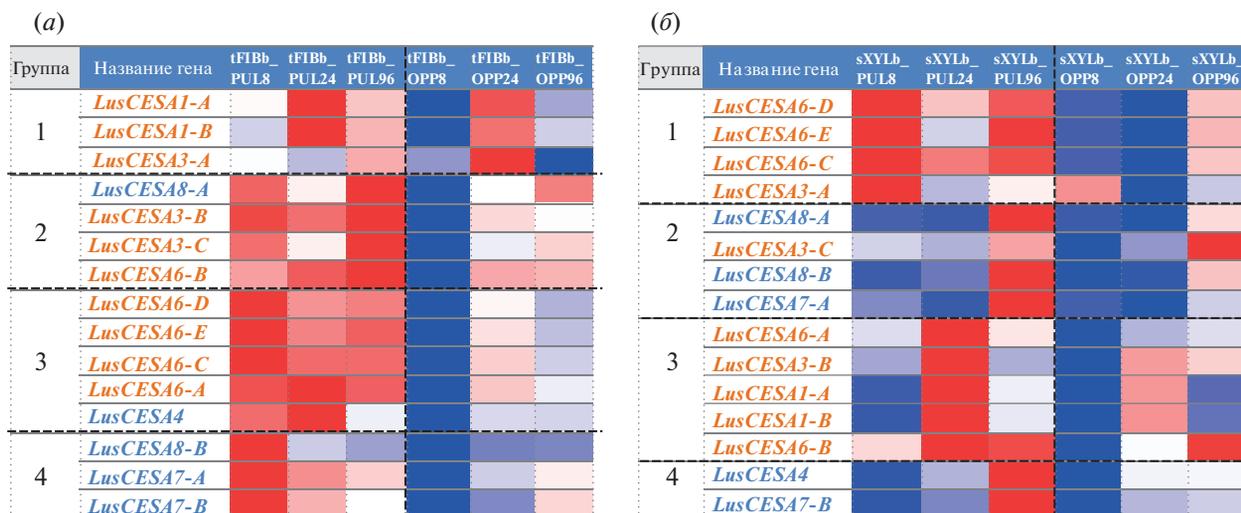
флоэмных волокнах. При этом изменения наблюдались как с тянущей, так и с противоположной стороны стебля, хотя и в разных временных точках: повышение экспрессии большинства генов *PCW* и *SCW LusCESA* отмечалось в волокнах с тянущей стороны уже после 8 ч после наклона, тогда как с противоположной стороны стебля максимальные отличия с контрольными растениями наблюдались позднее (24 ч после наклона) (рис. 2б).

Если сравнить экспрессию генов *LusCESA* в изолированных волокнах одних и тех же растений, но отобранных с тянущей и противоположных сторон стебля (*PUL/OPP*), то очевидно, что более высокая их активация наблюдалась во флоэмных волокнах с тянущей стороны на ранней стадии гравииответа (8 ч) (рис. 2в). Именно в волокнах, локализованных на тянущей стороне стебля, наблюдаются существенные морфологические изменения в ходе гравииответа [20]. В ксилемной части стебля изменения в экспрессии были незначительными, хотя экспрессия некоторых генов *PCW LusCESA* повышалась в участках стебля с тянущей стороны, а на более поздних этапах (96 ч после наклона) отмечалось небольшое повышение экспрессии генов *SCW LusCESA* (рис. 2в). Поскольку в ксилемных волокнах с тянущей стороны стебля индуцируется формирование третичной клеточной стенки [20, 22], отсутствие выраженных вариаций в экспрессии различных генов *LusCESA* может быть связано с гетерогенностью образцов ксилемы, в которых количество клеток, формирующих третичную стенку, существенно ниже, чем клеток, откладывающих вторичную стенку. В последних, судя по полученным данным, экспрессия *LusCESA* не изменяется существенно в ответ на гравистимуляцию. Возможно также, что высокий уровень экспрессии *SCW LusCESA*, характерный для клеток ксилемы, формирующих вторичную клеточную стенку (рис. 2а), достаточен для запуска отложения третичной клеточной стенки в ходе гравииответа.

Кластеризация генов *LusCESA* по характеру изменения их экспрессии, проведенная для флоэмных волокон и образцов ксилемы льна, выявила в обоих случаях несколько групп генов (рис. 3). В некоторых из этих кластеров гены *PCW LusCESA* и *SCW LusCESA* были перемешаны друг с другом. Так, у флоэмных волокон во втором кластере *LusCESA8-A* соседствовал с двумя вариантами *LusCESA3* и с *LusCESA6-B*, а в третьем кластере присутствовали несколько вариантов *LusCESA6* и *LusCESA4* (рис. 3а). Аналогично, во второй кластер из образцов ксилемы попали несколько *SCW LusCESA* и *LusCESA3-C* (рис. 3б). Это может свидетельствовать о сходном характере регуляции некоторых *PCW* и *SCW LusCESA* при формировании третичной клеточной стенки, что не харак-



**Рис. 2.** (а) – Экспрессия генов *LusCESA* во флоэмных волокнах (tFIB) и ксилемной части (sXYL) на разных сторонах стебля льна (тянушей, PUL, и противоположной, OPP) в ходе развития гравивотвeta (8, 24, 96 ч после наклона); (б) – отношение экспрессии генов *LusCESA* в тканях растений льна (tFIB\_PUL, tFIB\_OPP, sXYL\_PUL, sXYL\_OPP) в ходе развития гравивотвeta (8, 24, 96 ч после наклона) к экспрессии генов в соответствующих тканях контрольных растений, которые не подвергались гравистимуляции (tFIBb, sXYLb); (в) – отношение экспрессии генов *LusCESA* в тканях растений льна (tFIB, sXYL), отобранных с тянушей стороны стебля (PUL), к экспрессии генов в тканях из соответствующих участков стебля, отобранных с противоположной стороны тех же растений (OPP), в ходе развития гравивотвeta (8, 24, 96 ч после наклона). Оранжевые столбики – *LusCESA*, продукты которых вовлечены в формирование первичной клеточной стенки (PCW); синие столбики – *LusCESA*, продукты которых вовлечены в формирование вторичной клеточной стенки (SCW).



**Рис. 3.** Кластеризация генов *LusCESA* во флоэмных волокнах (а) и ксилемной части стебля льна (б) в ходе гравистимуляции (через 8, 24, 96 ч после наклона). tFIB\_PUL и sXYL\_PUL – изолированные флоэмные волокна и ксилемная часть соответственно с тянущей стороны стебля льна; tFIB\_OPP и sXYL\_OPP – изолированные флоэмные волокна и ксилемная часть соответственно с противоположной стороны стебля льна. Цвета тепловой карты отражают уровень экспрессии в горизонтальном ряду (образцы) от максимального (красный) до минимального (синий).

терно для других типов клеточных стенок. Последствия такой комбинации для свойств формируемых микрофибрилл целлюлозы еще предстоит выяснить.

Кластеризация четко выявляет различия в экспрессии *LusCESA* в образцах, отобранных с различных сторон стебля гравистимулированных растений льна (PUL и OPP). Особенно четко эти различия выявляются на изолированных флоэмных волокнах. Изучение особенностей строения целлюлозы гравистимулированных растений льна с помощью твердотельного ЯМР хоть и не выявило существенных различий в размерах макрофибрилл целлюлозы для PUL и контрольных образцов, но продемонстрировало существенные различия в их организации, а также в параметрах микрофибрилл, формирующих эти макрофибриллы. При гравистимуляции наблюдалось увеличение степени кристалличности целлюлозы (за счет увеличения размера кристаллического коагумента микрофибрилл), снижение отношения  $I_{\alpha}/I_{\beta}$  (прежде всего, за счет возрастания доли  $\beta$ -алломорфа), уменьшение доли паракристаллической целлюлозы и снижение доли цепей недоступной поверхности микрофибрилл, погруженной внутрь макрофибриллы. Усиление упорядоченности сопровождалось снижением подвижности целлюлозы, что было продемонстрировано в SP/MAS  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-экспериментах [22].

**Экспрессия генов целлюлозосинтаз в древесине тополя (*P. alba* × *tremula*) при гравистимуляции.** Наиболее известный пример индуцированного формирования третичной клеточной стенки – древесина натяжения тополя (*Populus* sp.), в которой третичная клеточная стенка формируется в

ксилемных волокнах на верхней части ствола (стебля) при его наклоне. Отложение третичной клеточной стенки происходит в ксилемных волокнах, которые уже содержат выраженные слои вторичной (один или несколько) клеточной стенки [10]. Ранее уже отмечалось, что формирование желатинозного слоя (третичной клеточной стенки) в древесине натяжения осины (*Populus tremula*) сопровождается увеличением экспрессии гена *PtaCESA8-B*, а для остальных генов *SCW PtaCESA* отмечали снижение экспрессии по сравнению с нормальной древесиной [26]. При этом анализа экспрессии генов, кодирующих все изоформы CESA, в ходе развития гравитовеса в древесине натяжения (tension wood, TW) и сравнения их с нормальной древесиной (normal wood, NW) и с древесиной на противоположной стороне (opposite wood, OW) не проводилось. В своей работе для анализа экспрессии генов *Pa* × *tCESA* мы использовали данные для гибрида тополя белого и осины (*P. alba* × *tremula* INRA 717-1B4), размещенные в FIBexDB [25]. Для RNA-seq-анализа Zinkgraf et al. отбирали образцы древесины натяжения (TW) и образцы древесины с противоположной стороны (OW) через 2, 8, 24, 48, 96 и 336 ч после наклона растений. В качестве референсного генома при RNA-seq-анализе данных транскриптомов гибридного тополя *P. alba* × *tremula* использовали геном тополя *P. trichocarpa* [25]; различия в нуклеотидных последовательностях генов этих видов минимальны, об эффективности и допустимости такого анализа также говорится в работе Liu et al. [27].

При анализе экспрессии генов *Pa* × *tCESA* в древесине гибридного тополя ожидаемо выявлен

более высокий уровень экспрессии генов *SCW Pa×tCESA* по сравнению с *PCW Pa×tCESA* во всех тканях (рис. 4а). Экспрессия генов *SCW Pa×tCESA* (при усреднении экспрессии генов всех изоформ *PCW* и *SCW*) была выше в ~12.7 раз по сравнению с генами *PCW Pa×tCESA*: 28000 и 2200 прочтений, картируемых на каждый ген (total gene reads, TGR) соответственно. При этом наблюдалась разница в экспрессии генов различных изоформ (*PCW* и *SCW*) в разных образцах древесины, а также изменение в экспрессии генов различных изоформ в ходе развития гравитропической реакции. Так, во всех образцах древесины высокий уровень экспрессии был присущ гену *Pa×tCESA4*, а ген *Pa×tCESA8-A* имел минимальный уровень экспрессии среди генов *SCW Pa×tCESA* во всех образцах древесины.

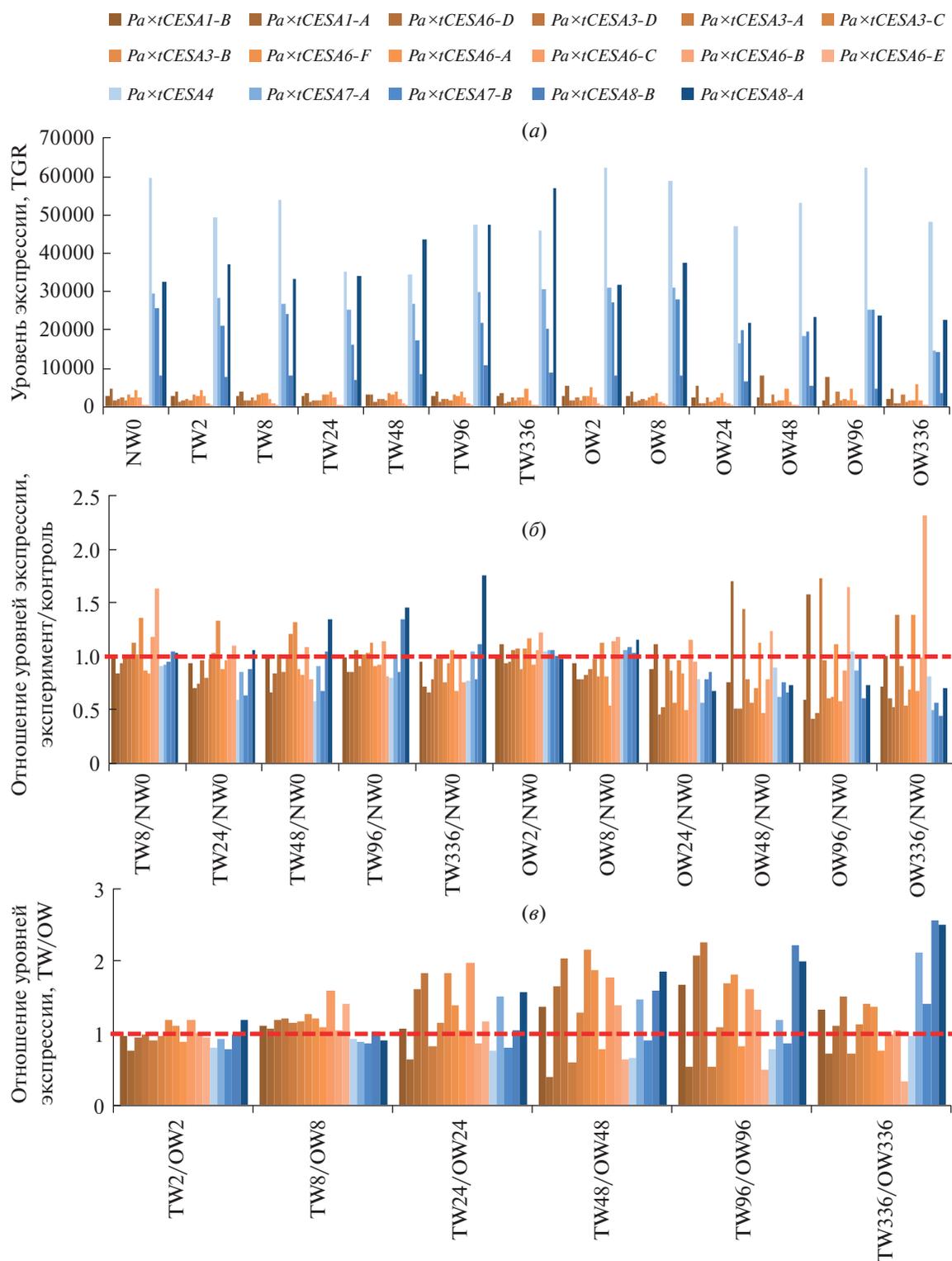
При сравнении экспрессии *Pa×tCESA* в образце в ответ на гравистимуляцию древесине натяжения с нормальной древесиной (рис. 4б) показано, что экспрессия некоторых генов *PCW Pa×tCESA* и всех *SCW Pa×tCESA* подавлена в древесине с противоположной стороны (*OW*), тогда как некоторые гены *PCW Pa×tCESA*, наоборот, существенно активировались в этих образцах по сравнению с контролем. В древесине натяжения разница с контрольными образцами была не столь существенной (рис. 4б), при этом, начиная с 48 ч, наблюдалась активация экспрессии генов *SCW Pa×tCESA*. Поскольку образцы древесины представляют собой смесь тканей, в которых формируется и первичная, и вторичная клеточные стенки, то соотнести активацию определенных изоформ с формированием определенного типа клеточной стенки, опираясь на представленные данные, невозможно. При этом древесина натяжения отличается от нормальной древесины и древесины с противоположной стороны стебля, главным образом, наличием третичной клеточной стенки в ксилемных волокнах.

При сравнении транскрипционных профилей генов *Pa×tCESA* в образцах, которые отобраны с одних и тех же растений (древесина натяжения и древесина противоположной стороны стебля), в древесине натяжения была выявлена активация экспрессии некоторых генов *PCW Pa×tCESA* (*Pa×tCESA1-A, 3-A, 3-B, 6-A, 6-B, 6-D, 6-E*) и подавление экспрессии остальных генов *PCW Pa×tCESA* (рис. 4в). Максимальные различия в экспрессии генов *PCW Pa×tCESA* наблюдали через 48 и 96 ч после гравистимуляции, через 336 ч различия постепенно сглаживались, тогда как экспрессия некоторых генов *SCW Pa×tCESA* (*Pa×tCESA7-A, 8-A, 8-B*) активировалась в древесине натяжения по сравнению с древесиной, расположенной с противоположной стороны стебля, и достигала максимума через 336 ч (рис. 4в). Кла-

стеризация генов выявила группы, в каждой из которых представлены исключительно гены *PCW Pa×tCESA* либо *SCW Pa×tCESA* (рис. 5).

**Сравнение экспрессии генов различных изоформ *CESA* в тканях стебля льна и тополя в ходе гравистимуляции.** Во всех анализируемых нами системах представлены образцы тянущей части (*PUL, TW*) и противоположной части стебля (*OPP, OW*) гравистимулированного растения, что позволяет провести сопоставление динамики экспрессии *CESA* в ходе гравитоответа. Такое сопоставление опирается на результаты проведенного ранее филогенетического анализа аминокислотных последовательностей целлюлозосинтаз резуховидки (*A. thaliana*), льна (*L. usitatissimum*) и тополя (*P. trichocarpa*) [14], позволившего соотнести различные изоформы *CESA* и провести их обозначение с учетом степени родства. В геномах льна и тополя произошло увеличение числа всех изоформ *CESA* по сравнению с резуховидкой, при этом большинство ортологов в геноме льна имеют соответствующие ортологи в геноме у тополя, за исключением изоформы *PtiCESA3-D*, которая не выявлена у льна. Экспрессия для паралогов одного гена может иметь как сходную динамику, что может свидетельствовать об их схожих функциях, так и отличаться, что может свидетельствовать об их различных функциях. Чаще для *CESA* мы наблюдаем реализацию первого сценария, особенно при явной дупликации генов (например, *LusCESA1-A/B, LusCESA7-A/B*), а отличия в экспрессии выявляются для генов изоформ изклад с большим количеством представителей (например, *LusCESA3, LusCESA6*).

Сопоставление транскриптомных данных для разных модельных систем позволило обнаружить ряд закономерностей в динамике экспрессии генов *CESA* в ходе гравитоответа. В ксилемных образцах реакция развивалась позднее, чем во флоэмных волокнах, что, по всей видимости, связано с тем, что во флоэмных волокнах формирование третичной стенки уже отлажено, а в ксилемных образцах инициируется с нуля (рис. 6а, 6б). С этим же, вероятно, отчасти связана и на порядок более низкая экспрессия *SCW LusCESA* во флоэмных волокнах льна (даже на тянущей стороне стебля) по сравнению с ксилемными образцами из обоих проанализированных видов растений (рис. 7а, 7б). При этом основной причиной такого эффекта служит активное формирование вторичной клеточной стенки во многих тканях гетерогенных ксилемных образцов, тогда как в тканево-однородных флоэмных волокнах этот процесс полностью отсутствует. Очевидно, что при формировании третичной клеточной стенки гены *PCW* и *SCW CESA* экспрессируются примерно на одинаковом уровне, в то время как при от-



**Рис. 4.** (а) – Экспрессия генов *Pa×tCESA* в нормальной древесине (NW), в древесине натяжения (TW) и противоположной древесине (OW) гибридного тополя (*P. alba × tremula*) в ходе развития гравитовета (2, 8, 24, 48, 96, 336 ч после наклона); (б) – отношение уровня экспрессии генов *Pa×tCESA* в тканях древесины (OW, TW) в ходе развития гравитовета (2, 8, 24, 48, 96, 336 ч после наклона) к уровню экспрессии генов в древесине контрольных растений (NW); (в) – отношение уровня экспрессии генов *Pa×tCESA* в тканях древесины натяжения (TW) к уровню экспрессии генов в тканях древесины, противоположащей древесине натяжения (OW), в ходе развития гравитовета (2, 8, 24, 48, 96, 336 ч после наклона). Оранжевые столбики – *Pa×tCESA*, продукты которых вовлечены в формирование первичной клеточной стенки, синие столбики – *Pa×tCESA*, продукты которых вовлечены в формирование вторичной клеточной стенки.

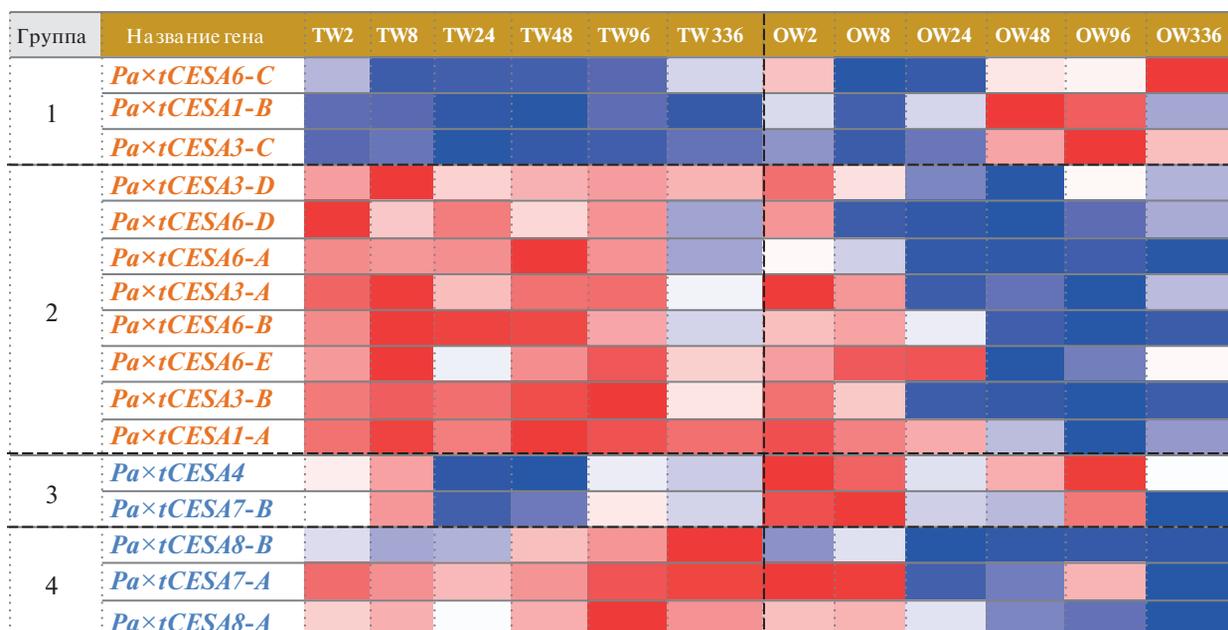


Рис. 5. Кластеризация генов *Pa×tCESA* в древесине натяжения (TW) и в древесине противоположной стороны стебля (OW) в ходе гравистимуляции тополя (через 2, 8, 24, 96, 336 ч после наклона). Цвета тепловой карты отражают уровень экспрессии в горизонтальном ряду (образцы) от максимального (красный) до минимального (синий).

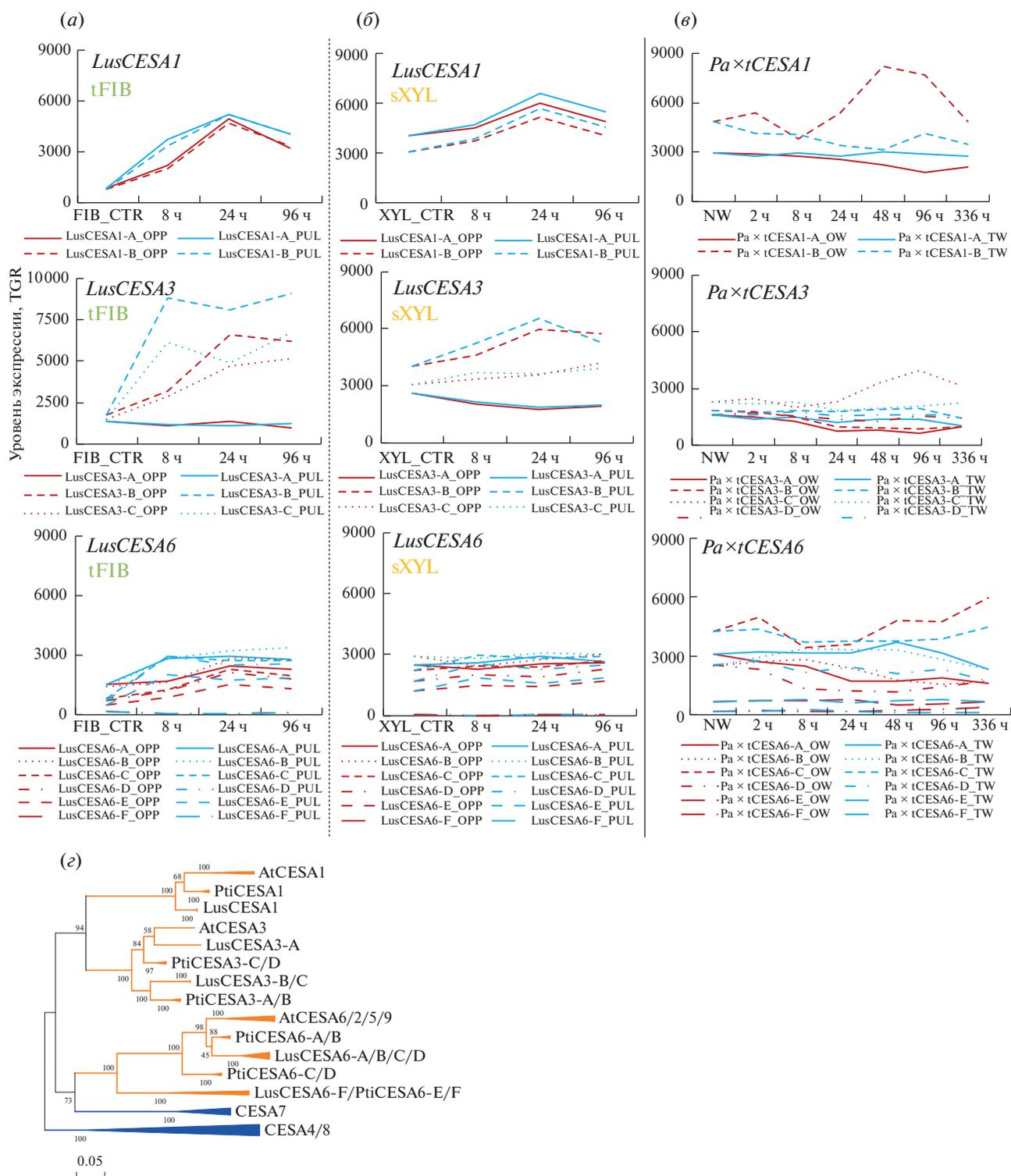
ложении вторичной клеточной стенки этот баланс резко сдвигнут в сторону *SCW CESA*.

Изменения экспрессии генов *Pa×tCESA* в древесине натяжения тополя более многоплановы, чем в образцах льна. Так, в ходе гравитовета наблюдалась активация экспрессии некоторых *Pa×tCESA* в ксилемных тканях, расположенных со стороны OW, по сравнению с TW (*Pa×tCESA1* и *Pa×tCESA4*; рис. 6в, 7в). В аналогичных образцах льна экспрессия ни одной из изоформ *LusCESA* в образце OPP не превышала таковую в образце PUL. Было высказано предположение, что механизмы биосинтеза клеточной стенки флоэмных волокон тополя могут отличаться от биосинтеза клеточной стенки ксилемных волокон с третичной клеточной стенкой, поскольку нокаут генов *SCW PtiCESA* по-разному сказывался на морфологии этих клеток [28]. При этом у льна все базовые характеристики третичной клеточной стенки, конститутивно формируемой во флоэмных волокнах, аналогичны таковым в индуцируемой в ксилемных волокнах в ходе гравитовета [21].

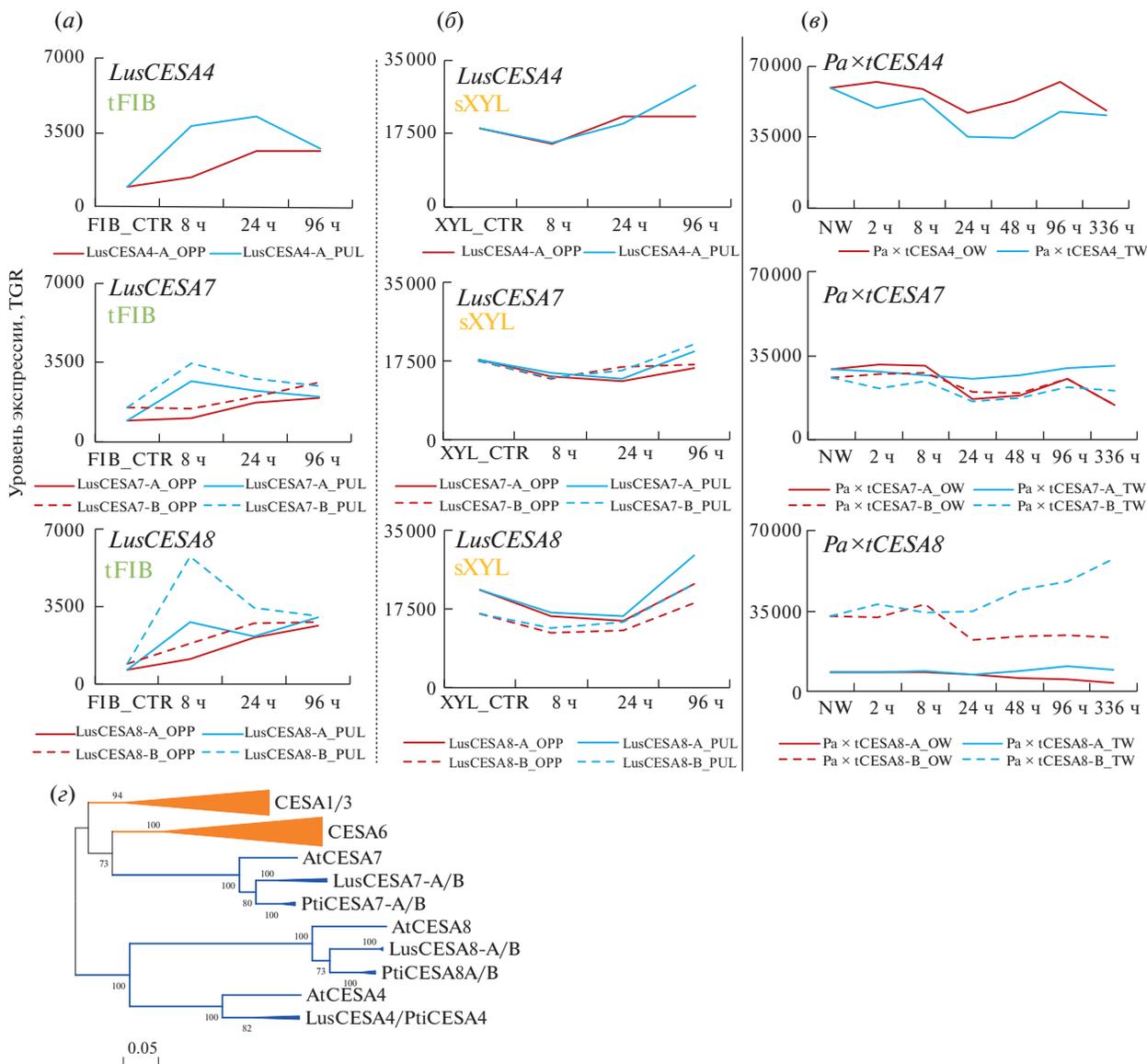
Разные гены, кодирующие различные изоформы одного и того же варианта целлюлозосинтазы (например, *CESA3*), имели различные паттерны экспрессии, причем некоторые закономерности выявлялись во всех проанализированных модельных системах. Так, ген *CESA6-F* имел существенно более низкий уровень экспрессии во всех образцах (лен и тополь) по сравнению с другими ге-

нами первичных изоформ (на порядок/порядки), что позволяет предположить функциональные отличия кодируемого им продукта от продуктов других *CESA6*. Наглядно продемонстрирована диверсификация экспрессии различных изоформ гена *LusCESA3*: наблюдалось увеличение экспрессии *LusCESA3-B* и *LusCESA3-C* в волокнах с тянущей стороны и низкий уровень экспрессии гена *LusCESA3-A* во всех проанализированных тканях (рис. 6а, 6б). Вероятно, продукт гена *LusCESA3-A*, как и *LusCESA6-F*, функционально отличается от других членов рассматриваемой клады и не ассоциирован с реализацией гравитовета.

В ходе развития гравитовета динамика экспрессии некоторых генов *CESA* сходным образом отличалась в образцах тянущей и противоположной стороны стебля во всех модельных системах. Так, во всех образцах с тянущей стороны стебля происходила активация экспрессии *CESA8-B* (рис. 7). Подобный эффект отмечался также в древесине натяжения осины (*P. tremula*); было даже высказано предположение, что третичная клеточная стенка в древесине натяжения синтезируется особым комплексом, который состоит исключительно из *CESA8-B* [26]. Это предположение было опровергнуто недавно опубликованной работой, согласно которой нокаут любого из генов *SCW CESA* (*PtiCESA4*, или *PtiCESA7A/B*, или *PtiCESA8A/B*) приводит к тому, что в ксилемных и флоэмных



**Рис. 6.** Экспрессия генов *PCW CESA* в изолированных волокнах льна (а), в ксилемной части стебля льна (б) и в древесине тополя (OW, TW) (в) в ходе гравитовета. В качестве первой точки приведены данные для контрольных растений, которые не подвергались гравитостимуляции; (д) – филогенетическое древо CESA резуховидки, тополя (*P. trichocarpa*) и льна. Построено для аминокислотных последовательностей CESA (Mokshina et al., 2014) с помощью программы MEGA7 (Maximum Likelihood метод, модель JTT+G). Клады, несущие изоформы PCW CESA (оранжевый), объединены; клады для изоформ SCW CESA (синий) объединены для разных растений.



**Рис. 7.** Экспрессия генов *SCW CESA* в изолированных волокнах льна (а), в ксилемной части стебля льна (б) и в древесине тополя (OW, TW) (в) в ходе гравитответа. В качестве первой точки приведены данные для контрольных растений, которые не подвергались гравитостимуляции; (д) – филогенетическое древо CESA резуховидки, тополя (*P. trichocarpa*) и льна. Построено для аминокислотных последовательностей CESA (Mokshina et al., 2014) с помощью программы MEGA7 (Maximum Likelihood метод, модель JTT+G). Клады, несущие изоформы SCW CESA (синий), объединены; клады для изоформ PCW CESA (оранжевый) объединены для разных растений.

волокнах гравитостимулированных растений тополя не формируется третичная клеточная стенка [28].

В экспериментальных работах, посвященных функционированию целлюлозосинтазных комплексов, периодически возникает вопрос о стехиометрии входящих в них изоформ. Принято считать, что SCW CESA в комплексах находятся в эквимольных соотношениях, т.е. 1 : 1 : 1 для CESA4, 7, 8, как показано при отложении вторичных стенок в ксилеме резуховидки (*A. thaliana*) [29] и древеси-

не ели обыкновенной (*Picea abies*) [26]. Стехиометрия изоформ CESA1, 3, 6 при формировании первичной клеточной стенки резуховидки также определена как эквимольная, т.е. 1 : 1 : 1 [30]. Однако в древесине осины (*P. tremula*), как установлено при масс-спектрометрическом анализе представленности пептидных фрагментов, специфичных для конкретных изоформ, соотношение SCW CESA составляет 3 : 2 : 1 (PtaCESA8a/b : PtaCESA4 : PtaCESA7a/b), причем в древесине натяжения оно меняется на 8 : 3 : 1 [26].

Судя по нашим данным, полученным при анализе динамики уровня мРНК соответствующих генов, стехиометрия как PCW, так и SCW CESA подвижна и может различаться, т.к. не все изоформы активируются в равной степени. Например, *LusCESA3-B* и *LusCESA3-C* активируются в большей степени во флоэмных волокнах с тянущей стороны. Также остается открытым вопрос о том, различается ли стехиометрия CESA в волокнах различного происхождения (флоэмные и ксилемные).

Вопрос о стехиометрии изоформ связан с вопросом их функциональных различий, в частности с характером расположения изоформ в комплексе, их взаимодействия между собой и другими вспомогательными белками. Анализ функциональных особенностей SCW CESA показал отличия в сайт-специфичности при белковых взаимодействиях, что может обуславливаться их положением в комплексе. Так, показано, что CESA7 имеет наибольшую сайт-специфичность, и положение этого белка наиболее критично для функционирования всего комплекса, тогда как CESA8, напротив, в наименьшей степени обладает специфичностью при взаимодействии с другими белками [31]. Интересно, что именно целлюлозосинтаза AtCESA7 способна частично восстанавливать биосинтез целлюлозы первичной клеточной стенки при трансформации кодирующего ее гена в мутанты резуховидки *cesa3*, а целлюлозосинтаза AtCESA1 может частично восстановить биосинтез вторичной клеточной стенки у мутанта *cesa8ko* [7]. Кроме того, согласно филогенетическому анализу, клада генов, кодирующих CESA7, отличается от клад других SCW CESA (рис. 7e).

Таким образом, гравистимуляция приводит к активации экспрессии генов некоторых изоформ LusCESA, при этом во флоэмных волокнах льна подобная активация может быть с большой вероятностью ассоциирована с перестройками в третичной клеточной стенке волокна, а в ксилемных тканях и древесине натяжения активация CESA может быть связана с перестройками и биосинтетическими процессами в разных типах клеток. В целом полученные данные свидетельствуют об особенностях набора различных изоформ целлюлозосинтаз при формировании третичной клеточной стенки. На каких именно параметрах биосинтеза целлюлозы эти особенности сказываются, предстоит выяснить в дальнейших исследованиях.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для оценки экспрессии генов CESA использовали нормализованные транскриптомные данные, размещенные в базе данных FIBexDB, подбаза

транскриптомов льна (<https://ssl.cres-t.org/fibex/flax/>, [23]). Для растений льна транскриптомные данные (в двух повторностях) были получены нами ранее для изолированных волокон и ксилемной части стебля прямостоячих растений (tFIBb, sXYL), а также с тянущей (tFIBb\_PUL, sXYLb\_PUL) и противоположной стороны (tFIBb\_OPP, sXYLb\_OPP) стебля в ходе развития гравитропической реакции (через 8, 24, 96 ч после наклона) (номер проекта в NCBI PRJNA631357) (табл. 1). Транскриптомные данные были верифицированы с помощью количественной ПЦР путем попарного сравнения экспрессии некоторых изоформ LusCESA, а также генов других белков, в волокнах на разных сторонах стебля и с волокнами контрольных растений [24]. Аннотация генов целлюлозосинтаз была проведена согласно работе Mokshina et al. [14].

Для древесины тополя использовали транскриптомные данные эксперимента [25] (номер проекта в NCBI PRJNA398515), размещенные в FIBexDB, подбаза транскриптомов тополя (<https://ssl.cres-t.org/fibex/poplar/>, [23]). Zinkgraf et al. [25] наклоняли 6-месячные растения тополя (*P. alba* × *tremula* INRA 717-1B4) до горизонтального положения и отбирали образцы из участка стебля 20–40 междоузлия после удаления коры через 2, 8, 24, 48, 96 и 336 ч гравистимуляции, собирая ксилемную часть лезвием с соответствующих сторон (TW, OW) (табл. 1); далее проводили RNA-seq-анализ [25]. Аннотация генов CESA тополя проведена нами на основе работы Kumar et al. [19] и с помощью сервиса Popgenie (<https://popgenie.org/>) (табл. 2). Согласно номенклатуре, предложенной в работе Kumar et al. [19], в префиксе генов CESA *P. trichocarpa* сокращается до *Pti*, *P. tremula* — до *Pta*, *P. canescens* (*alba* × *tremula*) — до *Pa* × *t*. Для генов льна и тополя указан ID согласно базе данных Phytosome (<https://phytosome-next.jgi.doe.gov/>), в которой в качестве префиксов для обозначения генов льна и тополя используются Lus и Potri соответственно.

Кластеризацию проводили с помощью опций базы данных FIBexDB: список номеров генов помещали в окно “search by multiple queries”. После вывода на экран данных экспрессии для выбранных генов и образцов выбирали алгоритм для кластеризации k-means (Cluster3) (число кластеров — 4), Pearson correlation.

Построение филогенетического древа на основе аминокислотных последовательностей CESA льна (*L. usitatissimum*), тополя (*P. trichocarpa*) и резуховидки (*A. thaliana*) [14] проводили с помощью программы MEGA7 (Maximum Likelihood метод, модель JTT+G).

**Таблица 1.** Описание образцов, транскриптомные данные которых были использованы в работе

№	Название образца	Растение	Описание	Ссылка
1	tFIBb	<i>L. usitatissimum</i>	Изолированные волокна с третичной клеточной стенкой (tFIBb). Нижняя часть стебля, 5 см, без наклона	[32]
2	tFIBb_PUL8/24/96	<i>L. usitatissimum</i>	Изолированные волокна с третичной клеточной стенкой с тянущей стороны (PUL) стебля через 8, 24 и 96 ч после наклона	[21, 24]
3	tFIBb_OPP8/24/96	<i>L. usitatissimum</i>	Изолированные волокна с третичной клеточной стенкой (tFIB) с противоположной стороны (OPP) стебля через 8, 24 и 96 ч после наклона	[21, 24]
4	sXYLb	<i>L. usitatissimum</i>	Ксилемная часть стебля с вторичной клеточной стенкой (sXYL). Нижняя часть стебля, 5 см, без наклона	[32]
5	sXYLb_PUL8/24/96	<i>L. usitatissimum</i>	Ксилемная часть стебля с вторичной клеточной стенкой (sXYL) с тянущей стороны (PUL) стебля через 8, 24 и 96 ч после наклона	[21, 24]
6	sXYLb_OPP8/24/96	<i>L. usitatissimum</i>	Ксилемная часть стебля с вторичной клеточной стенкой (sXYL) с противоположной стороны (OPP) стебля через 8, 24 и 96 ч после наклона	[21, 24]
7	NW_0	<i>P. alba</i> × <i>tremula</i>	Нормальная древесина, без наклона	[25]
8	TW_2/8/24/48/96/336	<i>P. alba</i> × <i>tremula</i>	Древесина натяжения после 2, 8, 24, 48, 96 и 336 ч гравистимуляции	[25]
9	OW_2/8/24/48/96/336	<i>P. alba</i> × <i>tremula</i>	Древесина с противоположной стороны после 2, 8, 24, 48, 96 и 336 ч гравистимуляции	[25]

**Таблица 2.** Номера генов *CESA* и их сокращения

Ген льна (Phytozome)	Название гена	Ген тополя (Phytozome)	Название гена*
<i>PCW CESA</i>			
<i>Lus10018902</i>	<i>LusCESA1-A</i>	<i>Potri.018G029400</i>	<i>PtiCESA1-A/Pa</i> × <i>tCESA1-A</i>
<i>Lus10028597</i>	<i>LusCESA1-B</i>	<i>Potri.006G251900</i>	<i>PtiCESA1-B/Pa</i> × <i>tCESA1-B</i>
<i>Lus10039607</i>	<i>LusCESA3-A</i>	<i>Potri.006G052600</i>	<i>PtiCESA3-A/Pa</i> × <i>tCESA3-A</i>
<i>Lus10007538</i>	<i>LusCESA3-B</i>	<i>Potri.016G054900</i>	<i>PtiCESA3-B/Pa</i> × <i>tCESA3-B</i>
<i>Lus10012198</i>	<i>LusCESA3-C</i>	<i>Potri.009G060800</i>	<i>PtiCESA3-C/Pa</i> × <i>tCESA3-C</i>
		<i>Potri.001G266400</i>	<i>PtiCESA3-D/Pa</i> × <i>tCESA3-D</i>
<i>Lus10006161</i>	<i>LusCESA6-A</i>	<i>Potri.005G087500</i>	<i>PtiCESA6-A/Pa</i> × <i>tCESA6-A</i>
<i>Lus10041063</i>	<i>LusCESA6-B</i>	<i>Potri.007G076500</i>	<i>PtiCESA6-B/Pa</i> × <i>tCESA6-B</i>
<i>Lus10003526</i>	<i>LusCESA6-C</i>	<i>Potri.005G194200</i>	<i>PtiCESA6-C/Pa</i> × <i>tCESA6-C</i>
<i>Lus10002939</i>	<i>LusCESA6-D</i>	<i>Potri.002G066600</i>	<i>PtiCESA6-D/Pa</i> × <i>tCESA6-D</i>
<i>Lus10002940</i>	<i>LusCESA6-E</i>	<i>Potri.013G019800</i>	<i>PtiCESA6-E/Pa</i> × <i>tCESA6-E</i>
<i>Lus10022449</i>	<i>LusCESA6-F</i>	<i>Potri.005G027600</i>	<i>PtiCESA6-F/Pa</i> × <i>tCESA6-F</i>
<i>SCW CESA</i>			
<i>Lus10008226</i>	<i>LusCESA4</i>	<i>Potri.002G257900</i>	<i>PtiCESA4/Pa</i> × <i>tCESA4</i>
<i>Lus10043485</i>	<i>LusCESA7-A</i>	<i>Potri.006G181900</i>	<i>PtiCESA7-A/Pa</i> × <i>tCESA7-A</i>
<i>Lus10043486</i>	<i>LusCESA7-B</i>	<i>Potri.018G103900</i>	<i>PtiCESA7-B/Pa</i> × <i>tCESA7-B</i>
<i>Lus10007296</i>	<i>LusCESA8-A</i>	<i>Potri.011G069600</i>	<i>PtiCESA8-A/Pa</i> × <i>tCESA8-A</i>
<i>Lus10029245</i>	<i>LusCESA8-B</i>	<i>Potri.004G059600</i>	<i>PtiCESA8-B/Pa</i> × <i>tCESA8-B</i>

\* Поскольку при анализе транскриптомов *P. alba* × *tremula* использовали геном *P. trichocarpa* в качестве референсного [25], названия генов *PtiCESA* и *Pa*×*tCESA* совпадают.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что гравистимуляция вызывает перестройки в клеточной стенке флоэмных волокон льна (*L. usitatissimum*), которые сопровождаются кратковременной активацией биосинтетических процессов на ранних стадиях гравитовета с участием различных изоформ целлюлозосинтаз. В ксилемной части стебля льна гравистимуляция приводит к индукции образования третичной клеточной стенки в ксилемных волокнах, что сопровождается постепенным увеличением экспрессии генов целлюлозосинтаз, вовлеченных в формирование вторичной клеточной стенки (SCW LusCESA). Гравистимуляция древесины тополя (*Populus* sp.) также сопровождается активацией некоторых генов *PCW* и *SCW Pa*×*tCESA* в древесине натяжения. Активация экспрессии некоторых генов *PCW Pa*×*tCESA* и подавление экспрессии других генов *PCW Pa*×*tCESA* отмечались в древесине, расположенной на противоположной от древесины натяжения стороне стебля. Особую роль в гравитовете у различных систем (флоэмные волокна, древесина натяжения) может играть CESA8-B, поскольку увеличение экспрессии гена этой изоформы было продемонстрировано как для древесины натяжения, так и для флоэмных волокон с тянущей стороны стебля льна. Стехиометрия SCW CESA в волокнах льна и древесины натяжения тополя может быть сходной, а стехиометрия PCW CESA предположительно не эквивалентная.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Надежде Николаевне Ибрагимовой, с.н.с. лаборатории гликобиологии растений Казанского института биохимии и биофизики – обособленного структурного подразделения ФИЦ КазНЦ РАН, за участие в разработке подходов по изучению гравитовета растений льна.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 20-44-07005, работа с транскриптомной базой данных FIVexDB; грант 19-14-00361, биоинформатический анализ экспрессии генов *CESA* льна).

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ Казанского научного центра РАН (построение филогенетических деревьев).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nixon B.T., Mansouri K., Singh A., Du J., Davis J.K., Lee J.-G., Slabaugh E., Vandavasi V.G., O'Neill H., Roberts E.M., Roberts A.W., Yingling Y.G., Haigler C.H. // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 28696. <https://doi.org/10.1038/srep28696>
2. Purushotham P., Ho R., Zimmer J. // Sci. 2020. V. 369. P. 1089–1094. <https://doi.org/10.1126/science.abb2978>
3. Richmond T.A., Somerville C.R. // Plant Physiol. 2000. V. 124. P. 495–498. <https://doi.org/10.1104/pp.124.2.495>
4. Doblin M.S., Kureck I., Jacob-Wilk D., Delmer D.P. // Plant Cell Physiol. 2002. V. 43. P. 1407–1420. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf164>
5. Kumar M., Turner S. // Phytochem. 2015. V. 112. P. 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.07.009>
6. Hématy K., Höfte H. // In: Plant Cell Monographs / Ed. Verbelen J.-P., Vissenberg K. Springer Verlag, 2006. V. 6. P. 33–56. <https://ur.booksc.me/book/11611855/c97d70>
7. Carroll A., Mansoori N., Li S.D., Lei L., Vernhettes S., Visser R.G.F., Somerville C., Gu Y., Trindade L.M. // Plant Physiol. 2012. V. 160. P. 726–737. <https://doi.org/10.1104/pp.112.199208>
8. Watanabe Y., Schneider R., Barkwill S., Gonzales-Vigil E., Hill J.L., Jr., Samuels A.L., Persson S., Mansfield S.D. // PNAS. 2018. V. 115. P. E6366–E6374.
9. Song D., Shen J., Li L. // New Phytol. 2010. V. 187. P. 777–790. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03315.x>
10. Gorshkova T., Chernova T., Mokshina N., Ageeva M., Mikshina P. // New Phytol. 2018. V. 218. P. 66–72. <https://doi.org/10.1111/nph.14997>
11. Gorshkova T., Brutch N., Chabbert B., Deyholos M., Hayashi T., Lev-Yadun S., Mellerowicz E.J., Morvan C., Neutelings G., Pilate G. // Critic. Rev. Plant Sci. 2012. V. 31. P. 201–228. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.616096>
12. Guedes F.T.P., Laurans F., Quemener B., Assor C., Lainé-Prade V., Boizot N., Vigouroux J., Lesage-Descauses M.-C., Leplé J.-C., Déjardin A., Pilate G. // Planta. 2017. V. 246. P. 857–878. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2737-1>
13. Горшкова Т.А., Гурьянов О.П., Мокшина П.В., Ибрагимова Н.Н., Мокшина Н.Е., Сальников В.В., Агеева М.В., Аменицкий С.И., Чернова Т.Е., Чемикосова С.Б. // Физиология растений. 2010. Т. 57. № 3. С. 328–341.
14. Mokshina N., Gorshkova T., Deyholos M.K. // PLoS One. 2014. V. 9. P. e97949. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097949>
15. Wang Z., Hobson N., Galindo L., Zhu S., Shi D., McDill J., Yang L., Hawkins S., Neutelings G., Datla R., Lambert G., Galbraith D.W., Grassa C.J., Gerald A., Cronk Q.C.,

- Cullis C., Dash P.K., Kumar P.A., Cloutier S., Sharpe A.G., Wong G.K., Wang J., Deyholos M.K. // *Plant J.* 2012. V. 72. P. 461–473.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05093.x>
16. Mokshina N., Gorshkov O., Ibragimova N., Chernova T., Gorshkova T. // *Function. Plant Biol.* 2017. V. 44. P. 820–831.  
<https://doi.org/10.1071/FP17105>
  17. Clair B., Dejardin A., Pilate G., Alm eras T. // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9. P. 623.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00623>
  18. Gorshkova T., Mokshina N., Chernova T., Ibragimova N., Salnikov V., Mikshina P., Tryfona T., Banasiak A., Immerzeel P., Dupree P., Mellerowicz E.J. // *Plant Physiol.* 2015. V. 169. P. 2048–2063.  
<https://doi.org/10.1104/pp.15.00690>
  19. Kumar M., Thammannagowda S., Bulone V., Chiang V., Han K.H., Joshi C.P., Mansfield S.D., Mellerowicz E., Sundberg B., Teeri T., Ellis B.E. // *Trends Plant Sci.* 2009. V. 14. P. 248–254.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.02.004>
  20. Ibragimova N.N., Ageeva M.V., Gorshkova T.A. // *Protoplasma.* 2017. V. 254. P. 749–762.  
<https://doi.org/10.1007/s00709-016-0985-8>
  21. Petrova A., Kozlova L., Gorshkov O., Nazipova A., Ageeva M., Gorshkova T. // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. P. 660375.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.660375>
  22. Ibragimova N., Mokshina N., Ageeva M., Gurjanov O., Mikshina P. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 5322.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21155322>
  23. Mokshina N., Gorshkov O., Takasaki H., Onodera H., Sakamoto S., Gorshkova T., Mitsuda N. // *New Phytol.* 2021. V. 231. P. 512–515.  
<https://doi.org/10.1111/nph.17405>
  24. Gorshkov O., Mokshina N., Ibragimova N., Ageeva M., Gogoleva N., Gorshkova T. // *Funct. Plant Biol.* 2017. V. 45. P. 203–214.  
<https://doi.org/10.1071/FP16348>
  25. Zinkgraf M., Gertula S., Zhao S., Filkov V., Groover A. // *J. Integr. Plant Biol.* 2018. V. 60. P. 578–590.  
<https://doi.org/10.1111/jipb.12645>
  26. Zhang X., Dominguez P.G., Kumar M., Bygdell J., Miroshnichenko S., Sundberg B., Wingsle G., Niittyl  T. // *Plant Physiol.* 2018. V. 177. P. 1096–1107.  
<https://doi.org/10.1104/pp.18.00394>
  27. Liu L., Missirian V., Zinkgraf M., Groover A., Filkov V. // *BMC Genomics.* 2014. V. 15.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-S5-S3>
  28. Xu W., Cheng H., Zhu S., Cheng J., Ji H., Zhang B., Cao S., Wang C., Tong G., Zhen C., Mu L., Zhou Y., Cheng Y. // *New Phytol.* 2021. V. 231. P. 1478–1495.  
<https://doi.org/10.1111/nph.17338>
  29. Hill J.L., Jr., Hammudi M.B., Tien M. // *Plant Cell.* 2014. V. 26. P. 4834–4842.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.114.131193>
  30. Gonneau M., Desprez T., Guillot A., Vernhettes S., H fte H. // *Plant Physiol.* 2014. V. 166. P. 1709–1712.  
<https://doi.org/10.1104/pp.114.250159>
  31. Kumar M., Atanassov I., Turner S. // *Plant Physiol.* 2017. V. 173. P. 970–983.  
<https://doi.org/10.1104/pp.16.01642>
  32. Mokshina N., Gorshkov O., Galinousky D., Gorshkova T. // *Ind. Crop. Prod.* 2020. V. 152. P. 112549.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112549>

## Expression of Cellulose Synthase Genes during the Gravistimulation of Flax (*Linum usitatissimum*) and Poplar (*Populus alba* × *tremula*) Plants

N. E. Mokshina\*, \*\*, #, P. V. Mikshina\*, and T. A. Gorshkova\*

\*Phone: +7(843)231-90-39; e-mail: ne\_mokshina@kibb.knc.ru

\*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS, ul. Lobachevskogo 2/31, Kazan, 420111 Russia

\*\*Kazan Federal University, ul. Kremlevskaya 18, Kazan, 420008 Russia

Plant cellulose is synthesized on the plasma membrane by the cellulose synthase complex and a number of coenzymes. Different cellulose synthases are thought to be involved in the primary and secondary cell wall biosynthesis. Plant fibers, such as flax phloem fibers and xylem fibers of poplar tension wood, produce a tertiary cell wall with increased cellulose content and a lack of xylan and lignin. The composition and types of cellulose synthase complexes involved in the tertiary cell wall biosynthesis have not yet been established. Based on transcriptome data for flax (*Linum usitatissimum*) and poplar (*Populus alba* × *tremula*) plants, we evaluated the expression of genes encoding cellulose synthases during the development of a gravitropic response with the participation of the phloem and/or xylem fibers producing the tertiary cell wall. Changes in the expression of cellulose synthase genes characteristic of both primary and secondary cell walls in various model systems indicate the mobility of an ensemble of different cellulose synthases during the gravistimulation, which can affect both an individual cell type and a set of tissues with different types of cell walls. For the isolated flax phloem fibers, the involvement of both types of cellulose synthases in the formation of the tertiary cell wall at all stages of graviresponse was demonstrated.

*Keywords:* cellulose synthases, tertiary cell wall, plant fibers, transcriptome analysis



УДК 615.015:547.785.5

## ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГАЛОГЕНИДОВ 2-АМИНОБЕНЗИМИДАЗОЛИЯ И ПРОИЗВОДНЫХ ИМИДАЗО[1,2-*a*]БЕНЗИМИДАЗОЛА<sup>1</sup>

© 2022 г. А. А. Спасов\*, \*\*, О. Н. Жуковская\*\*\*, Н. А. Гурова\*, #, Л. В. Науменко\*,  
Н. В. Елисеева\*, А. Ф. Кучерявенко\*, В. А. Косолапов\*, Д. С. Яковлев\*, \*\*, В. Ю. Муравьева\*,  
В. А. Бабкова\*, Д. А. Бабков\*, Ю. В. Лифанова\*, А. С. Морковник\*\*\*

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

\*\*ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр», Россия, 400131 Волгоград, площадь Павших Борцов, 1

\*\*\*ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», Научно-исследовательский институт физической  
и органической химии, Россия, 344090 Ростов-на-Дону, ул. Стачки, 194/2

Поступила в редакцию 12.07.2021 г.

После доработки 10.08.2021 г.

Принята к публикации 14.08.2021 г.

Исследована биологическая активность галогенидов 2-аминобензимидазолия и производных 9-замещенных 2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов *in vitro*. Среди производных аминокбензимидазолия обнаружено соединение с ННН-1-ингибирующей активностью. Среди производных имидазобензимидазола найдены соединения, которые влияют на продолжительность рефрактерного периода предсердий крыс, агрегацию тромбоцитов, гемореологическую активность, подавляют образование конечных продуктов гликирования. У всех изученных соединений не выявлены DPP-4-ингибирующее, антиоксидантное действие, каппа-опиоидная агонистическая, 5-НТ<sub>2A</sub>- и 5-НТ<sub>3</sub>-антагонистическая активность.

**Ключевые слова:** имидазо[1,2-*a*]бензимидазол, галогениды 2-аминобензимидазолия, ННН-1-ингибирующая активность, антиагрегантное действие, гемореологическая активность, антигликирующий эффект

DOI: 10.31857/S0132342322020233

### ВВЕДЕНИЕ

При создании мультитаргетных лекарственных препаратов большое внимание уделяют так называемым привилегированным структурам. Под ними понимают некоторую неизменную часть молекулы, которая обеспечивает сродство соединений к широкому спектру биологических мишеней. При этом «непривилегированные» части молекул выполняют функции эффективных модуляторов взаимодействия мишень—лиганд [1–3]. Бензимидазол — привилегированная структура с широким потенциалом биологической активности,

в том числе кардиопротекторными свойствами [4–10].

Современное понятие кардиопротекции предполагает непосредственное влияние биологически активного препарата на кардиомиоциты и включает в себя различные варианты его воздействия, препятствующие возникновению ионно-, электрофизиологически и метаболически индуцируемого ремоделирования миокарда.

Один из важных факторов ремоделирования — активация натрий-водородного обменника (ННН-1), следствием которой являются патогенетические процессы «кальциевой перегрузки» клеток сердца и мозга, стимулирование прогипертрофического действия за счет ряда факторов, что, в конечном счете, и формирует морфологическую, электрофизиологическую и функциональную ветви общего процесса ремоделирования миокарда. Селективное ингибирование ННН-1 сарколеммы (клеточной мембраны мышечной клетки или мышечного волокна) способ-

<sup>1</sup> Дополнительные материалы к этой статье доступны по doi 10.31857/S0132342322020233 для авторизованных пользователей.

Сокращения: МЭК — минимальная эффективная концентрация; DPP-4 — дипептидилпептидаза 4-го типа; EC<sub>50</sub> — полумаксимальная эффективная концентрация; 5-НТ<sub>2A</sub>, 5-НТ<sub>3</sub> — серотониновые рецепторы подтипов 2A и 3; ННН-1 — натрий-водородный обменник изоформа 1.

# Автор для связи: (эл. почта: gurova.vlgmed@mail.ru).

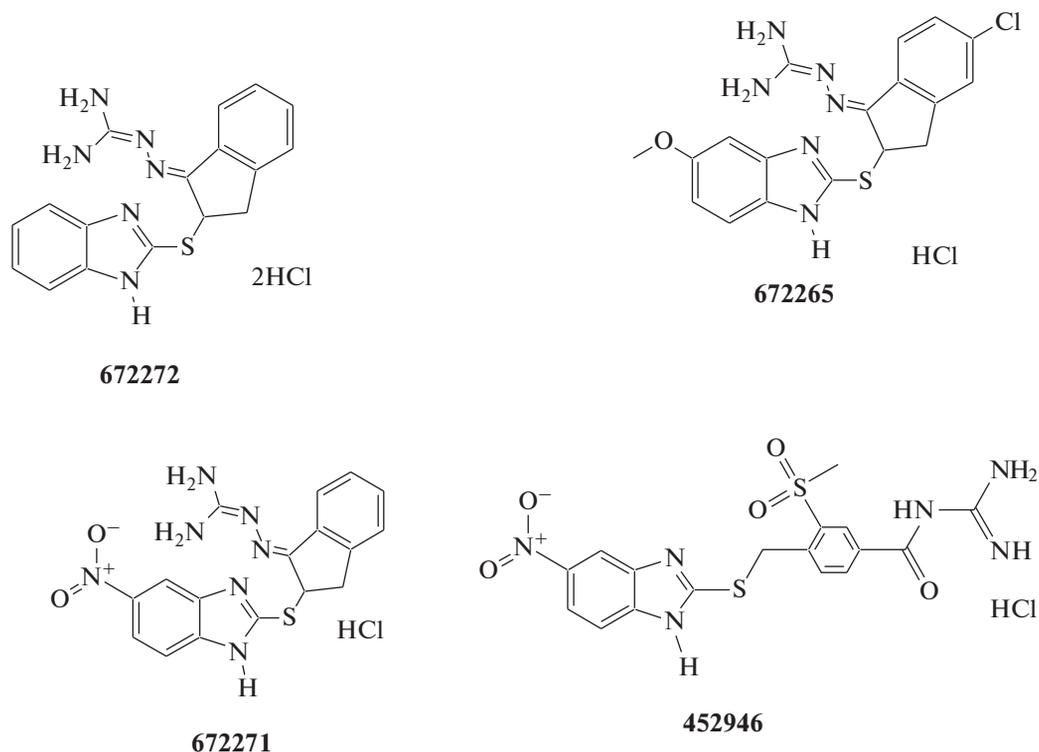


Рис. 1. Химические структуры ингибиторов NHE-1 – производных 2-меркаптобензимидазола [13].

но уменьшить ишемические/реперфузионные нарушения и улучшить восстановление функции органов после повреждения [11, 12]. Соответственно, важную роль в блокировании ремоделирования могли бы играть ингибиторы NHE-1. Структуры некоторых из них представлены на рис. 1 [13].

С другой стороны, интересным и перспективным типом кардиопротекторных агентов способны служить соединения, ограничивающие действие серотонина на сердце и сосуды [14]. Имеются также литературные данные о важной роли в повреждении миокарда предварительной активации каппа-опиоидных рецепторов, обусловленной связанным с этим формированием феноменом ишемического прекондиционирования миокарда и необратимых повреждений кардиомиоцитов в условиях коронароокклюзии *in vivo* [15]. Именно с этим связаны кардиопротекторные свойства каппа-агонистов, которые препятствуют повреждению миокарда за счет снижения (общего для опиоидов) образования сАМР в миокарде во время ишемии и реперфузии, а также за счет селективной активации протеинкиназы С, NO-синтазы и открытия  $K_{ATP}$ -каналов [16].

Действие кардиопротекторов приводит к оптимизации процессов генерирования и расхода

энергии, коррекции функции дыхательной цепи, восстановлению оксидантно-антиоксидантного баланса и, таким образом, способствует выживаемости кардиомиоцитов в условиях ишемии/реперфузии, снижает тромбогенный потенциал и улучшает гемореологический профиль крови.

Цель настоящего исследования – поиск соединений, активных в отношении мишеней, участвующих в процессах кардиопротекции, среди галогенидов 2-аминобензимидазолия и производных 9-замещенных 2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов.

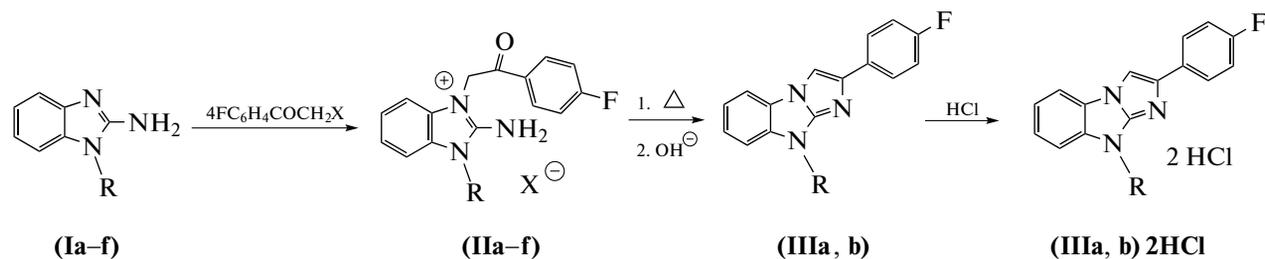
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Галогениды 2-аминобензимидазолия обладают разнообразной биологической активностью [8]. Кроме того, эти соли интересны и в качестве исходных соединений для получения фармакологически активных производных трициклических систем на основе бензимидазола.

В настоящей работе исследованы фармакологические свойства шести синтезированных нами новых галогенидов 2-аминобензимидазолия (**IIa–f**) (схема 1), а также двух полученных ранее [17] 9-замещенных производных 2-(4-фтор)фенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазола (**IIIa, b**), про-

дуктов циклизации солей (**II**d, **e**). Выходы солей (**II**a–**f**) высокие: 92–95%. При использовании 4-фторфенацилброма стадия циклизации проводится в очень мягких условиях (ацетон, комнатная температура), при использовании же в

качестве реагента 4-фторфенацилхлорида требуются, судя по получению соли (**II**f), существенно более жесткие условия (длительное, 8–10-часовое кипячение раствора реагентов в ацетонитриле).



(**I**a), (**II**a): R = Et

(**I**b), (**II**b): R = All

(**I**c), (**II**c): R = Pr

(**I**d), (**II**d): R = (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N(Me)<sub>2</sub>

(**I**e), (**II**e): R = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(Et)<sub>2</sub>; X = Br

(**I**f), (**II**f): R = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O, X = Cl

(**III**a): R = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(Me)<sub>2</sub>; (**III**b): R = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(Et)<sub>2</sub>

Схема 1. Схема синтеза производных 2-(4-фтор)фенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазола.

Строение полученных солей (**II**a–**f**) подтверждено данными ИК- и <sup>1</sup>ЯМР-спектров, а также данными элементного анализа (приведены в дополнительных материалах). В ИК-спектрах этих солей присутствуют, в частности, характеристические полосы поглощения СО-группы в области 1693–1697 см<sup>-1</sup> и две полосы валентных колебаний первичной NH<sub>2</sub>-группы в области 3265–3160 см<sup>-1</sup>. В спектрах <sup>1</sup>H-ЯМР указанных солей наблюдаются два двухпротонных синглета при 5.99 (6.09) и 8.91 (8.94) м.д., относящиеся к метиленовой группе ароилметильных заместителей и NH<sub>2</sub>-групп (2H) соответственно.

Для обоих типов солей (**II**a–**f**) было проведено тестирование на наличие активности в отношении некоторых мишеней, определяющих возможные кардиопротекторные свойства.

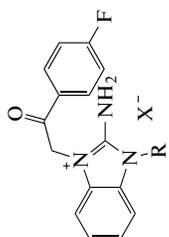
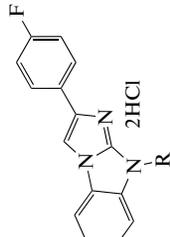
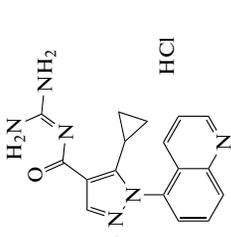
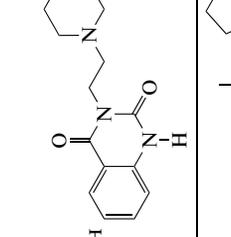
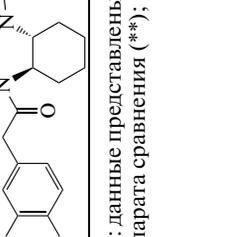
По характеру N<sup>9</sup>-заместителя соединения (**II**a–**f**) и (**III**a, **b**) можно разделить на две группы: с алкильными (аллильными) N-заместителями и с N-заместителями диалкиламино(морфолино)этильного типа (табл. 1–3).

Проведенный нами ранее кластерный анализ массива из 59 производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов на их возможную NHE-1-ингибирующую активность *in vitro* в концентрации 10 нМ показал, что все исследованные таким образом соединения можно разделить на

три группы: 1) высокоактивные – Δ(10 нМ) > 54%; 2) умеренно активные – 54% ≥ Δ(10 нМ) > 42%; 3) низкоактивные – Δ(10 нМ) < 42%. Было также установлено, что среди N<sup>1</sup>-замещенных 2-аминобензимидазолов наиболее перспективными в отношении NHE-1-ингибирующей активности должны быть структуры с морфолиноэтильным или пиперидиноэтильным N<sup>1</sup>-заместителем. Что касается имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов, то сам по себе его трициклический скаффолд не предопределяет существенную NHE-1-ингибирующую активность, но возможно ее значительное усиление под влиянием заместителей. Позднее при проведении дополнительного ансамблевого дискриминантного анализа 25 соединений [18] было подтверждено, что N<sup>1</sup>-замещенные 2-аминобензимидазолы, не имеющие полностью циклического гуанидинового структурного фрагмента, должны обладать более высокой NHE-1-ингибирующей активностью, чем имеющие такой фрагмент N<sup>9</sup>-замещенные имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы, при одном и том же N-заместителе.

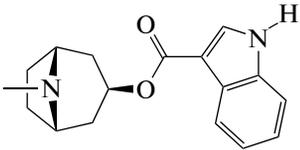
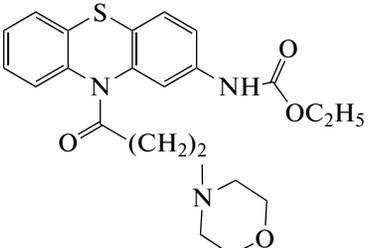
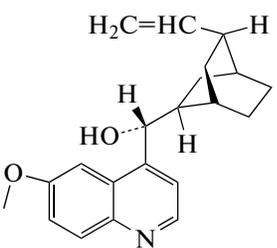
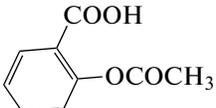
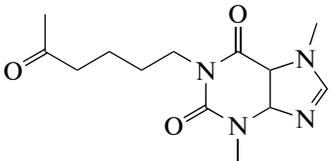
При экспериментальном исследовании все изученные соединения продемонстрировали наличие NHE-1-ингибирующей активности, сопоставимой с препаратом сравнения зонипоридом. При этом различия по величине Δ% изменения светопропускания богатой тромбоцитами плазмы оказались статистически значимыми по отно-

**Таблица 1.** NHE-1-ингибирующая, 5-HT<sub>2A</sub>-антагонистическая и капша-опиоидная агонистическая активность галогенидов 2-аминобензимидазола и производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола

Соединение	R	X <sup>-</sup>	NHE-1-ингибирующая активность, Δ% (10 нМ)	5-HT <sub>2A</sub> -антагонистическая активность, Δ% (1 мкМ)	Капша-опиоидная агонистическая активность, Δ% (100 мкМ)
	(IIa)	Br <sup>-</sup>	45.22 ± 24.89	—	5.2 ± 3.8
	(IIb)	Br <sup>-</sup>	39.09 ± 6.56*	-11.2 ± 5.1	2.9 ± 0.5*
	(IIc)	Br <sup>-</sup>	33.63 ± 4.84*	-19.1 ± 6.3*	4.8 ± 0.3*
	(IId)	Br <sup>-</sup>	35.45 ± 14.33	—	1.4 ± 1.2
	(IIE)	Br <sup>-</sup>	—	3.7 ± 5.6	—
	(IIF)	Cl <sup>-</sup>	70.93 ± 7.99*, **	-9.3 ± 2.3*	12.6 ± 1.6*
	(IIIa)	2HCl	48.74 ± 10.90*	0	4.2 ± 1.3
	(IIIb)	2HCl	41.69 ± 10.00*	4.9 ± 4.9	2.4 ± 1.6
 Зонипорид HCl			48.05 ± 7.09*	—	—
 Кетансерин			—	81.4 ± 1.5*	—
 U-50488			—	—	23.4 ± 2.4*

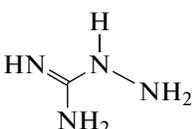
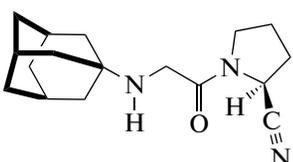
Примечание: данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение. Звездочками отмечены статистически значимые отличия от контрольной группы (\*) и препарата сравнения (\*\*); U-критерий Манна-Уитни, *p* < 0.05.

**Таблица 2.** Сердечно-сосудистые эффекты галогенида 2-аминобензимидазолия и производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола

Соединение	5-НТ <sub>3</sub> -антагонистическая активность, Δ% (1 мкМ)	Влияние на рефрактерный период кардиомиоцитов, МЭК, 10 мкМ	Влияние на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов, Δ% (100 мкМ)	Изменение индекса агрегации эритроцитов, Δ% (100 мкМ)
(IIe)	3.7 ± 5.6	–	–	–17.12 ± 5.2*
(IIIa)	0	6.0 ± 1.0*, ***	50.9 ± 13.2*	–30.49 ± 4.4*, **
(IIIb)	4.9 ± 4.9	6.5 ± 1.0*, ***	18.12 ± 2.36*	–26.37 ± 1.04*
Трописетрон 	–30.2 ± 4.0*	–	–	–
Этмозин 	–	5.1 ± 1.0*, ***	–	–
Хинидин 	–	34.0 ± 10.0*	–	–
Ацетилсалициловая кислота 	–	–	–52.1 ± 4.2*	–
Пентоксифиллин 	–	–	–	–18.61 ± 3.83*

Примечание: данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение. Звездочками отмечены статистически значимые отличия от контрольной группы (\*), препарата сравнения (\*\*) и хинидина (\*\*\*); *U*-критерий Манна–Уитни, *p* < 0.05.

**Таблица 3.** Антигликирующая и DPP-4-ингибирующая активность галогенида 2-аминобензимидазолия и производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола

Соединение	Антигликирующая активность (ингибирование флуоресценции БСА), 1 мМ, Δ%	DPP-4-ингибирующая активность (100 мкМ)
(IIe)	11.4 ± 9.49**	–
(IIIa)	97.1 ± 0.43*	3.54 ± 5.23
(IIIb)	57.1 ± 23.69*	–1.02 ± 3.44
Аминогуанидин 	70.7 ± 5.71*	–
Вилдаглиптин 	–	–98.89 ± 1.03*

Примечание: данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение. Звездочками отмечены статистически значимые отличия от контрольной группы (\*) и препарата сравнения (\*\*); *U*-критерий Манна–Уитни, *p* < 0.05.

шению к контролю (*p* < 0.05) (табл. 1). Наибольшую активность проявила соль (IIf) с морфолиноэтильным *N*-заместителем.

Ранее метод кластерного анализа был применен нами и для изучения влияния структуры 301 испытанных оригинальных производных бензимидазола на их способность увеличивать продолжительность рефрактерного периода (рефрактерность) миокарда предсердий крыс. В результате все структуры и в этом случае были разбиты на три класса активности: 1) высокоактивные (МЭК < 72.5 мкМ); 2) умеренно активные (72.5 мкМ ≤ МЭК < 279 мкМ); 3) низкоактивные (МЭК ≥ 279 мкМ). При этом также был сделан вывод о перспективности *N*<sup>9</sup>-производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола для создания на их основе структурно новых антиаритмических соединений с высоким индексом значимости. *N*<sup>1</sup>-замещенные бензимидазолы, согласно этим данным, характеризовались, напротив, выраженным отрицательным значением этого индекса, что позволило сделать статистически значимый отрицательный прогноз для них по данному виду активности. Дополнительным важным результатом при этом было выявление таких заместителей-фармакофоров в положении 2 имидазобензимидазола, присутствие которых может служить достоверным признаком высокой антиаритмической активности. Ими являются *трет*-бутильный, тиенильный и арильный заместители, особенно при наличии в

молекуле *N*<sup>9</sup>-(2-диэтиламино)этильного заместителя.

Все эти предварительные выводы нашли свое полное подтверждение в данном исследовании. Действительно, наиболее активными в отношении увеличения продолжительности рефрактерного периода предсердий крыс оказались представители 2-фторфенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазолов, имеющих в положении *N*<sup>9</sup> диэтиламиноэтильный (IIIa) и диметиламиноэтильный (IIIb) заместители. По своей активности они оказались примерно равны препарату сравнения этмозину и статистически значимо превосходили хинидин (табл. 2).

Аналогичный подход с кластерным анализом был применен и для градации бензимидазолов по их гемореологической активности в зависимости от структуры. При этом ранее был использован массив из 277 соединений десяти различных структурных классов. При аналогичном распределении структур по активности соединения были разнесены по трем группам: 1) высокоактивные (EC<sub>50</sub> < 326 мкМ); 2) умеренно активные (325 мкМ ≤ EC<sub>50</sub> < 100 мкМ); 3) низкоактивные (EC<sub>50</sub> ≥ 100 мкМ). С достоверным уровнем значимости было показано, что *N*<sup>9</sup>-замещенные имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы и в этом случае могут быть отнесены к перспективному классу структур с высокой гемореологической активностью, особенно при наличии в положении 2 таких арильных

заместителей, как 4-фторфенильная и 3,4-дихлорфенильная группы, а в положении 9 – пирролидиноэтильной или диметиламиноэтильной фармакофорных групп. В соответствии с этими результатами в ходе настоящего исследования было показано, что 2-(4-фтор)фенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазолы (**IIIa**, **b**) с *N*<sup>9</sup>-диметил(диэтил)аминоэтильной группой достоверно снижали индекс агрегации эритроцитов, тем самым улучшая гемореологические свойства крови, превосходя по своей активности препарат сравнения пентоксифиллин (табл. 2). Существенной активностью, впрочем, характеризуется и четвертичная бензимидазолиевая соль (**IIIe**), лишь незначительно уступающая по активности препарату сравнения.

На модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов соединение (**IIIa**) продемонстрировало антиагрегантную активность, сравнимую с таковой у препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты, тогда как соединение (**IIIb**) в этом случае проявило лишь незначительный антиагрегантный эффект (табл. 2).

При изучении антигликирующей активности было показано, что соединение (**IIIb**) подавляет образование конечных продуктов гликирования, причем примерно столь же эффективно, как и препарат сравнения аминогуанидин с хорошо известной антигликирующей активностью (табл. 3).

Среди не наблюдающихся у изученных соединений видов активности следует указать на отсутствие 5-НТ<sub>3</sub>- и 5-НТ<sub>2A</sub>-антагонистического действия, каппа-опиоидной агонистической и DPP-4-ингибирующей активности (табл. 1–3), равно как и на отсутствие антиоксидантной активности при ее тестировании с использованием модели аскорбат-зависимого перекисного окисления липидов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Химический синтез.** Исходные 1-замещенные 2-аминобензимидазолы (**Ia–f**) синтезировали из 2-аминобензимидазола и соответствующего алкилбромиды или диалкиламиноалкилхлорида в двухфазной системе 42%-ный NaOH–ацетон [19]. 2-Аминобензимидазол получали из технического метил-*N*-бензимидазол-2-карбамата (БМК), полупродукта синтеза фунгицида беномил [20]. Использовали также коммерчески доступные реагенты фторфенацилбромид и фторфенацилхлорид (Alfa Aesar, Великобритания).

Соединения (**IIIa**, **b**) синтезировали по методике Анисимовой с соавт. [17].

Контроль за ходом реакций и чистотой синтезируемых соединений осуществляли методом ТСХ на пластинах с Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (элюент – хлороформ,

хроматограммы проявляли парами иода во влажной камере). ИК-спектры регистрировали на приборе JASCOFT/IR-6800 (Jasco, Япония) методом нарушенного полного внутреннего отражения в порошке, спектры <sup>1</sup>H-ЯМР (δ, м.д.) – на спектрометре Varian Unity 300 (Varian, США) в DMSO-d<sub>6</sub> с использованием в качестве референсного сигнала остаточных протонов дейтерорастворителя. Температуру плавления определяли на приборе Fisher Johns Melting Point Apparatus (Fisher Scientific, США).

**Общая методика синтеза четвертичных солей 2-амино-бензимидазолия (IIa–e).** В раствор 2 ммоль амина (**Ia–e**) в ацетоне (15 мл) вносили 2 ммоль 4-фторфенацилбромиды. Бромиды (**IIa–e**) при этом начинали практически сразу же выпадать в осадок. После выдерживания реакционной смеси при комнатной температуре в течение 8–10 ч осадок соли отфильтровывали, тщательно промывали ацетоном и высушивали на воздухе. Выход соединений (**IIa–e**) был близок к количественному (92–95%). Для дальнейшей циклизации такие соли могут быть использованы без дополнительной очистки.

Сведения о выходе целевых продуктов, температура плавления, данные спектров соединений, а также данные элементного анализа соединений (**IIa–e**) приведены в дополнительных материалах.

**Биологическая активность полученных соединений.** Эксперименты проводили на 132 белых неинбредных крысах обоего пола массой 250–450 г (ООО “НПК БиоТех”, вет. свидетельство № 2003680881), 36 морских свинках обоего пола массой 280–320 г (ООО “НПК БиоТех”, вет. свидетельство № 896613690) и 25 кроликах-самцах породы шиншилла (ФГУП ОПХ “Манихино”, вет. свидетельство № 2256618221) весом 3–4 кг, содержащихся в условиях вивария в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 “Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)” (температура 18–22°C, естественный световой режим, стандартная диета в соответствии с ГОСТ Р 50258-92).

ННЕ-1-ингибирующую активность изучали *in vitro* по изменению формы тромбоцитов кролика методом измерения светопротекания [21, 22]. Забор крови осуществляли из краевой вены уха кролика в пробирки с цитратом натрия (3.8%) в соотношении 9 : 1. Кровь центрифугировали при 1000 об/мин в течение 12 мин (центрифуга Multi centrifuge CM 6M, Elmi, Латвия), забирали богатую тромбоцитами плазму. Активацию ННЕ-обменника проводили буферным раствором, содержащим пропионат натрия (600 мкл, в ммоль/л: пропионат натрия – 135, NEPES – 20, CaCl<sub>2</sub> – 1,

MgCl<sub>2</sub> – 1, глюкоза – 10; pH 6.7, 37°C). Для контроля изменения светопропускания в условиях нормального pH использовали раствор Кребса (600 мкл, pH 7.4, 37°C). Изменение формы тромбоцитов регистрировали по светопропусканию с помощью лазерного анализатора агрегации тромбоцитов АЛАТ-2 (ООО НПФ “БИОЛА”, Россия; программное обеспечение AGGR версия 2.00, Россия). Все соединения в концентрации 10 нМ в объеме 10 мкл добавляли в кювету к 200 мкл богатой тромбоцитами плазмы за 5 мин до добавления раствора пропионата натрия, инкубировали при постоянном перемешивании (800 об/мин, 37°C). В качестве препарата сравнения использовали селективный ингибитор NHE-1 зонипорид (Sigma, США). Активность определяли по способности соединений изменять форму тромбоцитов (светопропускание) в сравнении с контролем (Δ%).

Экспериментальный поиск соединений, влияющих на продолжительность рефрактерного периода миокарда изолированных предсердий, проводили *ex vivo* и оценивали по усвоению навязанного ритма изолированными предсердиями крыс [21, 22]. Изолированные предсердия помещали в питательный раствор Кребса (состав, мМ: NaCl – 118, KCl – 4.7, CaCl<sub>2</sub> – 2.52, MgSO<sub>4</sub> – 1.64, NaHCO<sub>3</sub> – 24.88, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1.18, глюкоза – 5.55) при 24°C и постоянной оксигенации. Регистрацию фармакологического ответа проводили с помощью изотонического датчика 7006 при диастолической нагрузке 0.5 г и самописца Unirecord (установка для работы на изолированных органах, Ugo Basile, Италия). Об активности соединений судили по минимальной эффективной концентрации (МЭК), препятствующей навязыванию ритма (3 Гц; длительность импульса 0.5 мс; напряжение тока, в 2 раза превышающее пороговую величину; электростимулятор ЭСЛ-2, Россия) в течение 15 с. Все соединения вводили в ванночку, где находились предсердия, и исследовали в диапазоне концентраций 0.01–1 мМ. В качестве препаратов сравнения использовали этмозин (ГУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, Россия) и хинидин (Sigma, США).

Влияние соединений на гемореологические свойства крови (вязкость крови) кролика изучали в условиях моделирования синдрома повышенной вязкости крови *in vitro*, заключающегося в инкубировании крови при 42.5°C в течение 60 мин. Забор крови проводили из краевой ушной вены кроликов методом свободного падения капли при стабилизации 3.8%-ным водным раствором цитрата натрия (pH 6.0) в соотношении 9 : 1. Производили стандартизацию образцов крови к единому гематокриту 45 у.е. Определение кажущейся вязкости крови проводили на анализаторе

крови (АКР-2, Россия) при скоростях сдвига от 300 до 10 с<sup>-1</sup>. Действие соединений на степень агрегации эритроцитов оценивали по изменению индекса агрегации, рассчитываемому как отношение показателя вязкости крови при скорости сдвига 10 с<sup>-1</sup> к вязкости крови при скорости сдвига 100 с<sup>-1</sup>. Соединения исследовали в концентрации 100 мкМ. В качестве препарата сравнения использовали пентоксифиллин (Aventis, Германия) в концентрации 100 мкМ.

Влияние тестируемых образцов на функциональную активность тромбоцитов кролика *in vitro* изучали согласно методу G. Vorn в модификации В.А. Габбасова (1989) на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов АЛАТ-2 (ООО НПФ “БИОЛА”, Россия, программное обеспечение AGGR версия 2.00, Россия) [21, 22]. Исследуемые соединения тестировали в концентрации 100 мкМ. Исследования выполняли на богатой тромбоцитами плазме. Венозную кровь забирали из ушной краевой вены кролика, стабилизировали 3.8%-ным раствором цитрата натрия в соотношении 9 : 1 и центрифугировали в течение 10 мин при 1500 об/мин (центрифуга MultiCentrifuge CM 6M, Elmi, Латвия). Для получения контрольной пробы в стеклянную кювету агрегометра вносили 300 мкл богатой тромбоцитами плазмы с магнитной мешалкой и добавляли индуктор агрегации тромбоцитов АДФ в конечной концентрации 5 мкМ. Для изучения антиагрегантной активности исследуемых соединений в кювету с 300 мкл богатой тромбоцитами плазмы первоначально добавляли 10 мкл раствора тестируемого образца. Активность исследуемых соединений определяли по способности соединений снижать функциональную активность тромбоцитов в сравнении с контролем (%). В качестве препарата сравнения использовали ацетилсалициловую кислоту (Sigma, США).

При определении антигликирующей активности реакционная смесь содержала растворы бычьего сывороточного альбумина (1 мг/мл) и глюкозы (500 мМ) в фосфатном буфере (pH 7.4). Для предупреждения бактериального роста в буферный раствор вносили азид натрия в конечной концентрации 0.02%. Соединения изучали в концентрации 1 мМ. Образцы инкубировали в течение 24 ч при 60°C. Затем определяли специфическую флуоресценцию гликированного бычьего сывороточного альбумина (БСА) на спектрофлуориметре F-7000 (Hitachi, Япония) при длине волны возбуждения 370 нм и испускания 440 нм. Антигликирующую активность рассчитывали по отношению к показателю флуоресценции отрицательного контроля (гликированный БСА) [21]. В качестве положительного контроля использовали

известный ингибитор неферментативного гликозилирования аминоксидина (Sigma, США).

Фармакологическую активность соединений в отношении серотониновых рецепторов типов 2A и 3 исследовали *in vitro* с использованием установки для работы с изолированными органами (UgoBasile, Италия). Изучение 5-HT<sub>2A</sub>-активности соединений осуществляли с использованием препарата изолированного сегмента рога матки крысы [21, 22]. Для этого после наркотизации животного (хлоралгидрат, Panreas Química, Испания; внутривенно 400 мг/кг) и эвтаназии методом декапитации препарировали сегмент органа, который помещали в ванночку установки со следующими условиями инкубации: физиологический раствор Тироде (pH 7.4), термостатирование 24°C, постоянная оксигенация 95–97% (кислородный концентратор Армед 7А-3А, Россия). Препарат органа соединяли с изотоническим датчиком (модель 7006, UgoBasile, Италия) под нагрузкой 1 г. В ванночку вносили изучаемое соединение или препарат сравнения кетансерин (Sigma, США) в конечной концентрации 1 мкМ. Через 2 мин добавляли серотонина гидрохлорид (Sigma, США) в конечной концентрации 1 мкМ. Контрольное измерение проводили только с использованием серотонина. После каждого тестирования осуществляли смену физиологического раствора не менее 3 раз. Величину ( $\Delta\%$ ) антисеротонинового действия соединений рассчитывали по изменению спастического эффекта серотонина относительно контрольного измерения.

Исследование активности соединений в отношении 3-го типа 5-HT-рецепторов проводили аналогичным образом с использованием препарата изолированных предсердий морской свинки [21, 22]. Условия инкубации органа: раствор Кребса (pH 7.4), термостатирование 37°C, постоянная оксигенация 95–97%. Тестирование соединений проводили в концентрации 1 мкМ при инкубации в течение 2 мин. В качестве препарата сравнения использовали трописетрона гидрохлорид (Sigma, США) в аналогичной концентрации. Оценивали способность соединений изменять частоту спонтанных предсердных сокращений ( $\Delta\%$ ) при стимуляции серотонина гидрохлоридом (конечная концентрация 3 мкМ, Sigma, США).

Влияние соединений на каппа-опиоидные рецепторы исследовали *in vitro* на модели активации тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния в солевой среде (буфер Tris-HCl, pH 7.4). Венозную кровь из краевой ушной вены кроликов стабилизировали 3.8%-ным раствором цитрата натрия в соотношении 9 : 1 и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 мин. Эксперименты

проводили в термостатируемой кюветной камере лазерного анализатора размеров частиц ЛАСКА-1К (ООО “Люмэкс”, Россия). На кювету фотометра, снабженную перемешивающим устройством и содержащую 7 мл среды и 0.1 мл богатой тромбоцитами плазмы под углом 90° направляли свет от лазерного источника. Регистрировали интенсивность светорассеяния в диапазоне углов 2°–14° (с шагом в 2°): начальную (после внесения тромбоцитов) и последующую (после внесения соединения). Все изучаемые соединения исследовали в концентрации 100 мкМ, время экспозиции составляло 2 мин. В качестве препарата сравнения использовали селективный каппа-агонист U-50488 (Sigma, США). Динамику интенсивности светорассеяния ( $I$ ) рассчитывали по формуле:

$$I = [(A_1 - A) / A] \times 100\%,$$

где  $A$  – начальная величина сигнала светопропускания,  $A_1$  – последующее ее значение при введении соединения. Специфичность каппа-опиоидного характера действия исследуемых соединений изучали в условиях 2-минутной преинкубации с селективным каппа-антагонистом норбинолторфимин (norBNI) в конечной концентрации 100 мкМ (Sigma, США) [23].

Для оценки ингибиторной активности соединений в отношении DPP-4 вносили 40 мкл плазмы крови здоровых добровольцев в 50 мкл 0.1 М буферного раствора Tris-HCl (pH 8.0). В полученную смесь добавляли 10 мкл раствора исследуемого соединения до конечной концентрации 100 мкМ в Tris-буферном растворе и преинкубировали при 37°C в течение 5 мин. Затем вносили в реакционную смесь 100 мкл 1 мМ раствора субстрата дипептидилпептидазы-4 Gly-Pro-*n*-нитроанилида (Sigma, США). Инкубировали при 37°C в течение 15 мин и регистрировали образование *n*-нитроанилина по величине оптической плотности при длине волны 405 нм [24], используя микропланшетный ридер Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия). В контрольную пробу вносили равный объем растворителя. В качестве препарата сравнения использовали вилдаглиптин (Sigma, США).

Антиоксидантные свойства изучали *in vitro* на модели аскорбат-зависимого перекисного окисления липидов [21, 22]. Соединения изучали в концентрации 1 мкМ. В качестве препарата сравнения использовали антиоксидант дибунол (Merck, Германия) в концентрации 1 мкМ. За кинетикой перекисного окисления липидов, индуцируемого раствором аскорбиновой кислоты, следили по накоплению малонового диальдегида в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) (Fluka, Швейцария). Пробы, содержащие 10%-ный экстракт гомогената печени крысы, полученный в

стеклянном гомогенизаторе Поттера с электрическим приводом МШ-2 (Россия), на 0.1 М Tris-HCl-буфере (рН 7.4) инкубировали в течение 10 мин в водяном термостате (EL-20, Votice, Польша) при 37°C. После инициирования реакции добавлением 0.8 мМ аскорбиновой кислоты в пробе осаждался белок, реакцию останавливали добавлением 0.2 мл 50%-ной трихлоруксусной кислоты. После центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 мин на центрифуге CM-6M 3 (Elmi, Латвия) к надосадочной жидкости добавляли 0.8%-ный раствор 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК, Fluka, Швейцария), пробы кипятили 10 мин на водяной бане. Пробы фотометрировали в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 532 нм на цифровом спектрофотометре PD-303UV (Arel, Япония). Активность соединений оценивали в процентах ингибирования по отношению к пробе без соединения по результатам трех независимых экспериментов по формуле:

$$\text{Ингибирование (\%)} = 100 - (E_o/E_k \times 100),$$

где  $E_o$  – оптическая плотность в пробе с соединением;  $E_k$  – оптическая плотность контроля, не содержащего исследуемое соединение.

Все исследованные соединения и препараты растворяли в дистиллированной воде. Препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту (Sigma, США) растворяли в 30 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) с последующим добавлением дистиллированной воды до необходимого объема.

При выборе концентраций для исследования рецепторной активности новых химических соединений ориентировались на фармакологически эффективные в условиях экспериментальной модели концентрации эталонного препарата сравнения. При проведении исследований по описанным видам активности все соединения и препараты сравнения были изучены в шести potenciaх на точку.

Статистические расчеты проводили с помощью попарного сравнения выборок с использованием  $U$ -критерия Манна–Уитни в пакете программ Statistica 6.0 (Statsoft Inc.). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированы шесть соединений галогенидов 2-аминобензимидазолия и два продукта их циклизации – производных 9-замещенных 2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*a*]бензимидазолов, исследована их биологическая активность *in vitro* в отношении мишеней, участвующих в процессах кардиопротекции. Нами предварительно был проведен анализ зависимости биологической ак-

тивности от химической структуры ранее изученных химических молекул и составлены прогнозы, результаты которых нашли подтверждение в данном исследовании. Так, при изучении NHE-1-ингибирующей активности наиболее активное соединение (**II**f) с морфолиноэтильным *N*-заместителем обнаружено среди производных аминокбензимидазолия. Его активность статистически значимо превосходила активность препарата сравнения зонипорида.  $N^9$ -замещенные имидазо[1,2-*a*]бензимидазолы были рассмотрены как перспективный класс структур с высокой способностью увеличивать рефрактерность миокарда, а также обладающих гемореологической активностью. При исследовании на изолированных предсердиях крыс их способности увеличивать продолжительность рефрактерного периода активными оказались представители 2-фторфенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазолов, имеющих в положении  $N^9$  диэтиламиноэтильный (**III**a) и диметиламиноэтильный (**III**b) заместители. По величине МЭК их эффект был подобен препарату сравнения этмозину. Эти же соединения достоверно снижали индекс агрегации эритроцитов, превосходя по своей активности препарат сравнения пентоксифиллин. Прогнозы антиагрегантной активности в большей степени связаны с производными класса  $N^9$  2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазола, у изученных производных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола не выявлена выраженная активность. Для галогенидов 2-аминобензимидазолия наличие антиоксидантной, каппа-опиоидной агонистической, 5-HT<sub>2A</sub>- и 5-HT<sub>3</sub>-антагонистической активностей не выявлено ни в прогнозе, ни в эксперименте.

Таким образом, были обнаружены активные соединения, представляющие интерес для определения их безопасности и перспектив дальнейших исследований. Соединение (**III**b) оказалось активным в отношении трех мишеней: оно увеличивает рефрактерный период, снижает индекс агрегации тромбоцитов, подавляет образование конечных продуктов гликирования, подобно препарату сравнения аминогуанидину. Одновременное применение методов медицинской химии и фармакологии может перевести направленный поиск новых активных соединений на качественно новый уровень системного поиска.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП Южного федерального университета “Молекулярная спектроскопия”.

### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Химический раздел выполнен при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания Южного федерального университета на 2021 г. № БАЗ 0110.20-3-11ИХ, проект FENW-2020-0031(0852-2020-0031).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты на лабораторных животных проводили с соблюдением Международных рекомендаций по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (Европейская конвенция по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986); Приказ Минздрава России № 199н от 01 апреля 2016 г., Principles of Good Laboratory Practice (OECD, ENV/MC/CUEM (98)17, 1997); ГОСТ 33044-2014 “Принципы надлежащей лабораторной практики” (идентичен GLPOECD); Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies (21 CFR Part 58, 1978, USA, FDA); Good Laboratory Practice Standards (Ordinance № 21, 1997, Japan, MHW); статья 11 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ “Об обращении лекарственных средств”; “Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств” под ред. Миронова А.Н. (Москва, 2012)).

Исследования одобрены этическим комитетом Волгоградского государственного медицинского университета Минздрава России.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Horton D.A., Bourne G.T., Smythe M.L. // Chem. Rev. 2003. V. 3. P. 893–930. <https://doi.org/10.1021/cr020033s>
- Kim J., Kim H., Park S.B. // J. Am. Chem. Soc. 2014. V. 136. P. 14629–14638. <https://doi.org/10.1021/ja508343a>
- Sączewski F., Balewski Ł. // Expert Opin. Ther. Pat. 2013. V. 8. P. 965–995. <https://doi.org/10.1517/13543776.2013.788645>
- Spasov A.A., Kucheryavenko A.F., Gaidukova K.A., Kosolapov V.A., Zhukovskaya O.N. // Res. Results Pharmacol. 2020. V. 6. № 1. P. 1–9. <https://doi.org/10.3897/rpharmacology6.50373>
- Yigit M., Yigit B., Taslimi P., Ozdemir I., Karaman M., Gulçin L. // J. Mol. Struct. 2020. V. 1207. P. 127802. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.127802>
- Guruvelli P.V.S., Waggmare P., Harinath B.C., Jamullatudi R.N., Kurre P.N., Muthyala M.K.K. // Anti-Infect. Agents. 2019. V. 17. P. 20–27. <https://doi.org/10.2174/2211352516666180810101327>
- Shelton K.L., DeBord M.A., Wagers P.O., Southerland M.R., Williams T.M., Robishaw N.K., Shriver L.P., Tessier C.A., Panzner M.J., Youngs W.J. // Bioorg. Med. Chem. 2017. V. 25. P. 421–439. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.11.009>
- Спасов А.А., Жуковская О.Н., Бабков Д.А., Бригадирова А.А., Бабкова В.А., Морковник А.С., Литвинов Р.Л., Соколова Е.В. // Изв. РАН. Сер. химическая. 2020. № 4. С. 774–780.
- Анисимова В.А., Жуковская О.Н., Петров В.И., Спасов А.А., Косолапов В.А., Кучерявенко А.Ф., Гайдукова К.А., Сороцкий Д.В. // Пат. Российской Федерации RU 2623439 С1. Оpubл. 26.06.2017. Бюл. № 18.
- Спасов А.А., Анисимова В.А., Гурова Н.А., Тимофеева А.С., Федорчук В.Ю., Минкин В.И. // Пат. Российской Федерации RU 2526902 С1. Оpubл. 27.08.2014. Бюл. № 24.
- Pedersen S.F., Counillon L. // Physiol. Rev. 2019. V. 99. P. 2015–2113. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2018>
- Yeves A.M., Ennis I.L. // Hipertension y Riesgo Vascular. 2020. V. 37. P. 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.hipert.2019.09.002>
- Zhang R., Lei L., Xu Y., Hua W., Gong G. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2007. V. 17. P. 2430–2433. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.02.035>
- Yakovlev D.S., Spasov A.A., Mal'tsev D.V., Anisimova V.A. // Bull. Exp. Biol. Med. 2014. V. 157. P. 350–355.
- Zhang S., Zhou Y., Zhao L., Tian X., Jia M., Gu X., Feng N. // Eur. J. Pharmacol. 2018. V. 15. P. 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.05.043>
- Headrick J.P., See Hoe L.E., Du Toit E.F., Peart J.N. // Br. J. Pharmacol. 2015. V. 172. P. 2026–2050. <https://doi.org/10.1111/bph.13042>
- Анисимова А.А., Спасов А.А., Толтыгин И.Е., Минкин В.И., Черников М.В., Яковлев Д.С., Стуковина А.Ю., Горягин И.И., Гречко О.Ю., Кириллова Н.В., Косолапов В.А., Тибирькова Е.В., Салазникова О.А., Науменко Л.В., Гурова Н.А. // Хим.-фарм. журн. 2010. Т. 44. № 7. С. 7–13.
- Васильев П.М., Муравьева В.Ю., Гурова Н.А., Янолиева Л.Р., Ворфоломеева В.В., Анисимова В.А., Богославцева М.В. // Вестник Волг. ГМУ. 2016. № 2 (58). С. 87–90.
- Симонов А.М., Ковалев Г.В., Анисимова В.А., Спасов А.А., Ермилова Э.С., Поротиков В.И., Каверина Н.В., Пятин Б.М., Меринова С.В., Авдюнина Н.И. // Пат. Российской Федерации RU 2068261 С1. Оpubл. 27.10.1996. Бюлл. № 4.
- Пожарский А.Ф., Анисимова В.А., Цупак Е.Б. // Практические работы по химии гетероциклов. Ростов-на-Дону: Изд-во Рост. ун-та, 1988. С. 130–131.
- Жуковская О.Н., Спасов А.А., Гурова Н.А., Косолапов В.А., Кучерявенко А.Ф., Яковлев Д.С., Бабкова В.А., Бабков Д.А., Салазникова О.А., Муравьева В.Ю., Бригадирова А.А., Агацарская Я.В., Вишневецкая В.В., Морковник А.С. // Эксп. клин. фармакол. 2019.

- Т. 82. № 7. С. 3–9.  
<https://doi.org/10.30906/0869-2092-2019-82-7-3-9>
22. Жуковская О.Н., Анисимова В.А., Спасов А.А., Яковлев Д.С., Гурова Н.А., Кучерявенко А.Ф., Салазникова О.А., Кузнецова В.А., Мальцев Д.В., Бригадирова А.А., Морковина Я.В., Соловьева О.А., Гурова В.В., Резников Е.В. // Хим.-фарм. журн. 2017. Т. 51. № 3. С. 20–24.
23. Mindukshev I.V., Krivchenko A.I., Ermolaeva E.E., Goncharov N.V., Vivulanets E.V., Shabanova E.Yu., Petrishchev N.N., Jenkins R.O. // Spectroscopy. 2005. V. 19. P. 247–257.  
<https://doi.org/10.1155/2005/919317>
24. Matheussen V., Lambeir A.M., Jungrathmayr W., Gomez N., Entee K.M., Veken P.V., Scharpé S., Meester I. // Clin. Chim. Acta. 2012. V. 413. P. 456–462.  
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.10.031>

## Pharmacological Properties of 2-Aminobenzimidazole Halides and Imidazo[1,2-*a*]benzimidazole Derivatives

A. A. Spasov<sup>\*, \*\*</sup>, O. N. Zhukovskaya<sup>\*\*\*</sup>, N. A. Gurova<sup>\*, #</sup>, L. V. Naumenko<sup>\*</sup>, N. V. Eliseeva<sup>\*</sup>, A. F. Kucheryavenko<sup>\*</sup>, V. A. Kosolapov<sup>\*</sup>, D. S. Yakovlev<sup>\*, \*\*</sup>, V. Y. Muravyeva<sup>\*</sup>, V. A. Babkova<sup>\*</sup>, D. A. Babkov<sup>\*</sup>, J. V. Lifanova<sup>\*</sup>, and A. S. Morkovnik<sup>\*\*\*</sup>

<sup>#</sup>E-mail: [gurova.vlgmed@mail.ru](mailto:gurova.vlgmed@mail.ru)

<sup>\*</sup>Federal State Government-Financed Educational Institution of Higher Education “Volgograd State Medical University” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation pl. Pavshikh Bortsov 1, Volgograd, 400131 Russia

<sup>\*\*</sup>Volgograd Medical Scientific Center, pl. Pavshikh Bortsov 1, Volgograd, 400131 Russia

<sup>\*\*\*</sup>Research Institute of Physical and Organic Chemistry of the Southern Federal University ul. Stachki 194/2, Rostov-on-Don, 344090 Russia

The halides of 2-aminobenzimidazolium and derivatives of 9-substituted 2-(4-fluorophenyl)imidazo[1,2-*a*]benzimidazoles were studied for 10 types of biological activity *in vitro*. Among the derivatives of aminobenzimidazolium, a compound with NHE-1 inhibitory activity was identified. Imidazobenzimidazole derivatives were demonstrated to affect the duration of the refractory period of rat atria, platelet aggregation, hemorheology, and inhibit the formation of advanced glycation end-products. Among the studied compounds no DPP-4 inhibitory, antioxidant, kappa-opioid, 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>3</sub> antagonistic activities were found.

**Keywords:** imidazo[1,2-*a*]benzimidazole, 2-aminobenzimidazolium halides, NHE-1 inhibitory activity, anti-platelet action, hemorheological activity, antiglycating effect



УДК 54.057:577.325

## АЦИЛЬНОМОДИФИЦИРОВАННЫЕ ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ХИТОЗАНА – НОСИТЕЛИ ДЛЯ АДсорбЦИОННОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ ПАПАИНА

© 2022 г. А. В. Сорокин\*, \*\*, С. С. Ольшанникова\*, Н. В. Малыгина\*, Ф. А. Сакибаев\*, М. Г. Холявка\*, \*\*\*, #, М. С. Лавлинская\*, \*\*, В. Г. Артюхов\*

\*Воронежский государственный университет, Россия, 394018, Воронеж, Университетская пл., 1

\*\*Воронежский государственный университет инженерных технологий, Россия, 394036 Воронеж, просп. Революции, 19

\*\*\*Севастопольский государственный университет, Россия, 299053 Севастополь, ул. Университетская, 33

Поступила в редакцию 29.05.2021 г.

После доработки 10.06.2021 г.

Принята к публикации 18.06.2021 г.

Кислотным гидролизом в 0.1 М водном растворе соляной кислоты получены образцы хитозана с различными величинами молекулярных масс – 350 и 200 кДа, определенными вискозиметрическим методом. Из полученных образцов синтезированы целевые производные *N*-сукциноилхитозана и *N*-малеоилхитозана, структура которых подтверждена методом ИК-спектроскопии, а степени замещения рассчитаны на основе титриметрических данных. Осуществлена адсорбционная иммобилизация папаина на хитозане и его производных. Оптимальное соотношение содержания белка (мг/г носителя), общей активности (ед./мл раствора) и удельной активности (ед./мг белка) выявлено при иммобилизации папаина на матрице хитозана и *N*-сукциноилхитозана с молекулярной массой 200 кДа.

**Ключевые слова:** *N*-сукциноилхитозан, *N*-малеоилхитозан, папаин

**DOI:** 10.31857/S013234232202021X

### ВВЕДЕНИЕ

Хитозан – один из самых распространенных полисахаридов, представляющий собой линейный сополимер D-глюкозамина и *N*-ацетил-D-глюкозамина, соединенных между собой 1,4-β-гликозидными связями. За счет наличия свободной первичной аминогруппы он проявляет свойства поликатиона [1] и способен к взаимодействию с различными органическими и неорганическими соединениями. Благодаря этому хитозан находит широкое применение в различных областях деятельности человека: в создании гибридных гидрогелей и суперабсорбентов для сельского хозяйства и гигиенической промышленности [1–4], в биомедицинских целях для разработки систем доставки биологически активных веществ и новых форм лекарственных препаратов, в тканевой инженерии [5–8] и т.д.

Для расширения возможностей применения хитозана целесообразно проводить его химическую модификацию. Хорошо известно, что макромолекулы поли-β-гликозидов связаны боль-

шим количеством внутри- и межмолекулярных водородных связей, образующихся между гидроксильными и аминогруппами пиранозных колец [9]. Это сказывается на их способности растворяться в воде: хитозаны с  $M_r > 10000$  растворимы только в кислых средах с  $pH < 6.5$  [10]. Введение же функциональных групп, блокирующих центры образования водородных связей, позволяет повысить pH-диапазон растворимости этого полимера. Кроме того, введение новых групп может увеличить конъюгирующую способность или биологическую активность. Например, введение в макромолекулы остатков янтарной кислоты усиливает антибактериальные свойства хитозана [11].

Перспективно использование хитозана и его производных в качестве матриц для адсорбционной иммобилизации ферментов. Создание иммобилизованных форм энзимов позволяет расширить оптимумы каталитической активности последних, а также защитить их от негативного воздействия окружающей среды [12–15]. Однако из-за ограниченной способности хитозана к растворению в водных средах процесс иммобилизации белков может протекать недостаточно полно

# Автор для связи: (тел.: +7 (473) 220-85-86; эл. почта: holyavka@rambler.ru).

ввиду стерической недоступности функциональных групп полисахаридных макромолекул, а также несовпадения значений рН растворов, требуемых для растворения полисахарида, с рН-оптимумами ферментов. Поэтому использование водорастворимых производных хитозана, сочетающих в себе нетоксичность и биосовместимость природного полимера с увеличенной способностью к растворению в воде, позволит создать более эффективные формы иммобилизованных ферментных препаратов.

Папаин – растительный фермент, получаемый из плодов папайи *Carica papaya*. Это глобулярный белок, состоящий из 212 а.о., с молекулярной массой 23 кДа. Папаин – цистеиновая протеаза, он стабилен в широком диапазоне условий, даже при высоких температурах, обладает терапевтическими свойствами, такими как антибактериальное, антиоксидантное и противоопухолевое действие. Кроме того, папаин может защищать клетки от повреждений, вызванных  $H_2O_2$  [16].

Применение ферментов (в том числе, папаина) в свободной форме затруднено по ряду причин, к которым можно отнести трудоемкость их отделения от исходных реагентов и продуктов реакции после завершения процесса, неустойчивость (лабильность) энзимов к окружающим факторам, а также при различных внешних воздействиях, трудоемкость их очистки.

Иммобилизация ферментов на твердых носителях поможет преодолеть эти недостатки за счет повышения стабильности по сравнению со свободной формой энзима. Температура, рН и используемый растворитель – важные факторы, которые напрямую влияют на структуру фермента. Эти факторы следует оптимизировать в процессе иммобилизации. Иммобилизованный фермент имеет более жесткую молекулярную структуру, менее подвержен конформационным изменениям и иногда характеризуется более высокой доступностью активного центра для биокатализа. Кроме того, активность фермента может увеличиваться после иммобилизации за счет изменения конформации фермента [17].

Цель настоящей работы – синтез водорастворимых производных хитозана – *N*-малеилхитозана и *N*-сукциноилхитозана – с различными молекулярными массами для дальнейшего использования в качестве матриц для адсорбционной иммобилизации папаина.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

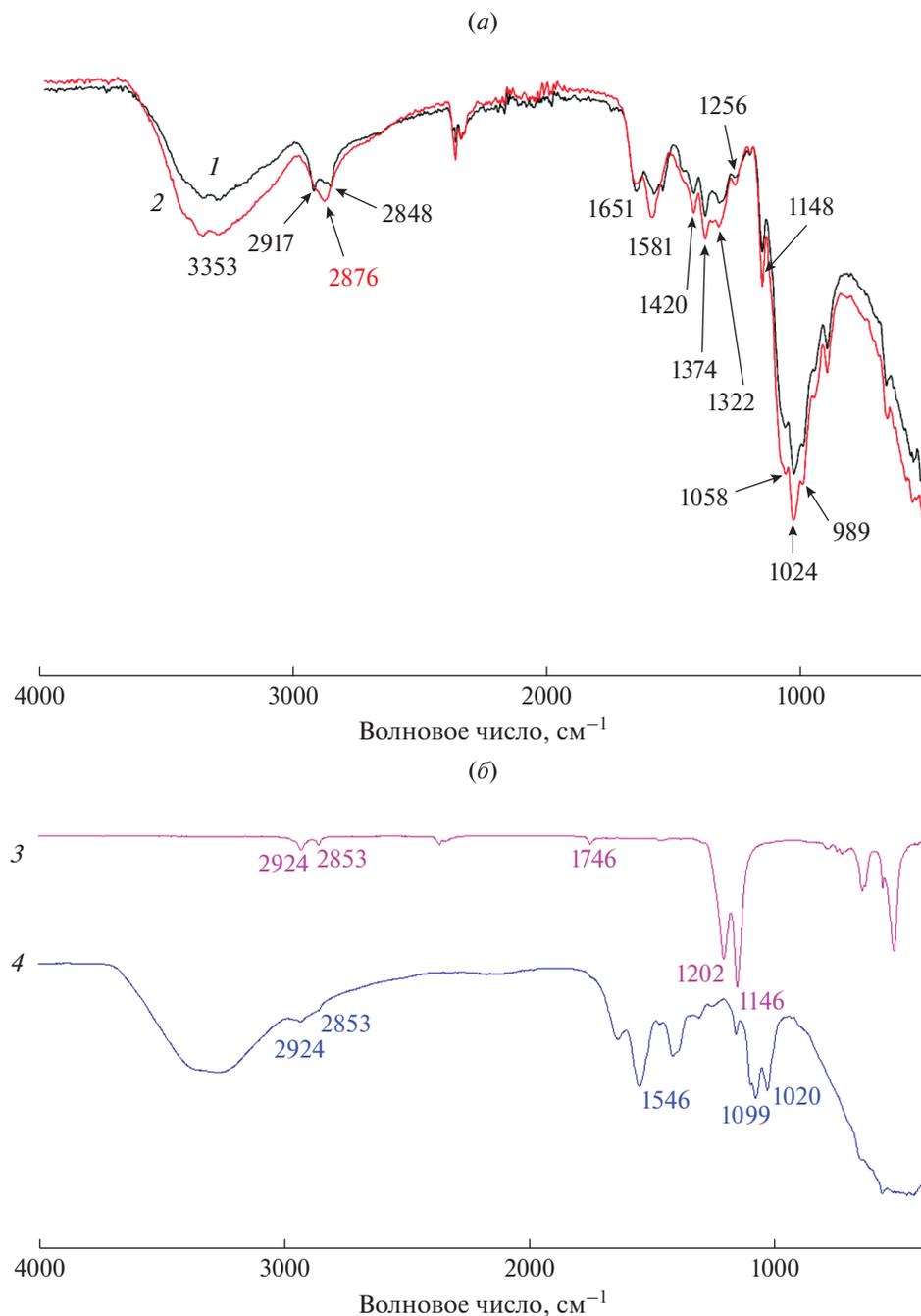
Молекулярная масса полимера – одна из ключевых характеристик, определяющих его физико-химические и биологические свойства, такие как способность к растворению, токсичность, конъюгирующая способность и др. Например, в работе Kuznetsov et al. [18] показано, что снижение моле-

кулярной массы полимеров, используемых в качестве экстрагентов аминокислот, приводит к повышению количественных характеристик экстракции ввиду увеличения стерической доступности функциональных групп, участвующих в процессе связывания целевых компонентов. В связи с этим первым этапом настоящего исследования было получение хитозанов с различными молекулярными массами. Наиболее доступный в лабораторных условиях способ влияния на величину молекулярной массы полисахаридов – кислотный гидролиз. В литературе имеются данные об использовании уксусной, азотной, серной и соляной кислот для гидролиза полисахаридных молекул [18–20]. Однако азотная кислота, как мощный окислитель, может вызывать ряд побочных процессов; серная кислота – двухосновная, поэтому ее использование может привести к сшивке макромолекул хитозана; процесс деструкции полисахаридов в слабой уксусной кислоте протекает с невысокой скоростью; в связи с чем для деструкции хитозана мы использовали соляную кислоту. Механизм возможных при деструкции полисахарида процессов представлен на рис. 1 [21, 22].

Для того чтобы подтвердить структуру образовавшегося в процессе деструкции вещества, нами был использован метод ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием. ИК-спектр коммерческого хитозана (рис. 2а, кривая 1) содержит полосы поглощения в области  $1024\text{--}1058\text{ см}^{-1}$ , относящиеся к колебаниям группы  $\text{C—O—C}$  пиранозного цикла, ряд полос при  $1256, 1374, 1420$  и в области  $1917\text{--}2848\text{ см}^{-1}$ , соответствующих деформационным колебаниям метильных и метиленовых групп циклического фрагмента полисахарида, при  $1651\text{ см}^{-1}$  – полоса амид I – валентные колебания группы  $\text{C=O}$ , при  $1581\text{ см}^{-1}$  – полоса амид II – колебания первичной аминогруппы [21]. Также в спектре присутствует широкая полоса поглощения при  $3353\text{ см}^{-1}$ , относящаяся к колебаниям ОН-групп молекул воды, ассоциированных с макромолекулами полимера. В ИК-спектре хитозана, деструктированного кислотным гидролизом под действием раствора соляной кислоты, вышеперечисленные полосы также присутствуют (рис. 2а, кривая 2). Кроме того, в спектре деструктированного полимера появляется новая низкоинтенсивная полоса поглощения при  $2876\text{ см}^{-1}$  [22], относящаяся к валентным колебаниям гидрохлоридов первичных аминов.

Молекулярные массы деструктированного хитозана, рассчитанные по уравнению Марка–Куна–Хаувинка–Сакурады, с учетом величин констант  $K$  и  $\alpha$ , взятых из литературных данных, составили 350 и 200 кДа. Известно [22], что растворимость хитозана в воде зависит от величины его молекулярной массы. Полученные кислотной деструкцией образцы не растворяются в





**Рис. 2.** ИК-спектры хитозанов и его производных: 1 – коммерческий хитозан, 2 – разрушенный хитозан, 3 – *N*-малеоилхитозан, 4 – *N*-сукциноилхитозан.

лоса поглощения при  $2924\text{ см}^{-1}$ , относящаяся к колебаниям метиленовых групп остатков янтарной кислоты [23]. Спектральные данные подтверждают образование желаемого продукта реакции, а также присоединение заместителя через аминогруппу хитозана.

Использованные для синтеза реакции относятся к полимераналогичным превращениям, поэтому молекулярные массы синтезированных

продуктов не определяли, принимая их равными массам используемых в синтезе полисахаридов.

Степени замещения синтезированных производных хитозана рассчитывали из данных кислотно-основного титрования [24]. Результаты определения приведены в табл. 1. Как видно из представленных данных, с увеличением молекулярной массы модифицированного хитозана уменьшается эффективность замещения, что обусловлено влия-

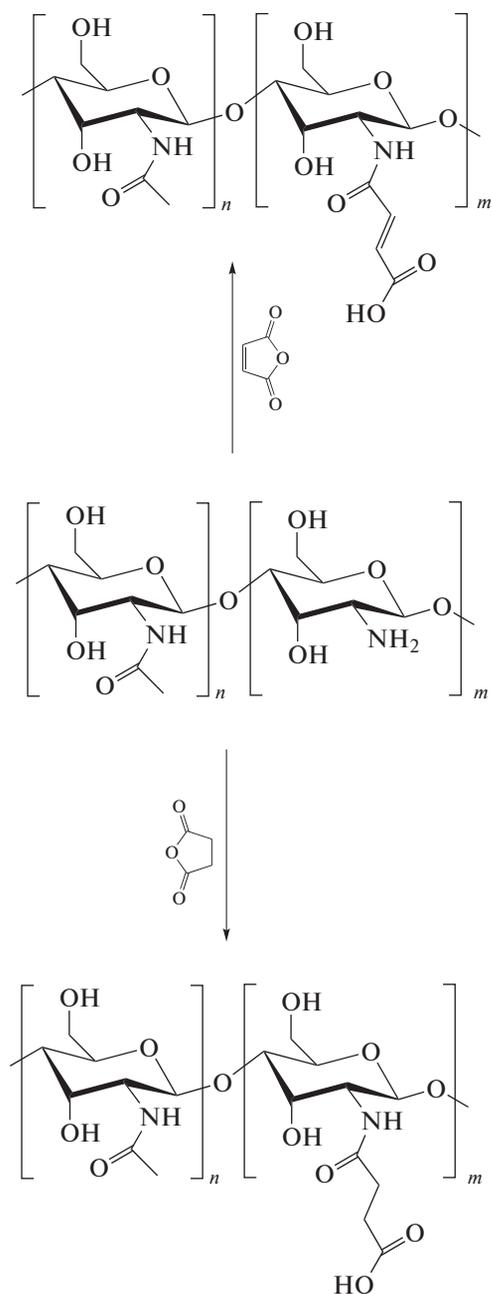


Рис. 3. Схема модификации хитозана.

Таблица 1. Степени замещения синтезированных производных хитозана

№	Полисахарид	Молекулярная масса, кДа	Степень замещения
1	<i>N</i> -сукциноилхитозан	600	0.21
		350	0.32
		200	0.45
2	<i>N</i> -малеоилхитозан	600	0.28
		350	0.39
		200	0.51

нием стерического фактора на доступность функциональных групп макромолекул полисахарида.

Для проектирования гетерогенного биокатализатора необходимо понимать механизм взаимодействия носителя с молекулами фермента. Мы изучили типы взаимодействий, энергии связывания, аминокислотный состав поверхностей папаина, которые в процессе адсорбции взаимодействуют с носителем (рис. 4–6). Из рисунков видно, что связи и взаимодействия с хитозаном и его производными образуются с участием активного центра фермента (Cys25 и His159), что, естественно, должно отразиться на активности иммобилизованных образцов. Аффинность связывания папаина с хитозаном составила  $-6.9$ , с *N*-малеоилхитозаном  $-8.3$ , а с *N*-сукциноилхитозаном  $-7.6$  ккал/моль (табл. 2), что указывает на более высокую степень сродства фермента к *N*-малеоилхитозану при иммобилизации. Анализ содержания белка в гетерогенных препаратах также показал, что наибольшее количество папаина (мг/г носителя) сорбируется на *N*-малеоилхитозане с молекулярной массой 350 кДа (рис. 7). Однако при этом фермент, вероятно, находится в каталитически невыгодной конформации, что отрицательно сказывается на его протеолитической активности. Общая активность папаина (ед./мл раствора) оказалась выше при его иммобилизации на хитозане с молекулярными массами 200 и 600 кДа (рис. 8). Наибольшую удельную активность показали образцы, адсорбированные на матрице хитозана и *N*-сукциноилхитозана с молекулярной массой 200 кДа (рис. 9). В целом же прослеживается следующая закономерность: чем больше образуется связей и взаимодействий с матрицей полимера, тем ниже удельная активность получаемого биокатализатора.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использован хитозан из креветочных панцирей со средней молекулярной массой 600 кДа и степенью деацетилирования 0.85 (ООО “Биопрогресс”, Россия). Для получения водорастворимых производных хитозана применяли янтарный и малеиновый ангидриды (оба >98%; Sigma, США). Все реактивы использовали без дополнительной очистки.

Для получения хитозанов с различными молекулярными массами проводили кислотный гидролиз исходного полисахарида. Навеску хитозана массой 1 г растворяли в 100 мл 2%-ного водного раствора уксусной кислоты, после чего переносили раствор в круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, добавляли 50 мл 0.1 М водного раствора HCl и кипятили в течение 10 или 20 мин. Далее смесь охлаждали до комнатной температуры, раствор нейтрализовали водным раствором аммиака до слабощелочного значения pH. Полимер из реакционной массы выделяли

осаждением в изопропиловый спирт, после чего промывали дистиллированной водой и этиловым спиртом и сушили в вакуумном сушильном шкафу до постоянной массы.

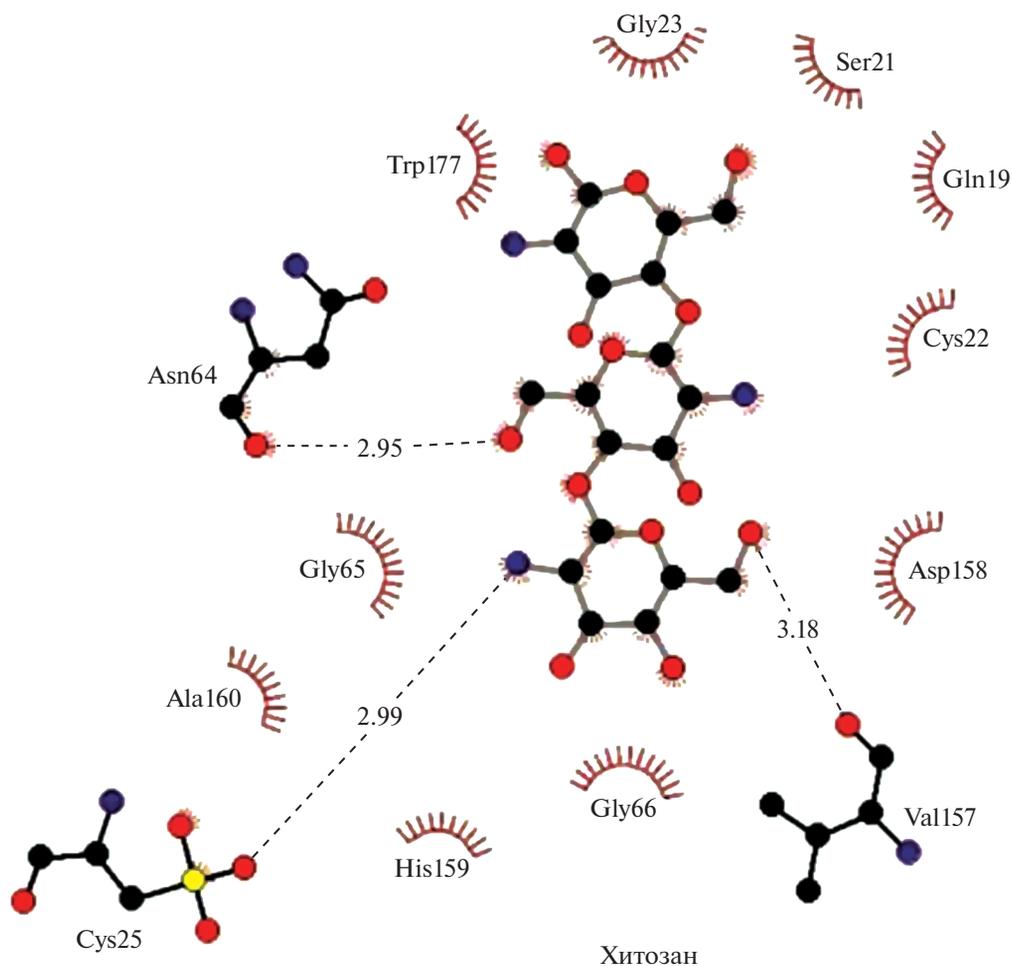
Молекулярные массы деструктурированных хитозанов определяли общепринятым вискозиметрическим методом с помощью вискозиметра Уббелодде (Cannon Instrument Company, США) в смеси водных растворов 0.3 М уксусной кислоты и 0.2 М ацетата натрия при 25°C. Из данных вискозиметрии с помощью уравнения Марка—Куна—Хаувинка—Сакурады вычисляли значения молекулярных масс:

$$[\eta] = K \times M^\alpha,$$

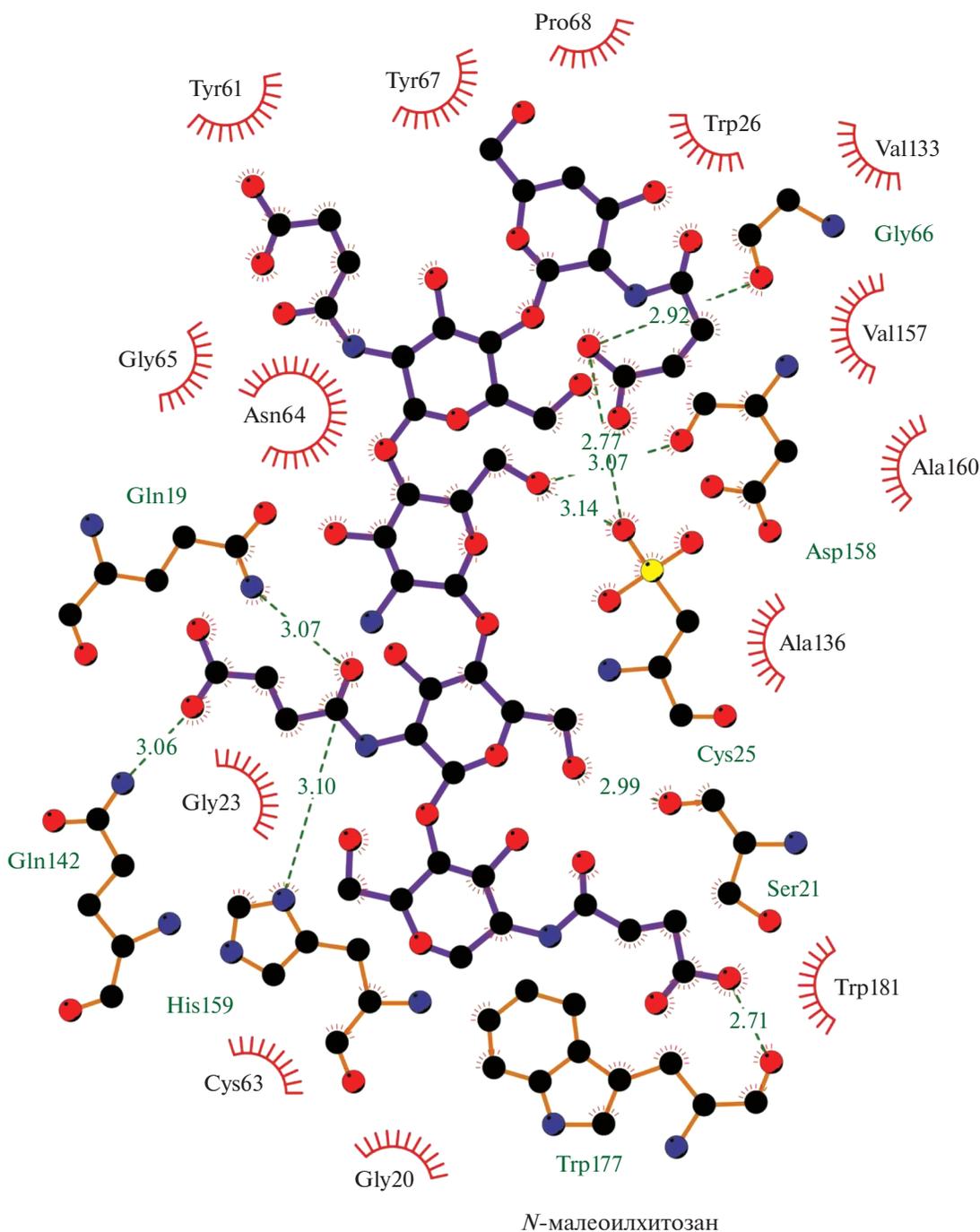
где  $[\eta]$  – характеристическая вязкость (дл/г), рассчитанная из данных вискозиметрии;  $M$  – средневязкостная молекулярная масса полимера;  $K$  и  $\alpha$  – константы, равные  $82 \times 10^{-5}$  дл/г и 0.76 соответственно [25].

*N*-сукциноилхитозан получали по следующей методике. Навеску хитозана массой 2 г растворяли в 200 мл 2%-ного водного раствора уксусной кислоты. Затем растворяли 0.4 г янтарного ангидрида в 25 мл ацетона и вносили по каплям в течение 30 мин в раствор хитозана. Полученную смесь выдерживали 2 ч на водяной бане при 50°C, далее смесь охлаждали до комнатной температуры. Полимер из реакционной массы выделяли осаждением в 4-метил-2-пентанон, после чего промывали этиловым спиртом, отфильтровывали и сушили в вакуумном сушильном шкафу до постоянной массы.

Для синтеза *N*-малеолилхитозана навеску хитозана массой 1.6 г растворяли в 100 мл 2%-ного водного раствора уксусной кислоты и перемешивали до полного растворения хитозана. Затем растворяли 3 г малеинового ангидрида в 50 мл этилового спирта и вносили в раствор хитозана. Смесь выдерживали 4 ч при комнатной температуре. Полимер из реакционной массы выделяли осаждением в 4-метил-2-пентанон, после чего про-



**Рис. 4.** Связи и взаимодействия между папаином и хитозаном (пунктирными линиями обозначены водородные связи, длина связей приведена в Å).



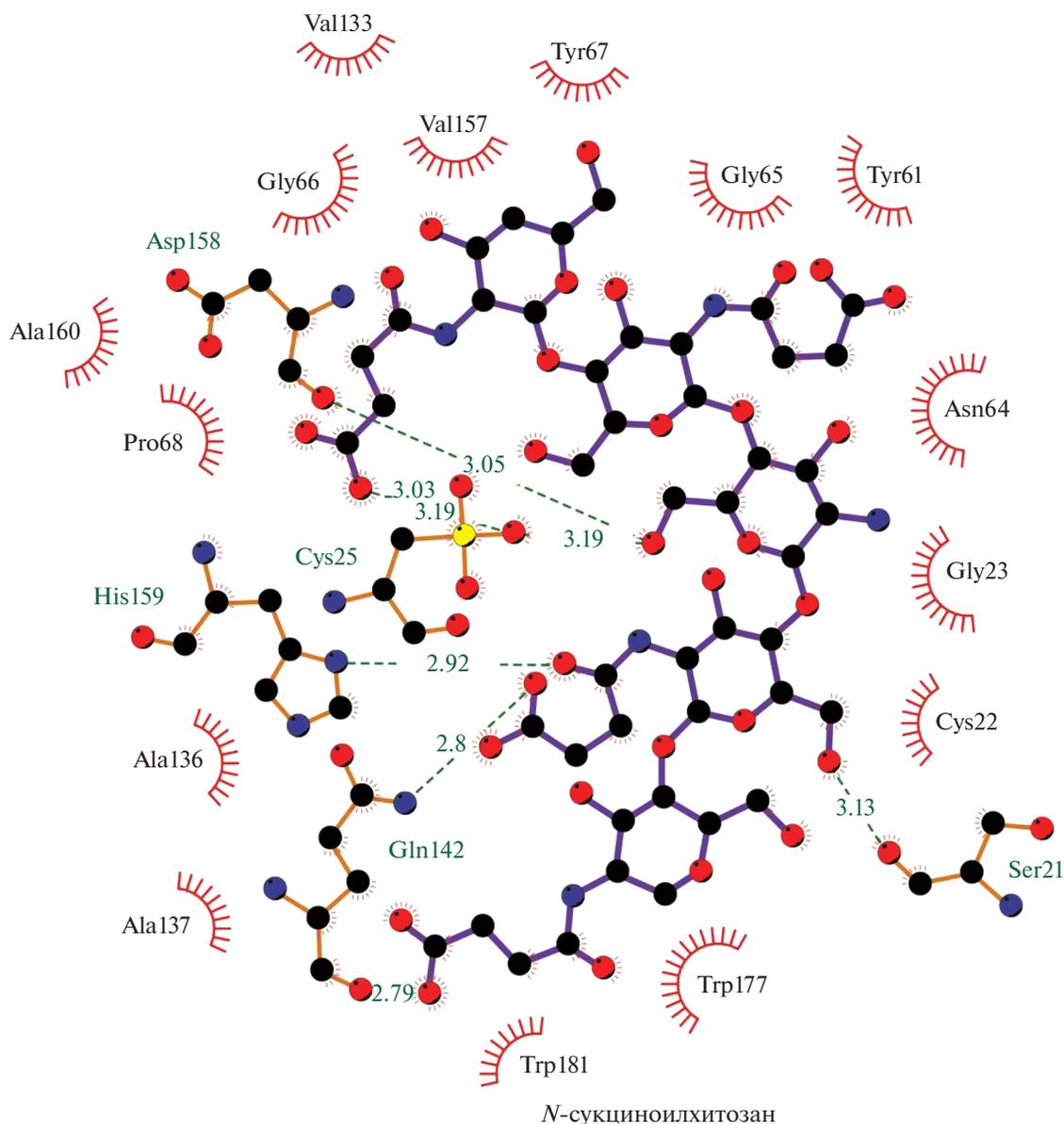
**Рис. 5.** Связи и взаимодействия между папаином и *N*-малеoilхитозаном (пунктирными линиями обозначены водородные связи, длина связей приведена в Å).

мывали этиловым спиртом и сушили в вакуумном сушильном шкафу до постоянной массы.

Модификацию хитозанов подтверждали с помощью метода ИК-спектроскопии. ИК-спектры регистрировали в диапазоне частот 4000–400 см<sup>-1</sup> на спектрометре Bruker Vertex 70 с Фурье-преобразователем (Bruker Optics, Германия) методом нарушенного полного внутреннего отражения.

Степень замещения полученных полимеров определяли титриметрически согласно методике, представленной в работе Kasaai [26].

Иммобилизацию папаина на матрице хитозана и его производных осуществляли адсорбционным методом. К 1 г хитозана добавляли 20 мл раствора фермента (в концентрации 2 мг/мл в глициновом буфере, pH 9.0), инкубировали в течение 2 ч. После окончания инкубации образовавшийся-



**Рис. 6.** Связи и взаимодействия между папаином и *N*-сукциноилхитозаном (пунктирными линиями обозначены водородные связи, длина связей приведена в Å).

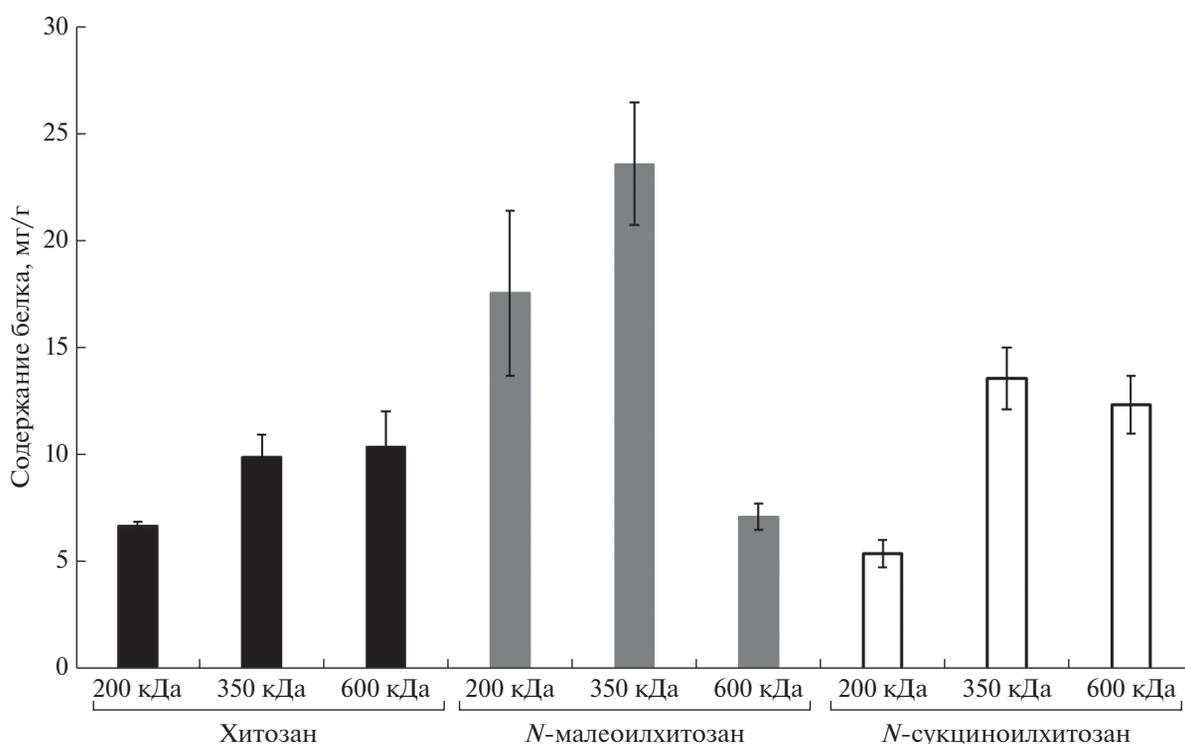
ся осадок (в виде геля) промывали 50 мМ Tris-HCl-буфером (рН 7.5) до отсутствия в промывных водах белка (контроль осуществляли на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ "Спектр", Россия) при  $\lambda = 280$  нм).

Содержание белка в иммобилизованных препаратах папаина определяли методом Лоури [27]. Определение протеолитической активности фермента проводили на субстрате азоказеине (Sigma, США) [28]. К 50 мг образца добавляли 200 мкл Tris-HCl-буфера, рН 7.5, 800 мкл азоказеина (0.5% в 50 мМ Tris-HCl-буфере, рН 7.5) и инкубировали 2 ч при 37°C. Далее добавляли 800 мкл

ТХУ (5%), инкубировали 10 мин при 4°C, затем центрифугировали в течение 3 мин при 13000 об/мин для удаления негидролизованного азоказеина. К 1200 мкл супернатанта добавляли 240 мкл 3%-ного NaOH для нейтрализации кислоты, после чего измеряли оптическую плотность опытной пробы при 410 нм в 1-см кювете на спектрофотометре СФ-2000. Контрольная проба содержала 800 мкл азоказеина, 800 мкл ТХУ, 50 мг образца и 200 мкл Tris-HCl-буфера. За единицу каталитической активности принимали количество фермента, которое в условиях эксперимента гидролизует 1 мкМ субстрата за 1 мин.

**Таблица 2.** Аминокислотные остатки папаина, формирующие связи и взаимодействия с хитозаном и его производными

Аффинность, ккал/моль	Аминокислотные остатки, формирующие	
	водородные связи, и длина связи	иные типы взаимодействий
1) Аминокислоты папаина, которые образуют связи и взаимодействия с хитозаном		
-6.9	Cys25, 2.99 Å Asn64, 2.95 Å Val157, 3.18 Å	Gln19, Ser21, Cys22, Gly23, Gly65, Gly66, Val157, Asp158, His159, Ala160, Trp177
2) Аминокислоты папаина, которые образуют связи и взаимодействия с <i>N</i> -малеoilхитозаном		
-8.3	Gln19, 3.07 Å Ser21, 2.99 Å Cys25, 2.77 Å Gly66, 2.92 Å Gln142, 3.06 Å Asp158, 3.07 Å His159, 3.1 Å Trp177, 2.71 Å	Gly20, Gly23, Trp26, Tyr61, Cys63, Asn64, Gly65, Tyr67, Pro68, Val133, Ala136, Val157, Ala160
3) Аминокислоты папаина, которые образуют связи и взаимодействия с <i>N</i> -сукциноилхитозаном		
-7.6	Ser21, 3.13 Å Cys25, 3.19 Å Gln142, 2.79 Å Asp158, 3.05 Å His159, 2.92 Å	Cys22, Gly23, Tyr61, Asn64, Gly65, Gly66, Tyr67, Pro68, Val133, Ala136, Ala137, Val157, Ala160, Trp177, Trp181

**Рис. 7.** Содержание белка (мг/г носителя) в препаратах папаина, иммобилизованного адсорбционным методом на матрице хитозана и его производных.

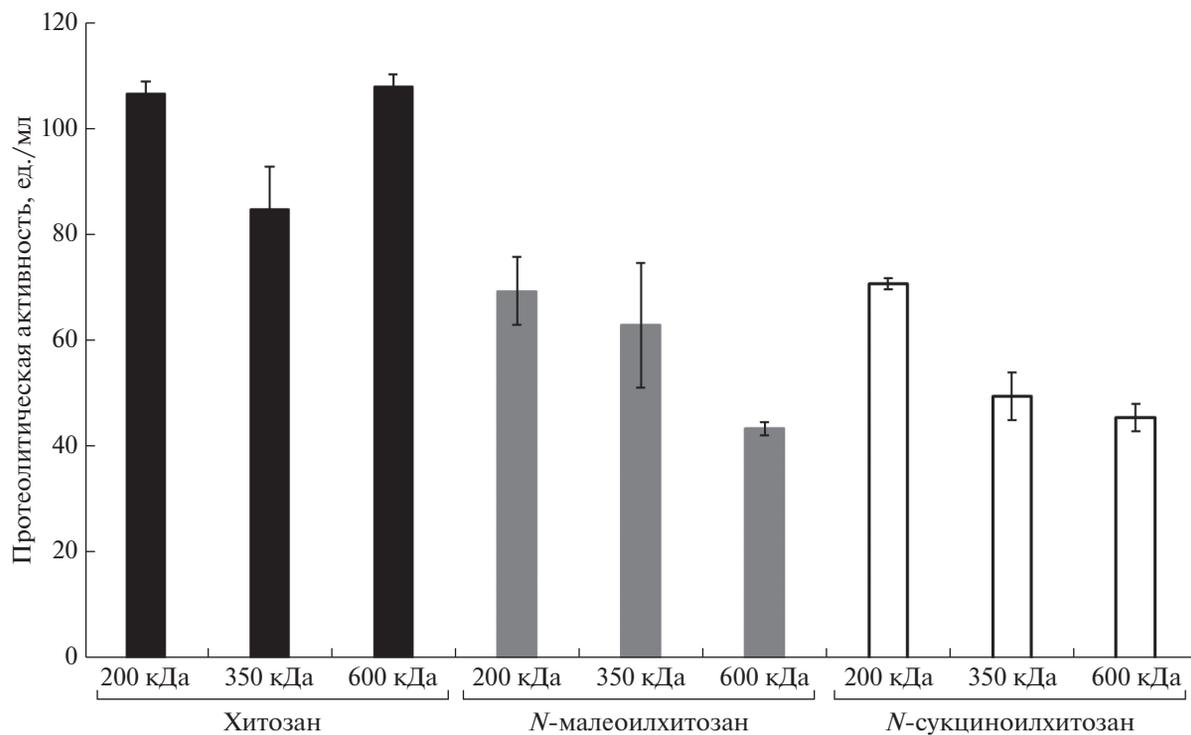


Рис. 8. Общая каталитическая активность (ед./мл раствора) в препаратах папаина, иммобилизованного адсорбционным методом на матрице хитозана и его производных.

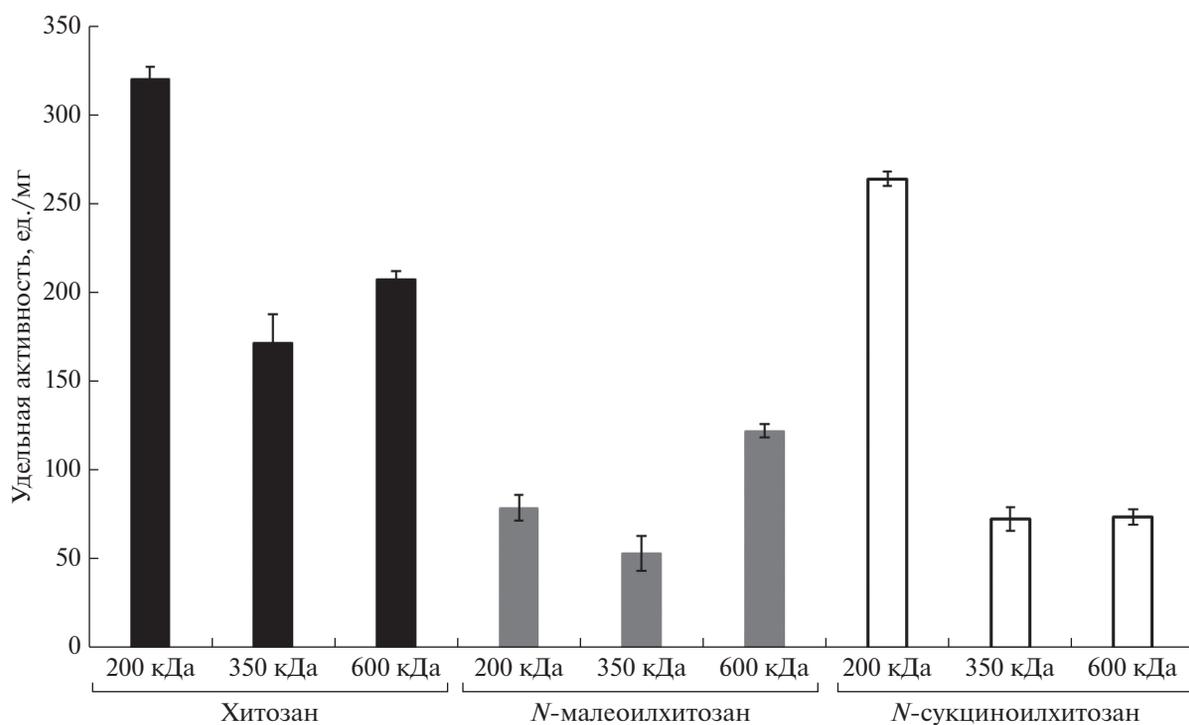


Рис. 9. Удельная каталитическая активность (ед./мг белка) в препаратах папаина, иммобилизованного адсорбционным методом на матрице хитозана и его производных.

Удельную протеолитическую активность папаина (ед./мг) рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{D \times 1000}{120 \times 200 \times C},$$

где  $A$  – протеолитическая активность, мкМ/мин на 1 мг белка;  $D$  – оптическая плотность при 410 нм; 1000 – пересчет в мкМ; 120 – время инкубации, мин; 200 – объем пробы, мкл;  $C$  – концентрация белка в пробе, мг/мл, измеренная по методу Лоури.

Статистическую значимость различий величин контрольных и опытных показателей определяли по  $t$ -критерию Стьюдента (при  $p < 0.05$ ), поскольку все показатели характеризовались нормальным распределением.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Были синтезированы производные  $N$ -сукциноилхитозана и  $N$ -малеоилхитозана с молекулярными массами 200, 350 и 600 кДа. Структура полученных производных подтверждена методом ИК-спектроскопии. Осуществлена адсорбционная иммобилизация папаина на хитозане и его производных. *In silico* изучены типы взаимодействий, энергии связывания, аминокислотный состав поверхностей папаина, которые в процессе адсорбции взаимодействуют с носителем. Выявлена следующая закономерность: чем больше образуется связей и взаимодействий с матрицей полимера, тем ниже удельная активность получаемого биокатализатора. Установлено, что оптимальное соотношение содержания белка (мг/г носителя), общей активности (ед./мл раствора) и удельной активности (ед./мг белка) наблюдается при иммобилизации папаина на матрице хитозана и  $N$ -сукциноилхитозана с молекулярной массой 200 кДа.

Полученные результаты могут быть полезны при разработке промышленных катализаторов и медицинских препаратов на основе иммобилизованного папаина.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Экспериментальные исследования проведены с использованием научно-технической базы Центра коллективного пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета.

### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-20053).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания экспериментов с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ravishankar K., Dhamodharan R. // *Reactive and Functional Polymers*. 2020. V. 149. P. 104517. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104517>
2. Qureshi M.A., Nishat N., Jadoun S., Ansari M.Z. // *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*. 2020. V. 1. P. 100014. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2020.100014>
3. Sanchez-Salvador J.L., Balea A., Concepcion Monte M., Negro C., Blanco A. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2021. V. 178. P. 325–343. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.200>
4. Rizwan M., Gilani S.R., Durani A.I., Naseem S. // *J. Adv. Res.* 2021. V. 33. P. 15–40. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.03.007>
5. Pellá M.C.G., Lima-Tenório M.K., Tenório-Neto E.T., Guilherme M.R., Muniz E.C., Rubira A.F. // *Carbohydr. Polym.* 2018. V. 196. P. 233–245. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.033>
6. Peers S., Montebault A., Ladavière C. // *J. Control. Release.* 2020. V. 326. P. 150–163. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.06.012>
7. Qu B., Luo Y. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 152. P. 437–448. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.240>
8. Pita-López M.L., Fletes-Vargas G., Espinosa-Andrews H., Rodríguez-Rodríguez R. // *Eur. Polym. J.* 2021. V. 145. P. 110176. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110176>
9. Jiang T., James R., Kumbar S.G., Laurencin C.T. // *Natural and Synthetic Biomedical Polymers* / Eds. Kumbar S.G., Laurencin C.T., Deng M. Amsterdam: Elsevier Science, 2014. P. 91–113. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-396983-5.00005-3>
10. Akpan E.I., Gbenezor O.P., Adeosun S.O., Cletus O. // *Handbook of Chitin and Chitosan* / Eds. Gopi S., Thomas S., Pius A. Amsterdam: Elsevier Science, 2020. P. 131–164. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817970-3.00005-5>
11. Niu X., Zhu L., Xi L., Guo L., Wang H. // *Food Control*. 2019. V. 108. P. 106829. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106829>
12. Holyavka M.G., Evstigneev M.P., Artyukhov V.G., Savin V.V. // *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*. 2016. V. 129. P. 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.03.006>
13. Holyavka M.G., Kayumov A.R., Baydamshina D.R., Koroleva V.A., Trizna E.Y., Trushin M.V., Artyukhov V.G. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. V. 115. P. 829–834. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.107>

14. *Holyavka M.G., Kondratyev M.S., Lukin A.N., Agapov B.L., Artyukhov V.G.* // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. V. 138. P. 681–692.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.132>
15. *Holyavka M., Faizullin D., Koroleva V., Olshannikova S., Zakhartchenko N., Zuev Yu., Kondratyev M., Zakharova E., Artyukhov V.* // *Int. J. Biol. Macromol.* 2021. V. 180. P. 161–176.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.016>
16. *Jain J.* // *Int. J. Engineering Appl. Sci. Technol.* 2020. V. 5. P. 193–197.
17. *Vasconcelos N.F., Cunha A.P., Ricardo N.M.P.S., Freire R.S., de Araújo Pinto Vieira L., Brígida A.I.S., de Fátima Borges M., de Freitas Rosa M., Vieira R.S., Andrade F.K.* // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 165. P. 3065–3077.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.200>
18. *Kuznetsov V.A., Lavlinskaya M.S., Ostankova I.V., Shatalov G.V., Shikhaliyev K.S., Ryzhkova E.A.* // *Polymer Bulletin.* 2018. V. 75. P. 1237–1251.  
<https://doi.org/10.1007/s00289-017-2091-2>
19. *Novikov V.Y.* // *Russ. J. Appl. Chem.* 2004. V. 77. P. 484–487.  
<https://doi.org/10.1023/b:rjac.0000031297.24742.b9>
20. *Kasaai M.R., Arul J., Charlet G.* // *The Scientific World Journal.* 2013. V. 2013. P. 508540.  
<https://doi.org/10.1155/2013/508540>
21. *Santoso J., Adiputra K.C., Soerdirga L.C., Tarman K.* // *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 2020. V. 414. P. 012021.  
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/414/1/012021>
22. *Dimzon I.K.D., Knepper T.P.* // *Int. J. Biol. Macromol.* 2015. V. 72. P. 939–945.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.09.050>
23. *Mucha M., Pawlak A.* // *Polimery.* 2002. V. 47. P. 509–516.  
<https://doi.org/10.14314/polimery.2002.509>
24. *Aiping Z., Tian C., Lanhua Y., Hao W., Ping L.* // *Carbohydrate Polymers.* 2006. V. 66. P. 274–279.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.03.014>
25. *Sorokin A., Lavlinskaya M.* // *Polymer Bulletin.* 2021.  
<https://doi.org/10.1007/s00289-020-03521-9>
26. *Kasaai M.R.* // *Carbohydr. Polymers.* 2007. V. 68. P. 477–488.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.11.006>
27. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Faar A.L., Randall R.J.* // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265–275.
28. *Sabirova A.R., Rudakova N.L., Balaban N.P., Ilyinskaya O.N., Demidyuk I.V., Kostrov S.V., Rudenskaya G.N., Sharipova M.R.* // *FEBS Lett.* 2010. V. 584. P. 4419–4425.  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.09.049>

## Acynomodified Water-Soluble Chitosan Derivatives as Carriers for Adsorption Immobilization of Papain

A. V. Sorokin\*, \*\*, S. S. Olshannikova\*, N. V. Malykhina\*, F. A. Sakibaev\*, M. G. Holyavka\*, \*\*\*, #, M. S. Lavlinskaya\*, \*\*, and V. G. Artyukhov\*

\*Phone: +7 (473) 220-85-86; e-mail: holyavka@rambler.ru

\*\*Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394018 Russia

\*\*Voronezh State University of Engineering Technologies, prosp. Revolyucii 19, Voronezh, 394036 Russia

\*\*\*Sevastopol State University, ul. Universitetskaya 33, Sevastopol, 299053 Russia

Acid hydrolysis in a 0.1 M aqueous solution of hydrochloric acid obtained chitosan samples with different values of molecular weights determined by the viscometric method and equal to 350 and 200 kDa. From the obtained samples, the target derivatives of *N*-succinoylchitosan and *N*-maleoylchitosan were synthesized, the structure of which was confirmed by IR spectroscopy, and the degrees of substitution were calculated on the basis of titrimetric data. It was carried out adsorptive immobilization of papain on chitosan and its derivatives. The optimal ratio of the protein content (mg/g of carrier), total activity (units/ml of solution) and specific activity (units/mg of protein) was revealed upon immobilization of papain on a matrix of chitosan and *N*-succinoylchitosan with a molecular weight of 200 kDa.

*Keywords:* *N*-succinoylchitosan, *N*-maleoylchitosan, papain



УДК 547.92:581.1

## СИНТЕЗ ТЕТРАГЕМИСУКЦИНАТОВ БРАССИНОСТЕРОИДОВ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА НАЧАЛЬНЫЙ РОСТ РАСТЕНИЙ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ<sup>1</sup>

© 2022 г. Р. П. Литвиновская\*, #, Н. Е. Манжелесова\*, О. П. Савочка\*, В. А. Хрипач\*

\*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Беларусь, 220141 Минск, ул. Акад. В.Ф. Купревича, 5/2

Поступила в редакцию 17.03.2021 г.

После доработки 05.04.2021 г.

Принята к публикации 15.04.2021 г.

Реакцией brassinosterоидов с ангидридом янтарной кислоты в присутствии диметиламинопиридина впервые получены производные 24-эпибрассинолида и 24-эпикастастерона с янтарной кислотой в виде тетрагемисукцинатов. В лабораторных опытах установлено, что полученные соединения оказывают заметное влияние на посевные качества семян и рост проростков ярового ячменя. Действие тетрагемисукцинатов в ряде тестов превосходило росторегулирующие эффекты соответствующих brassinosterоидов, янтарной кислоты и смеси этих фитогормонов.

*Ключевые слова:* brassinosterоиды, янтарная кислота, синтез тетрагемисукцинатов brassinosterоидов, ростостимулирующее действие

DOI: 10.31857/S0132342322030125

### ВВЕДЕНИЕ

Стероидные гормоны растений — brassinosterоиды — известны как регуляторы роста и адаптогены. Накоплено значительное число экспериментальных данных по синтезу и росторегулирующей активности этих соединений, противострессовому действию, а также практическому применению [1, 2]. Выявлено одно из важнейших свойств фитогормональных стероидов — взаимодействие с другими фитогормонами. При стимуляции ростовых процессов показано синергическое взаимодействие brassinosterоидов и гиббереллинов, ауксинов и фенольных соединений [3, 4]. Эти сведения побуждают интерес исследователей к синтезу сложных эфиров фитогормональных стероидов с такого рода соединениями. Так, ранее мы осуществили синтез ряда производных brassinosterоидов с биологически значимыми кислотами. Конъюгаты с индолилуксусной кислотой [5], например, оказывали стимулирующее действие на рост стеблей проростков пшеницы, при этом ростостимулирующий эффект каждого из гормонов, взятых в отдельности или в виде смеси, уступал по величине действию сложноэфирного конъюгата, в котором оба фитогормональных ком-

понента связаны ковалентными связями. Аналогичные свойства проявляли производные brassinosterоидов с 5-аминолевулиновой кислотой [6]. Синтез и изучение салицилатов brassinosterоидов позволили сделать заключение, что они улучшают посевные качества семян ярового ячменя и действуют как индукторы иммунной системы растений проса и ячменя в условиях абиотического и биотического стресса [7, 8]. При этом механическая смесь компонентов не обладала таким эффектом.

В продолжение наших исследований сложноэфирных конъюгатов brassinosterоидов мы обратились к изучению гемисукцинатов стероидных фитогормонов. Янтарная кислота занимает особое место среди биостимуляторов — она оказывает активирующее действие на многие обменные процессы растений, повышает всхожесть семян и продуктивность некоторых растений, может изменять энергетический уровень некоторых ферментов, стимулируя накопление аскорбиновой кислоты и восстановленных форм аминокислот [9]. Янтарная кислота широко используется для стимуляции всхожести и роста, улучшения приживаемости, ускорения развития растений и повышения урожайности сельскохозяйственных культур [10]. Она нормализует естественную микрофлору почвы и оказывает общеукрепляющее действие — помогает лучше усваивать питательные вещества и удобрения. Имеются данные, что в связанной форме янтарная кислота проявляет более высокий ростостимулирующий эффект [11].

<sup>1</sup> Дополнительные материалы для этой статьи доступны по doi 10.31857/S0132342322030125 для авторизованных пользователей.

Сокращения: ЭБ — 24-эпибрассинолид; ЭК — 24-эпикастастерон; ЯК — янтарная кислота.

# Автор для связи: (тел.: +375 (17) 356-56-15; эл. почта: litvin@iboch.by).

Цель настоящей работы – синтез конъюгатов brassinosterоидов ряда 24-эпибрасинолида с янтарной кислотой и оценка их влияния на начальный рост растений ярового ячменя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез гемисукцинатов осуществляли взаимодействием 24-эпибрасинолида (ЭБ) (I) и 24-эпикастастерона (ЭК) (II) с ангидридом янтарной кислоты (ЯК) в пиридине в присутствии диметиламинопиридина. Использование эквивалентных количеств ангидрида или его небольшо-

го избытка приводит к получению смеси эфиров с участием гидроксильных групп по различным положениям молекулы, при этом преобладают тризамещенные производные, что четко видно из хромато-масс-спектров (см. дополнительные материалы). При проведении реакции с большим избытком янтарного ангидрида (10 экв. на каждую гидроксильную группу исходного brassinosterоида (I) или (II)) при 90°C в течение 96 ч в качестве основных продуктов выделены соответствующие тетрагемисукцинаты (III) и (IV) (схема 1).

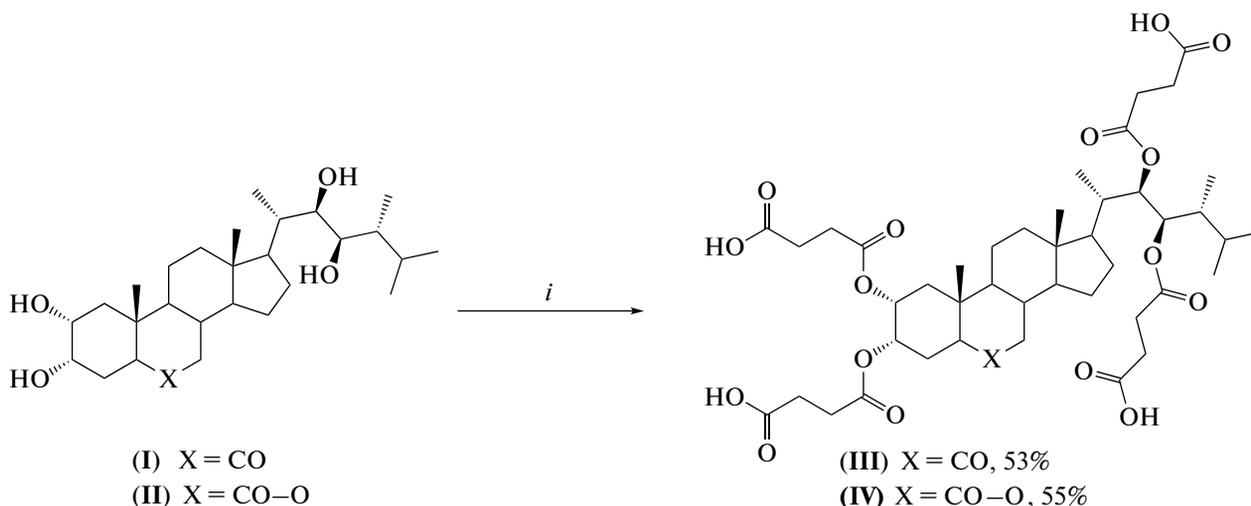
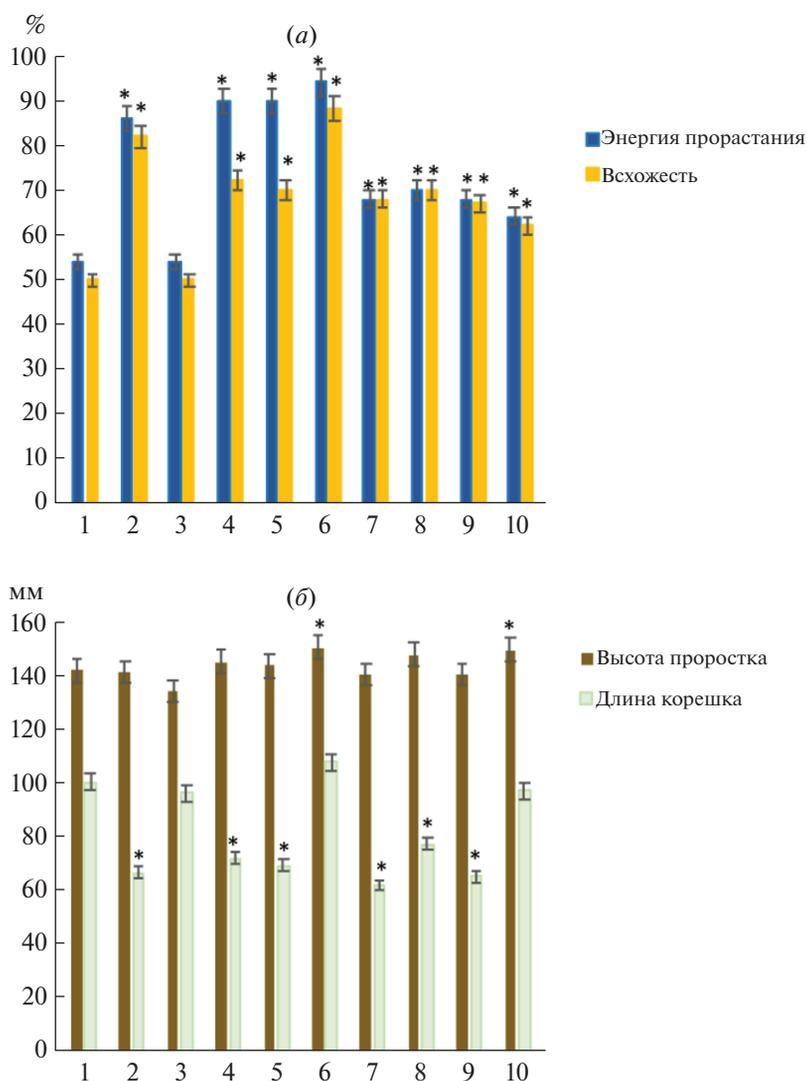


Схема 1. Синтез тетрагемисукцинатов brassinosterоидов ряда 24-эпибрасинолида. *i* – янтарный ангидрид, 4-диметиламинопиридин, 90°C, 90–96 ч.

Доказательство структуры полученных соединений – значительное смещение в слабое поле в спектре <sup>1</sup>H-ЯМР сигналов протонов при атоме C2, C3, C22 и C23 – 4.83, 4.99 и 5.10–5.15 м.д. для тетрагемисукцината 24-эпикастастерона (III) и 4.93, 5.20, 5.35 и 5.44 м.д. для тетрагемисукцината 24-эпибрасинолида (IV) по сравнению с исходными brassinosterоидами [1] и появление 16-протонного мультиплета (2.41–2.55 и 2.64–2.71 м.д. соответственно), принадлежащего метиленовым протонам остатков янтарной кислоты. В спектре <sup>13</sup>C-ЯМР дополнительно присутствуют восемь сигналов углеродных атомов групп C=O. Достоверность приведенных структур также доказывает присутствие в масс-спектрах высокого разрешения полученных тетрагемисукцинатов пика молекулярного иона и появление дополнительного сильного сигнала валентных колебаний карбонильной группы в ИК-спектрах.

Исследование активности полученных соединений проводили в лабораторных опытах, применяя характерные для биорегуляторов фитотесты по влиянию на посевные качества семян и рост

проростков [12]. Использование семян с пониженной всхожестью позволило выявить определенные особенности регуляторного действия синтезированных соединений. Отмечено, что применение фитогормональных стероидов ряда 24-эпибрасинолида и их модифицированных производных (III) и (IV) приводило к значительному повышению энергии прорастания семян и в меньшей степени – всхожести. Наибольшую активность показали ЭБ и его тетрагемисукцинат (IV). Они значительно стимулировали прорастание семян – на 30 и 40% соответственно (рис. 1а). ЭК и его тетрагемисукцинат (III) оказались менее активными (стимуляция прорастания семян – на 14 и 10% соответственно). При этом тетрагемисукцинат (IV) был более активен, чем исходный ЭБ, тогда как тетрагемисукцинат (III) – чуть менее активен, чем ЭК. Механическая смесь ЭБ и янтарной кислоты показала меньшую активность по сравнению с конъюгированной формой, а смесь ЭК с янтарной кислотой, наоборот, была более активна, чем соответствующий тетрагемисукцинат.



**Рис. 1.** Влияние фитогормональных стероидов и их тетрагемисукцинатов на проращение семян (а) и рост проростков (б) ярового ячменя. 1 – Контроль; 2 – ЭБ (II), 10<sup>-8</sup> М; 3 – ЯК, 10<sup>-8</sup> М; 4 – ЭБ + ЯК, 10<sup>-8</sup> М (1 : 1); 5 – ЭБ + ЯК, 10<sup>-8</sup> М (1 : 4), 6 – тетрагемисукцинат (IV), 10<sup>-8</sup> М; 7 – ЭК (I), 10<sup>-8</sup> М; 8 – ЭК + ЯК, 10<sup>-8</sup> М (1 : 1); 9 – ЭК + ЯК, 10<sup>-8</sup> М (1 : 4), 10 – тетрагемисукцинат (III), 10<sup>-8</sup> М. \* Различия достоверны по сравнению с контролем ( $p \leq 0.05$ ).

Все изученные соединения и композиции, кроме тетрагемисукцината (IV), в той или иной степени ингибировали рост корешков, тогда как на растяжение колеоптилей они либо не оказывали влияния, либо его стимулировали (рис. 1б).

Наибольший ингибирующий эффект (~30%) отмечался на корешках под влиянием природных brassinosteroidов. Стимулирующий эффект отмечен только под действием тетрагемисукцината (IV) (10%). Максимальное стимулирующее действие на рост колеоптилей оказывали тетрагемисукцинаты. Соединения, взятые по отдельности, на этот показатель не влияли, смеси занимали промежуточное положение, стимулируя рост проростков, но в меньшей степени, чем тетраге-

мисукцинаты. Следует отметить, что янтарная кислота в виде тетрагемисукцинатов с brassinosteroidами полностью снимала ингибирующее действие последних на рост первичных корешков, тогда как в составе смесей данный эффект проявлялся частично. При этом в вариантах с применением смесей 24-эпибрасинолида с янтарной кислотой на результат не оказывало влияния используемое количество последней (1 и 4 экв.), тогда как смесь 24-эпикастестерона с 1 экв. янтарной кислоты была более активной, чем его смесь с 4 экв. кислоты.

Проведенные лабораторные опыты свидетельствуют о том, что тетрагемисукцинаты brassinosteroidов с янтарной кислотой обладают росто-

регулирующим действием. Более детальное изучение этих соединений может показать, связано ли это со структурой brassinosterоида (возможно, конъюгат выступает в роли “депо”, постепенно высвобождая действующее вещество) или имеет место синергический эффект.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Оборудование и материалы.** ИК-спектры ( $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ ) получены на спектрометре Spectrum 100 (Perkin Elmer, Великобритания) в пленке. Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\delta$ , м.д., КССВ, Гц) и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ( $\delta$ , м.д.) получены в дейтерированных растворителях с использованием остаточного пика растворителя в качестве внутреннего стандарта ( $\delta_{\text{H}}$  3.31 м.д. и  $\delta_{\text{C}}$  49.2 м.д. для  $\text{CD}_3\text{OD}$ ;  $\delta_{\text{H}}$  7.58 м.д. и  $\delta_{\text{C}}$  135.9 м.д. для  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) на спектрометре Avance 500 (Bruker, Германия; 500 МГц для  $^1\text{H}$  и 125 МГц для  $^{13}\text{C}$ ). Масс-спектры получены на масс-спектрометре 6410 Triple Quad LC/MS 1200 HPLC (Agilent Technologies, США) при регистрации положительных и отрицательных ионов в режиме электроспрей-ионизации (ESI, 70 эВ). Масс-спектры высокого разрешения получены на приборе 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS (Agilent Technologies, США) электроспрей-ионизацией в режиме положительных ионов. Протекание реакций контролировали методом ТСХ на пластинках Kieselgel 60  $\text{F}_{254}$  с визуализацией путем обработки анисовым проявителем с последующим нагреванием. Хроматографическое разделение реакционных смесей осуществляли на силикагеле 40/60 (Kieselgel 60, Merck, Германия). В работе использовали реактивы фирмы Sigma-Aldrich (США) и brassinosterоиды ЭК (I) и ЭБ (II), синтезированные в лаборатории химии стероидов Института биоорганической химии НАН Беларуси.

**(22R,23R)-5 $\alpha$ -Эргостан-6-она 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22,23-тетрагемисукцинат (III).** К раствору 57 мг (0.123 ммоль) ЭК (I) в 3 мл абсолютного пиридина добавляли 492 мг (4.92 ммоль) янтарного ангидрида и 2 мг (0.016 ммоль) диметиламинопиридина. Полученную смесь перемешивали при 90°C в течение 96 ч. Затем упаривали пиридин, остаток растворяли в хлороформе и хорошо промывали водой от избытка янтарной кислоты, сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , растворитель удаляли в вакууме. Остаток хроматографировали на силикагеле (элюент  $\text{CHCl}_3$  :  $\text{MeOH}$ , 3 : 1). Получили 56 мг (53%) тетрагемисукцината (III) в виде маслообразного вещества.

**(22R,23R)-В-Гомо-7-окса-5 $\alpha$ -эргостан-6-она 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22,23-тетрагемисукцинат (IV).** По методике, описанной для соединения (III), из 48 мг (0.10 ммоль) ЭБ (II), 400 мг (4.00 ммоль) янтарного ангидрида и 2 мг (0.016 ммоль) 4-диметиламинопиридина получили 48 мг (55%) тетрагемисукцината (IV) в виде маслообразного вещества.

Данные спектров соединений (III) и (IV) приведены в дополнительных материалах.

**Действие brassinosterоидов и их конъюгатов с янтарной кислотой на ранний рост растений ярового ячменя.** Тестирование brassinosterоидов ряда 24-эпибрасинолида и их тетрагемисукцинатов с янтарной кислотой изучали в лабораторных условиях на семенах ярового ячменя сорта Магутны. Семена проращивали на растворах веществ в чашках Петри в термостате при 20°C, затем выставляли на свет в люминистатную установку Philips 59451 (Германия) с освещенностью 6 тыс. люкс и световым режимом 16/8 ч. Через 3 сут согласно ГОСТ 12038-84 [13] проводили учет энергии прорастания, через 7 сут – учет всхожести, через 10 сут измеряли высоту coleoptилей и длину корешков контрольных и опытных вариантов. В контрольном варианте семена проращивали на дистиллированной воде. Оптимальная концентрация исследуемых веществ была взята как наиболее активная, исходя из результатов предыдущих исследований [5–8].

Эксперименты повторяли независимо трижды при 4-кратной повторности, число растений в повторности – не менее 20. На рис. 1 представлены средние арифметические и их среднеквадратические ошибки ( $M \pm m$ ). Достоверность различий рассчитывали по  $t$ -критерию Стьюдента. Достоверными считали отличия при  $p \leq 0.05$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые получены производные 24-эпибрасинолида и 24-эпикастастерона с янтарной кислотой. Синтез тетрагемисукцинатов осуществляли взаимодействием соответствующих brassinosterоидов с ангидридом янтарной кислоты в присутствии диметиламинопиридина. В тестах на проростках ярового ячменя установлено, что полученные соединения оказывают заметное влияние на посевные качества семян и рост проростков. Действие тетрагемисукцинатов в ряде тестов превосходило росторегулирующие эффекты соответствующих brassinosterоидов, янтарной кислоты и смеси этих фитогормонов.

Полученные результаты могут стать основой для создания препаратов росторегулирующего и адаптогенного действия.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Khripach V.A., Zhabinskii V.N., de Groot A.E.* // *Brassinosteroids: A New Class of Plant Hormones*. San Diego: Academic Press, 1999. 456 p. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.0423d.x>
2. *Nolan T.M., Vukašinić N., Liu D., Russinova E., Yin Y.* // *Plant Cell*. 2020. V. 32. P. 295–318. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00335>
3. *Vajcus A., Hayat S.* // *Plant Physiol. Biochem*. 2009. V. 47. P. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.10.002>
4. *Манжелецова Н.Е., Вольнец А.П.* // Физиология патогенеза и болезнеустойчивости растений / Под ред. Решетникова В.Н. Минск: Беларуская навука, 2016. С. 169–188.
5. *Литвиновская Р.П., Минин П.С., Райман М.Э., Жилицкая Г.А., Куртикова А.Л., Кожарнович К.Г., Дервянчук М.В., Кравец В.С., Хрипач В.А.* // *Химия природ. соед.* 2013. Т. 49. С. 408–414. [*Litvinovskaya R.P., Minin P.S., Raiman M.E., Zhilitskaya G.A., Kurtikova A.L., Kozharnovich K.G., Derevyanchuk M. V., Kravets V.S., Khripach V.A.* // *Chem. Nat. Comp.* 2013. V. 49. P. 478–485.] <https://doi.org/10.1007/s10600-013-0643-8>
6. *Хрипач В.А., Литвиновская Р.П., Райман М.Э., Минин П.С., Кисель М.А., Тростянка И.В., Долгопалец В.И.* // Патент BY 18530 C1, опублик. 30.08.2014.
7. *Литвиновская Р.П., Вайнер А.А., Жилицкая Г.А., Колупаев Ю.Е., Савочка О.П., Хрипач В.А.* // *Химия природ. соед.* 2016. Т. 52. С. 394–398. [*Litvinovskaya R.P., Vayner A.A., Zhylitskaya H.A., Kolutraev Yu.E., Savachka A.P., Khripach V.A.* // *Chem. Nat. Comp.* 2016. V. 52. P. 452–457.] <https://doi.org/10.1007/s10600-016-1671-y>
8. *Манжелецова Н.Е., Литвиновская Р.П., Полянская С.Н., Корытько Л.А., Савочка О.П.* // Доклады НАН Беларуси. 2019. Т. 63. С. 304–311. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-3-304-311>
9. *Грабовская Н.И., Бабенко О.К., Сафронова Н.М., Хусаинова Р.К.* // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Сер. Естественные и технические науки. 2020. № 1. С. 28–32.
10. *Верещагин А.Л., Акимов С.С., Нуйкина Н.В., Щурова И.А., Прищенко Ю.Е., Антонова О.И., Кузьменко И.А., Кузьменко С.И., Бреговдзе Н.Г.* // Патент RU 2267924 C1, опублик. 20.01.2006.
11. *Латашко В.М., Бадовская Л.А., Пономаренко Р.И., Сокирко В.П.* // Материалы 6-й Международной конференции “Регуляторы роста и развития растений в биотехнологиях”. Москва, 2001. С. 255.
12. *Knight B.E.A., Taylor H.F., Wain R.L.* // *Ann. Appl. Biol.* 1969. V. 63. P. 211–223.
13. ГОСТ 12038-84 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. Москва: ИПК Издательство стандартов, 2004.

## Synthesis of Brassinosteroid Tetrahemisuccinates and Their Effect on the Initial Growth of Spring Barley Plants

R. P. Litvinovskaya\*, #, N. E. Manzhalesava\*, A. P. Savachka\*, and V. A. Khripach\*

#Phone: +375 (17) 356-56-15; e-mail: litvin@iboch.by

\*Institute of Bioorganic Chemistry of National Academy of Science of Belarus, ul. Academica V.F. Kuprevicha 5/2, Minsk, 220141 Belarus

For the first time, conjugates of 24-epibrassinolide and 24-epicastasterone with succinic acid were obtained in the form of tetrahemisuccinates by the reaction of brassinosteroids with succinic acid anhydride in the presence of dimethylaminopyridine. In laboratory test experiments it was found that the compounds obtained have a noticeable effect on the sowing quality of seeds and the growth of seedlings of spring barley plants. The effect of the conjugates in a number of tests exceeded the growth-regulating effects of the corresponding brassinosteroids, succinic acid, and a mixture of these phytohormones.

*Keywords: brassinosteroids, succinic acid, synthesis of tetrahemisuccinates of brassinosteroids, growth-stimulating effect*



УДК 577.171.7

## СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИДЕПРЕССИВНЫХ СВОЙСТВ НОВЫХ АНАЛОГОВ АРГИНИН-ВАЗОПРЕССИНА

© 2022 г. К. В. Бородина\*, #, О. Н. Саванец\*, Е. С. Пустюльга\*, В. П. Мартинович\*,  
Е. В. Кравченко\*, Л. М. Ольгомец\*, В. П. Голубович\*

\*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Беларусь, 220141 Минск, ул. акад. В.Ф. Купревича, 5/2

Поступила в редакцию 14.07.2021 г.

После доработки 03.11.2021 г.

Принята к публикации 10.11.2021 г.

С целью поиска новых аналогов аргинин-вазопрессина (АВП), обладающих антидепрессивными свойствами, было осуществлено компьютерное моделирование, которое позволило выявить ряд пептидных аналогов С-концевого фрагмента АВП: *N*-Ас-D-Ser-Pro-D-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>, *N*-Ас-Phe-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>, *N*-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>. В работе представлены методики синтеза смоделированных соединений. С использованием теста принудительного плавания для выявления соединений, потенциально обладающих антидепрессивной активностью, было показано, что при интраназальном введении крысам-самцам линии Wistar исследуемых пептидов в дозах 0.1–10.0 мкг/кг наибольшим сходством по ряду изученных показателей с референтным антидепрессантом флуоксетином обладают *N*-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (0.1, 1.0 и 10.0 мкг/кг) и *N*-Ас-D-Ser-Pro-D-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (1.0 мкг/кг).

*Ключевые слова:* пептиды, аргинин-вазопрессин, компьютерное моделирование, интраназальное введение, депрессия, крысы

DOI: 10.31857/S0132342322030058

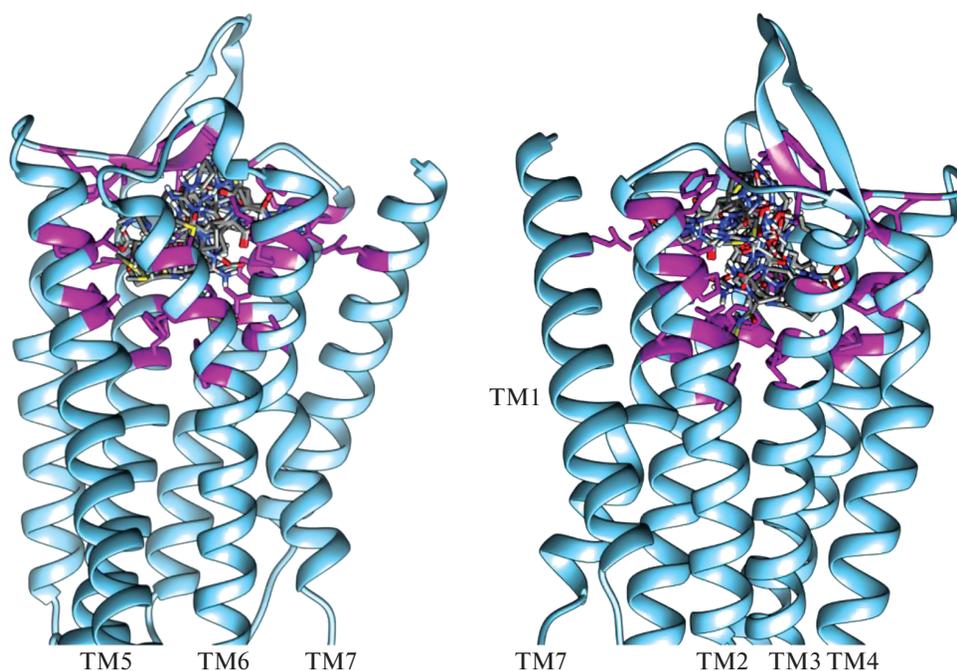
### ВВЕДЕНИЕ

Аргинин-вазопрессин (АВП) участвует в регуляции как периферических, так и центральных процессов: эмоций, поведения, памяти, социального взаимодействия и стресса [1]. Исследования показали, что в головном мозге под действием ферментов молекула АВП быстро (период полураспада <1 мин [2]) распадается на ряд более коротких биологически активных метаболитов [3]. Фрагмент АВП<sub>4–9</sub> (pGln<sup>4</sup>-Asn<sup>5</sup>-Cyt<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Gly<sup>9</sup>-NH<sub>2</sub>) обнаруживается в мозге крыс как один из основных продуктов ферментативной деградации гормона. Данный олигопептид более селективен и активен, а также ферментативно устойчив (период полураспада ~40 мин [4]) по сравнению с исходным гормоном, но при этом не проявляет периферических свойств, связанных с регуляцией кровяного давления, водного баланса и терморегуляцией [3]. Согласно ряду исследований [5, 6], АВП<sub>4–9</sub> связывается рецепторами V<sub>1a</sub> вазопрессина. Данный подтип рецепторов в большом количестве

экспрессируется в боковой перегородке, входящей в структуру лимбической системы – важнейшего центра регуляции поведения, эмоций, памяти, социального взаимодействия [7]. В то же время V<sub>1a</sub>-рецепторы расположены в супраоптическом ядре в области нейронов, синтезирующих АВП, что может указывать на то, что АВП<sub>4–9</sub> принимает участие в контроле АВП *in vivo* и способен, по всей видимости, пролонгировать физиологическое действие данного гормона [8, 9]. Известен ряд аналогов АВП<sub>4–9</sub>, более устойчивых к действию протеиназ, легче преодолевающих гематоэнцефалический барьер и проявляющих ноотропные и поведенческие эффекты [10–12]. Однако широкое применение АВП<sub>4–9</sub> и его аналоги не нашли из-за сложности и многостадийности процесса синтеза, а также трудностей доставки этих соединений в нужные области головного мозга. Решением данной проблемы могут стать более короткие фрагменты и аналоги АВП, доставку которых в нужные области головного мозга можно осуществить путем всасывания через слизистую носа (интраназально). Основные преимущества интраназального введения: 1) более простое попадание действующих веществ в нервную систему через лишенные гематоэнцефалического барьера оболочки обонятельных нервов; 2) высокая биодоступность; 3) отсутствие эффекта первого прохождения через печень и связанных с этим неблагоприятных реакций; 4) удобство и лег-

Сокращения: АВП – аргинин-вазопрессин; ЛП<sub>1иммоб</sub> – латентный период первого акта иммобилизации; ЛП<sub>1акт</sub> – латентный период первого акта активного плавания; ESI MS – масс-спектрометрия ионизацией распылением в электрическом поле; FST – тест принудительного плавания (Forced swimming test); TM – трансмембранный домен.

# Автор для связи: (тел.: +375 (44) 777-40-36; эл. почта: borodina@iboch.by).



**Рис. 1.** Изображение нижней экстрацеллюлярной и трансмембранной частей рецептора  $V_{1a}$  человека со встроенным метаболитом АВП $_{4-9}$ .

кость применения; 5) быстрота развития системного эффекта [13]. Известно, что *C*-концевой фрагмент АВП $_{6-9}$  – Cys<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Gly<sup>9</sup>-NH<sub>2</sub> – сохраняет влияние на поведение, память, стимулирует исследовательскую активность, но обладает низкой устойчивостью к действию протеиназ [4, 14, 15]. С целью увеличения энзиматической стабильности и активности пептида ранее было предложено заменить остаток Cys на *N*-Ac-D-Met и *N*-Ac-D-Ser. Исследования показали, что модифицированные тетрапептиды при интраназальном введении оказывают положительное влияние на обучение и память крыс, а также проявляют антидепрессивную активность в дозах 0.01–10.0 мкг/кг [16, 17].

Цель данной работы – моделирование и синтез новых аналогов АВП, а также исследование их антидепрессивной активности при интраназальном введении крысам линии Wistar.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для поиска новых аналогов АВП использовали метод молекулярного моделирования. На первом этапе было осуществлено моделирование взаимодействия рецептора  $V_{1a}$  с метаболитом АВП $_{4-9}$ . Исследуемый белок-рецептор имеет семь трансмембранных доменов (TM), расположенных параллельно друг другу: TM1 – Lys53-Leu76, TM2 – Phe89-Cys110, TM3 – Val126-Ala147, TM4 – Arg166-Phe189, TM5 – Trp219-Ile239, TM6 – Phe294-Trp313, TM7 – Ile332-Phe351. Домены образуют полость, которая может служить участком, удобным для связывания пептидных лигандов (рис. 1) [18]. Основываясь на результатах ра-

нее проведенных экспериментов по моделированию взаимодействия  $V_{1a}$ -рецептора с АВП и его аналогами, для моделирования были выбраны трансмембранная и внеклеточная части белка [19, 20].

В результате докинга была выделена область рецептора, с которой взаимодействует АВП $_{4-9}$  (рис. 1), расположенная в первой трети трансмембранной области  $V_{1a}$ -рецептора, локализация которой совпадает с “карманом”, выявленным для АВП и его аналогов в ранее проведенных экспериментах [20]. Показано, что исследуемый пептид образует водородные связи с  $V_{1a}$ -рецептором за счет взаимодействия атомов водородов амидных групп остатков Asn и Gly-NH<sub>2</sub> с остатками Cys203 и Val217 соответственно, при этом полученные данные хорошо согласуются с ранее выдвинутым предположением [15], что данные аминокислотные остатки могут играть важную роль в связывании пептида. С другой стороны, известно, что дальнейшая ферментативная деградация приводит к отщеплению остатка Gly-NH<sub>2</sub> в АВП $_{4-9}$ , при этом образуется АВП $_{4-8}$ , который не теряет свойств предшественника [4].

Моделирование взаимодействия фрагментов АВП $_{4-9}$  с исследуемой областью  $V_{1a}$ -рецептора показало, что короткие фрагменты АВП $_{4-5}$  (pGln-Asn-OH) и АВП $_{7-9}$  (H-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>) не связываются с исследуемой областью рецептора и имеют более высокие значения энергии взаимодействия (средние значения –4.30 и –4.60 ккал/моль соответственно), чем АВП $_{4-9}$  (среднее значение –7.50 ккал/моль) (табл. 1).

**Таблица 1.** Энергии взаимодействия основного метаболита АВП и его фрагментов с V<sub>1a</sub>-рецептором человека

	Пептид				
	АВП <sub>4-9</sub>	АВП <sub>6-9</sub>	АВП <sub>7-9</sub>	АВП <sub>7-8</sub>	АВП <sub>4-5</sub>
<i>E</i> , ккал/моль	-7.50 ± 0.20	-5.95 ± 0.22	-4.60 ± 0.14	-4.41 ± 0.23	-4.30 ± 0.22

Для дальнейшего конструирования аналога АВП был выбран фрагмент АВП<sub>6-9</sub>, который по результатам докинга связывается с исследуемой областью рецептора и имеет наименьшую энергию взаимодействия среди исследованных фрагментов.

На следующем этапе было осуществлено моделирование взаимодействия найденной области в белке-рецепторе с рядом природных аминокислот и фрагментов АВП<sub>4-9</sub>. Средние значения энергии связывания десяти наиболее устойчивых конформаций каждой из выбранных аминокислот приведены на рис. 2.

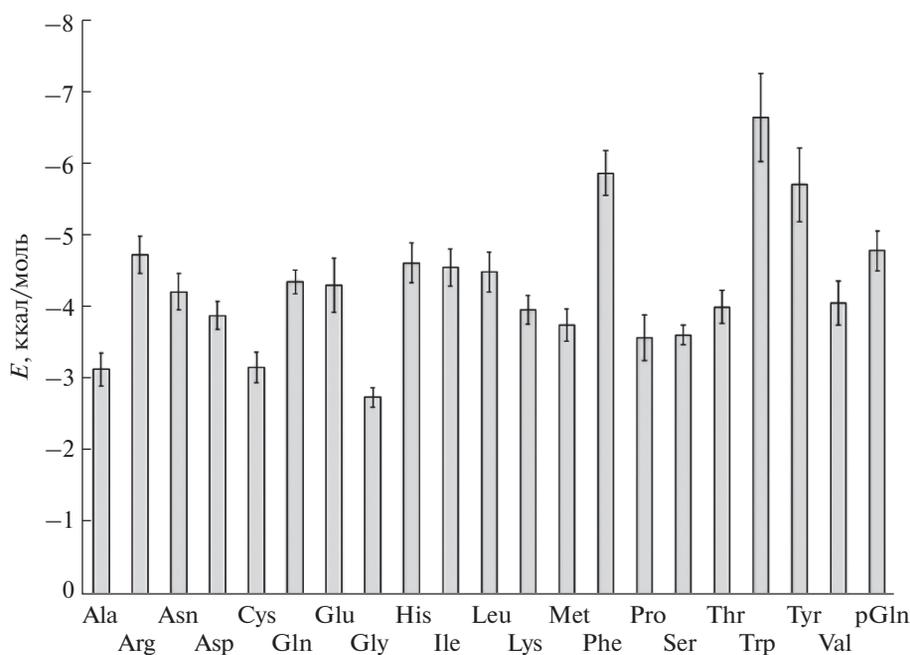
Из рис. 2 видно, что наименьшие значения энергии взаимодействия с V<sub>1a</sub> получены для Tyr, Phe, Trp, средние энергии взаимодействия с рецептором которых равны -5.7, -5.9 и -6.6 ккал/моль соответственно. Последующая замена Cys в АВП<sub>6-9</sub> на указанные аминокислотные остатки позволила получить тетрапептиды с меньшими энергиями связывания, чем у АВП<sub>6-9</sub>, основного метаболита АВП, а также у ранее исследованных тетрапептидов (рис. 3).

Более низкие энергии связывания пептидов, содержащих ароматические аминокислотные остатки, вероятно, обусловлены множеством факторов, в том числе могут объясняться π-π-взаимодействием (стекингом), а также тем, что

ароматические аминокислоты, в частности Tyr и Phe, играют важнейшую роль для ориентирования и передачи сигнала при взаимодействии нейроригипофизарных гормонов и их рецепторов [15, 18–20]. Для ряда смоделированных пептидов (*N*-Ac-D-Ser-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>, *N*-Ac-D-Ser-Pro-D-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>, *N*-Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>) обнаружено взаимодействие с остатком Tyr115, входящим в состав внеклеточной части белка-рецептора и играющим важнейшую роль в связывании агонистов и селективности [20].

Для синтеза и дальнейшего исследования антидепрессивной активности было выбрано пять тетрапептидов: *N*-Ac-Ser-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (VI), *N*-Ac-D-Ser-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (VIII), *N*-Ac-D-Ser-Pro-D-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (X), *N*-Ac-Phe-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (XII) и *N*-Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (XIII).

Основной проблемой при синтезе тетрапептидов (схема 1) оказались побочные реакции боковых функциональных групп в аминокислотных остатках Arg, Ser и Trp. Получение трипептидов Boc-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>·HCl (III) и Boc-Pro-D-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>·HCl (IV) осуществляли по схемам, описанным ранее [21], используя протонирование в качестве защиты гуанидиновой группы остатка аргинина. При синтезе была отмечена различная растворимость диастереомеров Boc-Pro-Arg-OH (I)



**Рис. 2.** Зависимость энергии взаимодействия с рецептором V<sub>1a</sub> человека от природы аминокислоты.

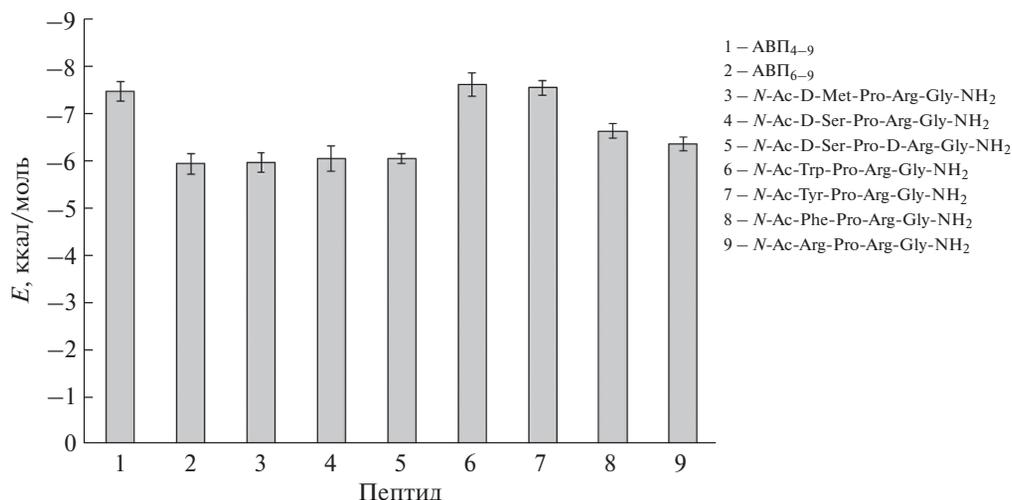
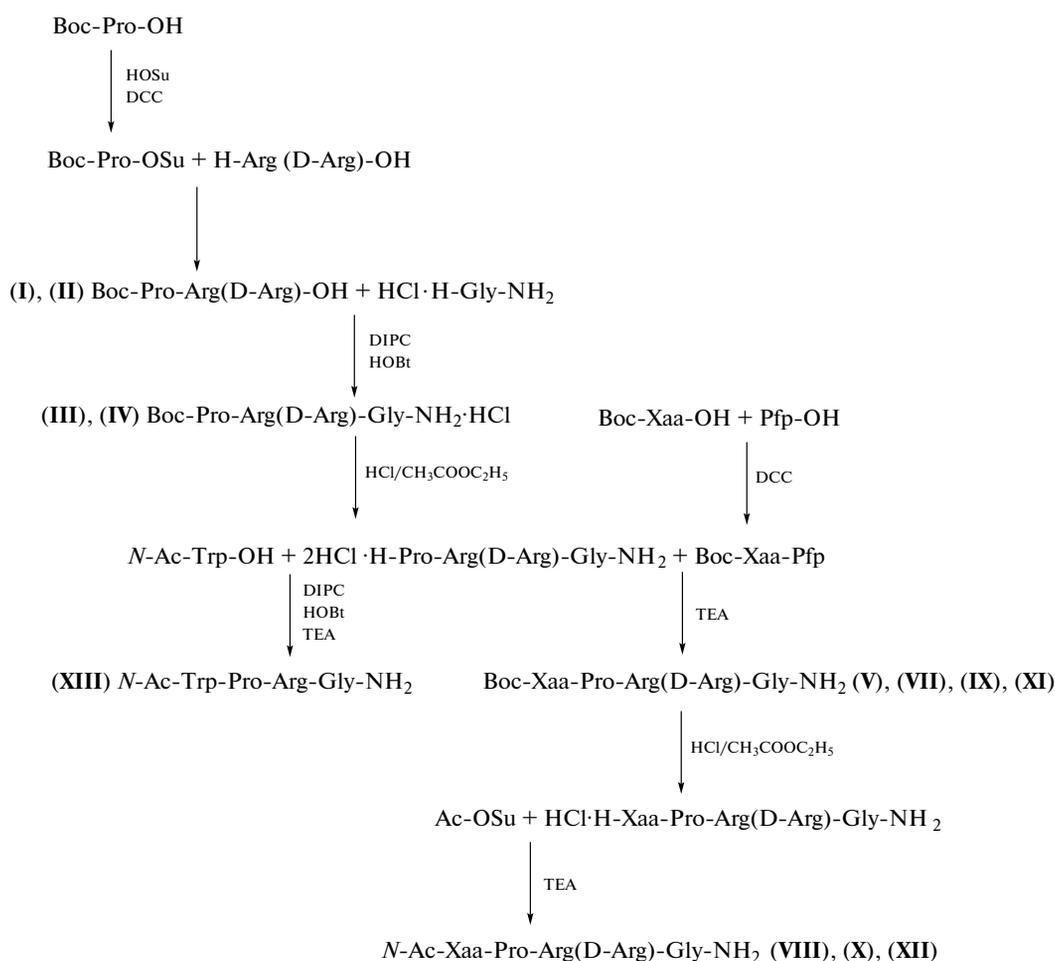


Рис. 3. Величины энергий взаимодействия сконструированных пептидов с рецептором  $V_{1a}$  человека.

и Boc-Pro-D-Arg-OH (II) в смеси диоксан/вода: соединение (II) не выпадало в осадок в процессе

синтеза, в связи с чем осложнялся процесс выделения и очистки дипептида.



**Схема 1.** Синтез тетрапептидов  $N$ -Ac-D-Ser-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (VIII),  $N$ -Ac-D-Ser-Pro-D-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (X),  $N$ -Ac-Phe-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (XII) и  $N$ -Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (XIII), где Xaa = Ser(Bzl), D-Ser, Phe. HOSu –  $N$ -гидроксисукцинимид; DCC –  $N,N'$ -дициклогексилкарбодиимид; DIPC –  $N,N'$ -диизопропилкарбодиимид; HOBT – 1-гидроксисбензотриазол; TEA – триэтиламин; Pfp-OH – пентафторфенол.

Отщепление Вос-защитных групп трипептидов проводили 5.0 н. раствором HCl в этилацетате. Гидрохлориды пептидов после снятия Вос-защитных групп, которое протекало с выходами, близкими к количественным (92–99%), использовали в синтезе после определения однородности методом ТСХ.

Бензильную защиту с OH-группы серина в тетрапептиде *N*-Ac-Ser(Bzl)-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> удаляли гидрированием над катализатором – платиновой чернью – в растворе уксусная кислота/метанол (схема 2).

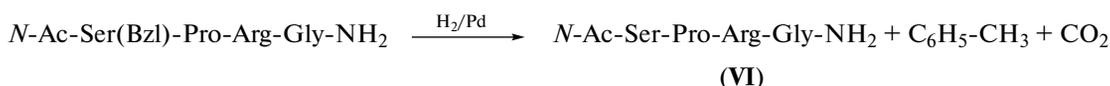


Схема 2. Получение *N*-Ac-Ser-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (VI).

Присоединение аминокислотных остатков Вос-D-Ser и Вос-D-Phe при синтезе Вос-D-Ser-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (VII), Вос-D-Ser-Pro-D-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (IX) и Вос-Phe-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (XI) осуществляли согласно схеме 1 методом активированных эфиров [22], которые брали в 30–40%-ном избытке. Метод Кишфалуди удобен тем, что позволяет снизить вероятность рацемизации присоединяемых аминокислотных остатков, а также легко удалить избыток активированного эфира на последующей стадии снятия Вос-защитных групп за счет хорошей растворимости эфиров в этилацетате в присутствии галогенводородов.

В случае присоединения триптофана важно избежать побочных реакций индольного кольца, связанных с алкилированием при снятии *N*-защитных групп в кислой среде [23]. С целью избежать бутилирования триптофана при удалении Вос-защиты для синтеза *N*-Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (XIII) использовали *N*-Ac-Trp-OH, который присоединяли к трипептиду карбодиимидным методом в присутствии 1-гидроксibenзотриазола (HOBT) в качестве противорацемической добавки.

**Влияние синтезированных пептидов на показатели поведения крыс линии Wistar в тесте принудительного плавания.** Тест принудительного плавания (Forced swimming test, FST) – одна из самых распространенных и широко используемых моделей для выявления соединений, обладающих антидепрессивными свойствами. После первоначальных интенсивных попыток избегания стрессовой ситуации (плавание – *swimming* и вскарабкивание – *climbing*) животные прекращают борьбу, наступает иммобилизация. Полагают, что иммобилизация отражает либо неспособность упорно продолжать поведение, направленное на избегание стрессовой ситуации (т.е. поведение отчаяния), либо развитие пассивного поведения, обеспечивающего экономию сил, однако препятствующего активной борьбе за выход из стрессовой ситуации [24].

В FST эффективно “острое” применение антидепрессантов, тогда как в клинической практи-

ке требуется хроническое введение наряду с отсроченным началом действия [24]. Ольфакторная бульбэктомия, парадигмы хронического стресса и выученной беспомощности могут с большей степенью надежности считаться животными моделями депрессии, чем FST, однако у этих тестов низкая пропускная способность и слабая межлабораторная воспроизводимость [24]. Тот факт, что FST позволяет получить двусторонне направленные результаты, придает модели высокую прогностическую достоверность. По мнению исследователей, FST – подходящая модель для доклинических исследований расстройств настроения [24, 25].

Применение фармакологических и патологоанатомических методов позволило установить, что антидепрессанты с катехоламинергическими механизмами действия избирательно повышают поведение *climbing*, а с серотонинергическими – *swimming* [24]. Так, эффекты антагонистов ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов преимущественно опосредуются через серотонинергическую систему; эти соединения увеличивают долю поведения *swimming*, которое ослабляется при последующем снижении концентрации серотонина в мозге [24].

Влияние *N*-Ac-Ser-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (VI), *N*-Ac-D-Ser-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (VIII), *N*-Ac-D-Ser-Pro-D-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (X), *N*-Ac-Phe-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (XII) и *N*-Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (XIII) на поведение изучали на половозрелых белых крысах-самцах линии Wistar. Тетрапептиды вводили грызунам однократно интраназально в дозах 0.1, 1.0 и 10.0 мкг/кг веса животного с использованием эквивалентного объема растворителя. Особям контрольной группы вместо пептидов вводили дистиллированную воду (1 мкл на 10 г тела). В качестве референтного лекарственного средства использовали флуоксетин (Флуксен, Украина), который вводили крысам внутривентриально в дозе 20.0 мг/кг.

Результаты экспериментов показали, что соединение *N*-Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (XIII) статистически значимо снижало длительность им-

мобилизации (на 40.0, 40.9 и 42.8% относительно контроля при введении в дозах 0.1, 1.0 и 10.0 мкг/кг соответственно,  $p < 0.05$ ). Соединение *N*-Ac-D-Ser-Pro-D-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (**X**) в дозе 1.0 мкг/кг (но не 0.1 и 10.0 мкг/кг) существенно снижало длительность иммобилизации – на 48.1%,  $p < 0.05$  (рис. 4а). Действие пептидов (**X**) и (**XIII**) было сопоставимым с таковым флуоксетина (20.0 мг/кг здесь и далее), который статистически достоверно уменьшал длительность иммобилизации – на 57.8% относительно значений в контроле,  $p < 0.05$  (рис. 4а).

По данным литературы, эффективная доза флуоксетина составляет 20 мг/кг при однократном введении [24], а в случае 21-кратного введения минимальная эффективная доза составляет 1.0 мг/кг [26]. Таким образом, соединения (**X**) и (**XIII**) превосходили стандартный антидепрессант по уровню действующих доз на 3–4 порядка соответственно. Соединения *N*-Ac-Ser-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (**VI**), *N*-Ac-D-Ser-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (**VIII**) и *N*-Ac-Phe-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (**XII**) достоверно не изменяли длительность иммобилизации в сравнении с контролем (рис. 4а).

Суммарная длительность иммобилизации на этапе “тест” была существенно больше, чем в “пре-тесте” у животных в контроле (серия 3,  $p < 0.05$ ), а также после применения соединений (**VIII**) (1.0, 10.0 мкг/кг) и (**XII**) (10.0 мкг/кг) ( $p < 0.05$ ). Отсутствие динамики указанного показателя отмечено после введения соединения (**X**), а его существенное снижение в сравнении с “пре-тестом” ( $p < 0.05$ ) – как после применения соединений (**XII**) (0.1 мкг/кг) и (**XIII**) (0.1 мкг/кг), так и на фоне флуоксетина (рис. 4б). Стабилизация или снижение суммарной длительности иммобилизации на этапе “тест” могут быть расценены как положительные изменения, противоположные выученной иммобилизации, отмеченной в контроле.

Введение всех исследованных соединений и флуоксетина не вызывало статистически значимого изменения параметра “суммарная длительность активного плавания” (*swimming*) относительно контроля, однако отмечена четко выраженная тенденция к возрастанию *swimming*: на 174.6% – после введения референтного антидепрессанта; на 92.0–162.0% – пептида (**XIII**) в дозах 0.1–10.0 мкг/кг; на 149.0 и 134.0% – соединения (**VI**) в дозах 1.0 и 10.0 мкг/кг соответственно; на 65.7–127.7% – соединения (**X**) в дозах 0.1–10.0 мкг/кг; в остальных случаях отклонения от контроля были незначительными (рис. 5а).

В контроле (серии 2–4) этап “тест” в сравнении с “пре-тестом” характеризовался статистически достоверным снижением продолжительности активного плавания (*swimming*) – на 42.8, 38.3 и 42.7% соответственно ( $p < 0.05$ ). Соединения (**VI**)

(0.1–10.0 мкг/кг), (**VIII**) (0.1 мкг/кг), (**X**) (0.1–10.0 мкг/кг), (**XII**) (0.1–10.0 мкг/кг), (**XIII**) (0.1–10.0 мкг/кг) и флуоксетин препятствовали значимому уменьшению *swimming*, отмеченному в контроле; наиболее выраженным эффектом характеризовались пептид (**XIII**) (0.1 мкг/кг) и флуоксетин, действие которых было сопоставимым (рис. 5б).

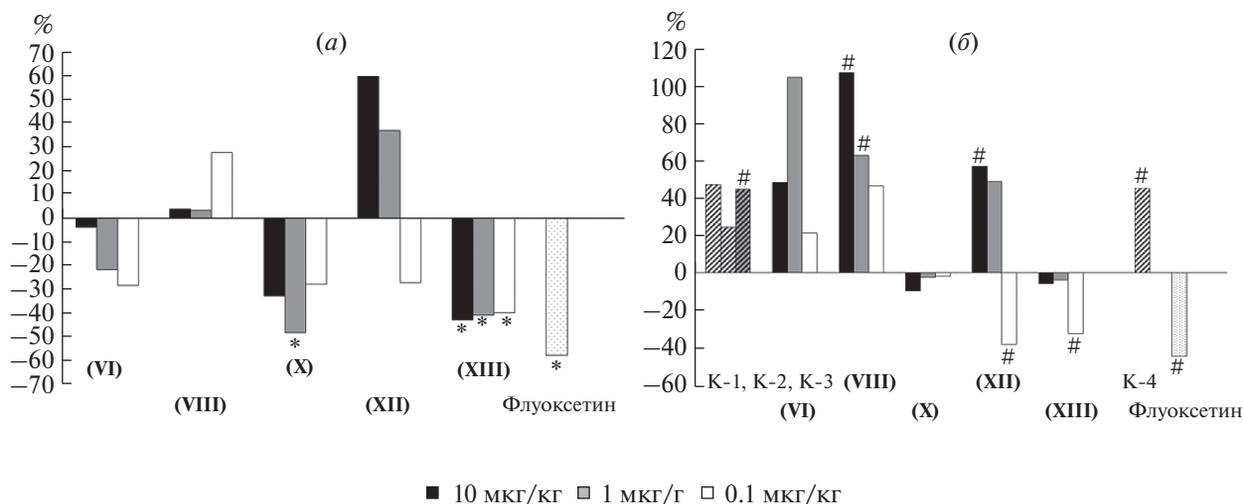
Статистически значимых изменений показателя “суммарная длительность активного плавания” (*climbing*) относительно контроля при введении исследованных соединений и флуоксетина не было обнаружено, однако отмечалась отчетливая тенденция к увеличению продолжительности *climbing* при введении соединения (**VI**) (0.1–10.0 мкг/кг) – на 79.2–125.0%; соединения (**VIII**) (10.0 мкг/кг) – на 106.0% и соединения (**XII**) (0.1 и 1.0 мкг/кг) – на 108.2 и 91.0% соответственно. Пептиды (**X**), (**XIII**) и флуоксетин слабо влияли на указанный показатель (рис. 6а). Введение соединения (**VI**) способствовало существенному снижению числа крыс с низкой (<25 с) продолжительностью активного плавания в варианте *climbing* – в 5.3 раза по сравнению с контролем ( $p = 0.04$ , точный критерий Фишера).

В контроле (серии 1–4, статистически значимо для серии 2 – на 42.8%) отмечалось уменьшение длительности активного плавания (*climbing*) на этапе “тест” в сравнении с “пре-тестом”. Применение пептидов (**VIII**) (10.0 мкг/кг) и (**XII**) (1.0 и 10.0 мкг/кг) предотвращало статистически значимое снижение названного показателя. Введение соединений (**X**) (0.1 мкг/кг), (**XIII**) (1.0 и 10.0 мкг/кг) и флуоксетина сопровождалось значимым снижением длительности *climbing* на этапе “тест” в сравнении с “пре-тестом” – на 52.9, 41.7, 34.8 и 42.4% соответственно ( $p < 0.05$ ) при отсутствии достоверных изменений в контроле (серии 3, 4) (рис. 6б).

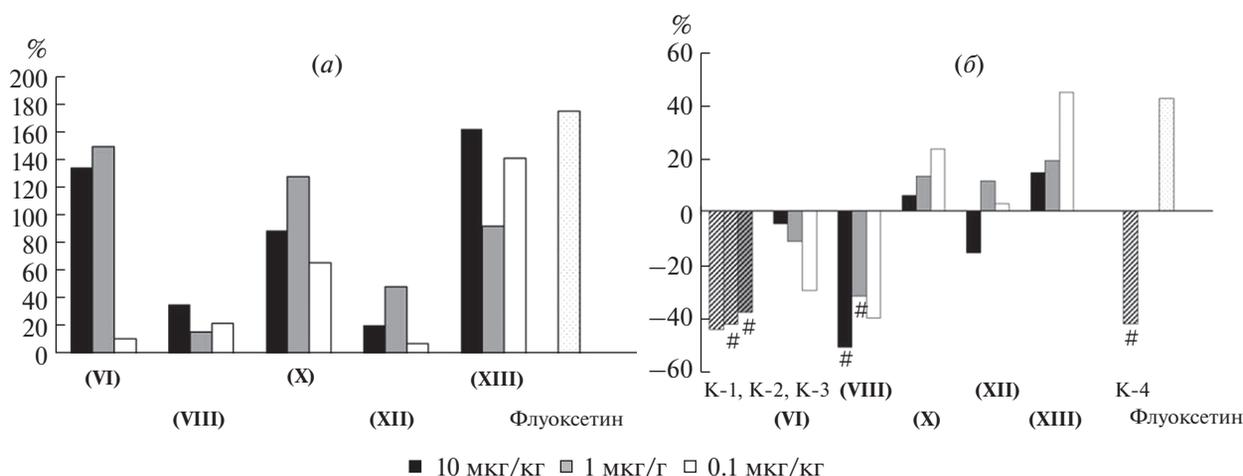
Усиление *swimming* (при слабом влиянии на *climbing*) соединениями (**X**), (**XIII**) и флуоксетином могло указывать на наличие у них серотонин-, но не катехоламинергического механизма действия [24]. Пептид (**VI**), по-видимому, характеризовался более сложным механизмом действия, поскольку усиливал как *swimming*, так и *climbing*, а соединения (**VIII**) и (**XII**), напротив, несколько усиливали активное поведение *climbing*, не меняя *swimming* (рис. 5а, 6а).

Отмечена тенденция к возрастанию латентного периода первого акта иммобилизации (ЛП<sub>Иммоб</sub>) на фоне введения всех изученных пептидов; по выраженности указанного действия соединения (**VI**), (**X**), (**XII**) и (**XIII**) (0.1 и 1.0 мкг/кг) превосходили флуоксетин (рис. 7а).

В контроле (1–4, для серий 2 и 4  $p < 0.05$ ) имело место снижение ЛП<sub>Иммоб</sub> на этапе “тест” по сравнению со значениями в “пре-тесте”, устраняемое соединением (**XII**) (0.1–10.0 мкг/кг), ослабляемое пептидом (**VIII**) (0.1 мкг/кг) и флуоксети-



**Рис. 4.** Диаграммы изменения показателя “суммарная длительность иммобилизации” (%) в тесте принудительного плавания: (а) – “тест”, после введения соединений относительно значений показателя в контроле; (б) – “тест” относительно значений показателя в “пре-тесте” (К-1 – контроль к соединению (VI); К-2 – контроль к соединениям (VIII) и (XII); К-3 – контроль к соединениям (X) и (XIII); К-4 – контроль к флуоксетину). \*  $p < 0.05$ , критерий Манна–Уитни; #  $p < 0.05$ , критерий Уилкоксона.

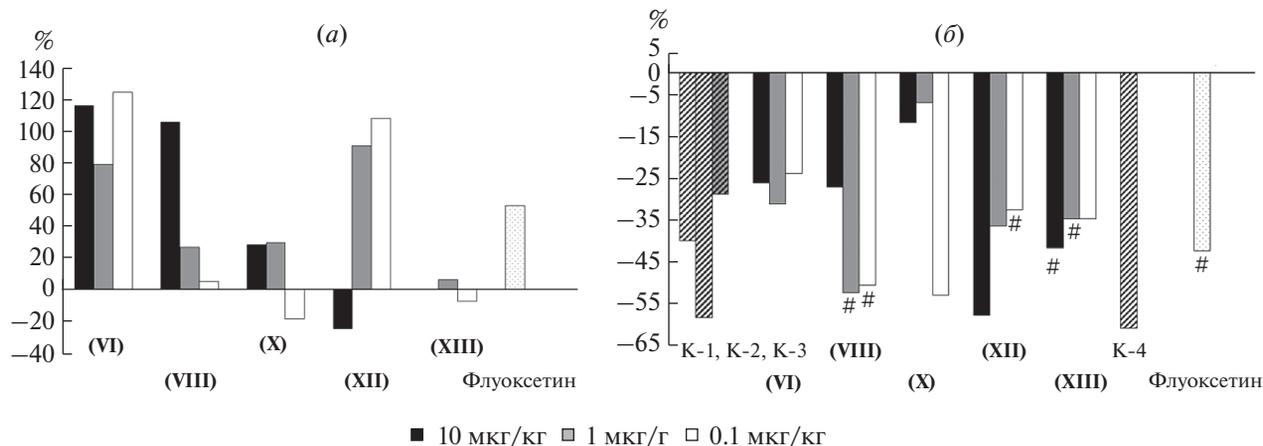


**Рис. 5.** Диаграммы изменения показателя “суммарная длительность активного плавания” (*swimming*) (%) в тесте принудительного плавания: (а) – “тест”, после введения соединений относительно значений показателя в контроле; (б) – “тест” относительно значений показателя в “пре-тесте” (К-1 – контроль к соединению (VI); К-2 – контроль к соединениям (VIII) и (XII); К-3 – контроль к соединениям (X) и (XIII); К-4 – контроль к флуоксетину). #  $p < 0.05$ , критерий Уилкоксона.

ном. Введение пептида (VI) (1.0 и 10.0 мкг/кг, но не 0.1 мкг/кг) индуцировало снижение указанного показателя ( $p < 0.05$ ), тогда как в соответствующей контрольной группе 1 снижение было незначимым (рис. 7б). Применение соединения (XIII) в дозе 1.0 мкг/кг вызывало существенное возрастание значений показателя ЛП<sub>Иммоб</sub> (в 2.84 раза выше, чем значения того же критерия на этапе “пре-тест”,  $p < 0.05$ ), что могло отражать отсрочивание выученной иммобилизации и резко отличало со-

единение (XIII) от остальных испытанных образцов и флуоксетина (рис. 7б).

Исследованные соединения и референтный антидепрессант флуоксетин существенно не влияли на суммарную длительность пассивного плавания и латентный период первого акта активного плавания в варианте *swimming* (ЛП<sub>1акт</sub>) как в сравнении с контролем, так и при сопоставлении “тест”/“пре-тест”. Исключением явился пептид (XII), применение которого сопровождалось сни-



**Рис. 6.** Диаграммы изменения показателя “суммарная длительность активного плавания” (*climbing*) (%) в FST: (а) – “тест”, после введения соединений относительно значений показателя в контроле; (б) – “тест” относительно значений показателя в “пре-тесте” (К-1 – контроль к соединению (VI); К-2 – контроль к соединениям (VIII) и (XII); К-3 – контроль к соединениям (X) и (XIII); К-4 – контроль к флуоксетину). #  $p < 0.05$ , критерий Уилкоксона.

жением длительности пассивного плавания на этапе “тест” относительно “пре-теста” при введении в дозах 1.0 и 10.0 мкг/кг (на 32.1 и 29.5%,  $p < 0.05$ ) и значимым возрастанием того же показателя в дозе 0.1 мкг/кг (на 41.9%,  $p < 0.05$ ).

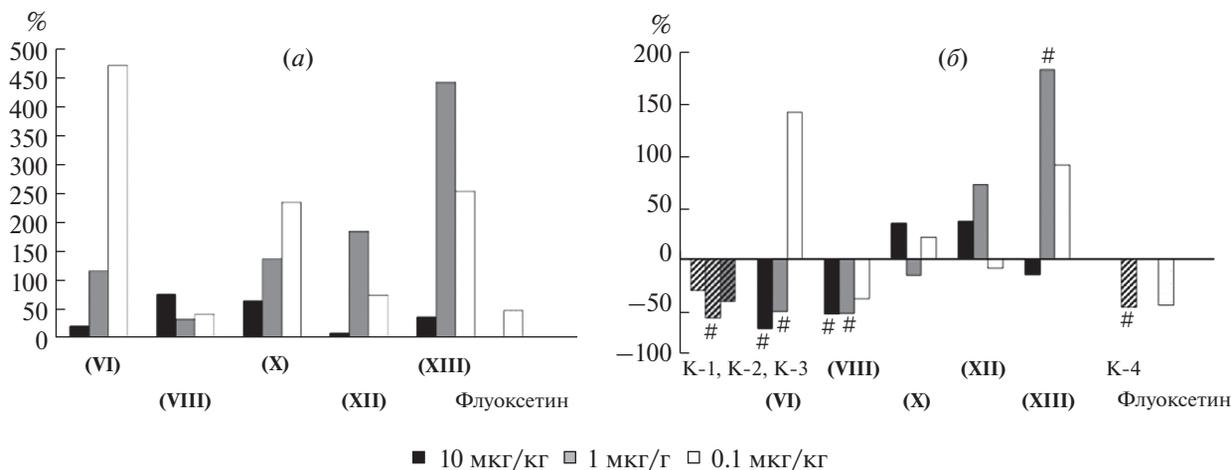
В качестве соединений с наиболее выраженным эффектом в FST были отобраны пептиды (X) (1.0 мкг/кг) и (XIII) (0.1–10.0 мкг/кг), которые, как и флуоксетин, снижали суммарную длительность иммобилизации ( $p < 0.05$ ) (рис. 4а). Соединение (XIII) (0.1 мкг/кг) и флуоксетин нивелировали отмеченное в контроле значимое возрастание суммарной длительности иммобилизации в “тесте” в сравнении с “пре-тестом” (рис. 4б). Соединения (X) (0.1–10.0 мкг/кг), (XIII) (0.1–10.0 мкг/кг) и флуоксетин проявляли тенденцию к повышению показателя *swimming* в сравнении с контролем и “пре-тестом” (рис. 5). Указанные соединения не влияли на продолжительность *climbing* в сравнении с контролем; вместе с тем соединения (X) (0.1 мкг/кг), (XIII) (1.0 и 10.0 мкг/кг) и флуоксетин снижали двигательную активность в вертикальной плоскости в сопоставлении с “пре-тестом” ( $p < 0.05$ ) (рис. 6). Таким образом, соединения (X) и (XIII) имели сходный с флуоксетином “профиль” фармакологического действия, проявлявшийся преобладанием *climbing* над *swimming*. Пептиды (X) и (XIII) по уровню активных доз существенно превосходили стандартный антидепрессант. Отличие соединения (XIII) (1.0 мкг/кг) от других пептидов и флуоксетина – способность индуцировать существенное возрастание значений показателя ЛП<sub>иммоб</sub>, что могло отражать отсрочивание выученной иммобилизации и предпочтительное активной стратегии поведения при повторной экспозиции в условиях неизбежного стресса (рис. 7б).

Аспекты сезонности влияют на трактовку результатов в FST. Иммобилизация у грызунов летом менее продолжительна, и поведение отчаяния менее выражено летом по сравнению с зимой и весной [27]; у трех из четырех исследованных антидепрессантов были выявлены сезонные колебания эффективности [28]. Выраженному эффекту соединений *N*-Ac-D-Ser-Pro-D-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (X) и *N*-Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (XIII) могло благоприятствовать проведение исследования в зимний период (наиболее приемлемый период для выявления антидепрессивного действия [27, 28]).

Перспективно дальнейшее изучение активности пептида *N*-Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (XIII) как потенциально эффективного фармакологического вещества с использованием иных животных моделей депрессивноподобного расстройства (хронический стресс, выученная беспомощность [24]).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.

**Компьютерное моделирование.** Молекулярный докинг рецептора V<sub>1a</sub> (P37288 (V1AR\_HUMAN), база данных SwissModel) и пептидов (или аминокислот), созданных с помощью программы PyMol, выполняли в программе UCSF Chimera (RBVI, США) через инструмент AutoDock Vina. Моделирование проводили локально в трансмембранной области белка-рецептора V<sub>1a</sub> согласно данным SwissModel. Минимизацию структуры пептидов проводили с помощью силового поля MMFF94 в программе ChemOffice 2019 (PerkinElmer Inc., США). Минимизацию структуры модели-рецептора осуществляли в программе UCSF Chimera. В данной работе использовали гибкий докинг: поиск оптимального положения осуществляли при



**Рис. 7.** Влияние пептидов на изменение показателя ЛП<sub>110mob</sub> (%) в тесте принудительного плавления: (а) – “тест”, после введения соединений относительно значений показателя в контроле; (б) – “тест” относительно значений показателя в “пре-тесте” (К-1 – контроль к соединению (VI); К-2 – контроль к соединениям (VIII) и (XII); К-3 – контроль к соединениям (X) и (XIII); К-4 – контроль к флуоксетину). #  $p < 0.05$ , критерий Уилкоксона.

подвижном лиганде (аминокислоте или пептиде) относительно неподвижной структуры белка. Для синтеза и дальнейших исследований отбирали соединения, показавшие наилучшие значения энергии связывания.

**Синтез пептидов.** В процессе синтеза использовали реагенты, аминокислоты и их производные фирм Sigma, США; AcrosOrganics, Бельгия; Fluka, Швейцария. Процессы синтеза и удаления защитных групп контролировали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках Merck (Германия) в различных системах растворителей: хлороформ–метанол–25%-ный аммиак 6 : 4 : 1 (А); этилацетат–пиридин–уксусная кислота–вода 5 : 3 : 1 : 2 (Б); хлороформ–метанол–25%-ный аммиак–уксусная кислота 20 : 15 : 5 : 1 (В); *n*-бутанол–уксусная кислота–вода 4 : 1 : 1 (Г); метанол–этилацетат–уксусная кислота 4 : 2 : 1 (Д). Соединения обнаруживали с помощью хлор-бензидиновой пробы.

Аналитическую ВЭЖХ и масс-спектрометрию (ионизация распылением в электрическом поле (ESI MS) в режиме сканирования положительных ионов) проводили на хроматографе Agilent 1200 с масс-селективным детектором типа тройной квадруполь Agilent 6140 (США). Колонка Agilent ZorbaxSBC18 RR (2.1 × 30 мм), размер частиц 3.5 мкм. Использовали градиент концентраций ацетонитрила 10–95% в 0.05%-ном растворе муравьиной кислоты в деионизированной воде.

Температуры плавления (некорректируемые) определяли на приборе Кофлера (Wagner & Munz, GmbH, Германия).

Удельное вращение соединений измеряли на спектрополяриметре J-20 (Jasco, Япония).

**Вос-Pro-Arg-ОН (I).** В 8 мл свежеперегнанного 1,4-диоксана растворяли 1.03 г (4.8 ммоль) *N*-трет-бутилоксикарбонилпролина и 0.61 г (5.3 ммоль) *N*-оксисукцинимида (SuOH) и при постоянном перемешивании охлаждали на ледяной бане до 7°C, затем в охлажденный раствор вносили 1.09 г (5.3 ммоль) DCC, перемешивали образовавшуюся суспензию в течение 1 ч при охлаждении и 3 ч при комнатной температуре. Выпавшую в осадок *N,N*-дициклогексилмочевину отфильтровывали и промывали на фильтре 1.0–1.5 мл 1,4-диоксана. Фильтрат, представляющий собой раствор *N*-сукцинимидного эфира пролина в 1,4-диоксане, прибавляли к раствору 0.59 г (3.4 ммоль) аргинина в 4 мл воды. Реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 4 ч, по окончании реакции охлаждали до 5°C, отфильтровывали осадок Вос-Pro-Arg-ОН, промывали на фильтре водой, охлажденной до 3–5°C, затем этилацетатом. Сушили в вакуум-эксикаторе с P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> до постоянной массы. Получили 1.12 г (89%) пептида (I) с чистотой ~99% по данным ВЭЖХ; т. пл. 154–155°C;  $[\alpha]_D^{20} -49^\circ$  (с 1, метанол);  $R_f$  0.72 (А), 0.25 (Б), 0.66 (В); ESI MS,  $m/z$ : 372.2 [ $M + H$ ]<sup>+</sup>, 373.2 [ $M + 2H$ ]<sup>+</sup>.

**Вос-Pro-D-Arg-ОН (II).** Синтез Вос-Pro-D-Arg-ОН проводили аналогично методике, описанной для соединения (I), за исключением стадии выделения: по окончании реакции из раствора упаривали на роторном испарителе 1,4-диоксан, к остатку приливали ацетон и после уплотнения осадка декантировали водно-ацетоновою слой, а осадок дважды переосаждали из метанола эфиром. Сушили в вакуум-эксикаторе с P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> до постоянной массы. Получили 1.02 г (80%) пептида (II) с чистотой ~99% по данным ВЭЖХ; т. пл. 130–

132°C;  $R_f$  0.72 (A), 0.25 (Б), 0.66 (B); MS ESI,  $m/z$ : 372.2 [ $M + H$ ]<sup>+</sup>, 373.2 [ $M + 2H$ ]<sup>+</sup>.

**HCl·Boc-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (III).** Смесь 1.11 г (3.0 ммоль) Boc-Pro-Arg-OH и 0.33 г (3.0 ммоль) HCl·Gly-NH<sub>2</sub> в 7 мл DMF (реагенты предварительно растирали в ступке до мелкого порошка) перемешивали 1 ч при 20°C, охлаждали до 0–5°C и добавляли 0.45 г (3.3 ммоль) 1-оксibenзотриазола (HOBT), затем 0.42 г (3.3 ммоль) *N,N'*-диизопропилкарбодиимид (DIPC). Реакционную смесь перемешивали 1 ч при (0–5°C) и 16 ч при 20°C. Осадок *N,N'*-диизопропилмочевины отделяли фильтрованием, промывали DMF. К диметилформамидному раствору добавляли 25 мл диэтилового эфира, после уплотнения осадка декантировали слой растворителей, осадок дважды переосаждали из метанола эфиром. Сушили в вакуум-эксикаторе с P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> и NaOH до постоянной массы. Получили 1.28 г (92%) пептида (III) с чистотой ~95% по данным ВЭЖХ; т. пл. 85–87°C;  $[\alpha]_D^{20} -51^\circ$  (с 1, метанол);  $R_f$  0.39 (Б), 0.56 (B), 0.56 (Г); ESI MS,  $m/z$ : 428.3 [ $M + H$ ]<sup>+</sup>, 450.3 [ $M + Na$ ]<sup>+</sup>, 855.5 [ $2M - H$ ]<sup>+</sup>.

**HCl·Boc-Pro-D-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (IV).** Пептид получали по методике синтеза соединения (III). В результате взаимодействия 0.35 г (0.94 ммоль) Boc-Pro-D-Arg-OH (II) и 0.10 г (0.94 ммоль) HCl·H-Gly-NH<sub>2</sub> получили 0.37 г (90%) пептида (IV) с чистотой ~98% по данным ВЭЖХ; т. пл. 85–87°C;  $R_f$  0.27 (A), 0.46 (Б), 0.76 (B); ESI MS,  $m/z$ : 428.3 [ $M + H$ ]<sup>+</sup>.

**Boc-Ser(Bzl)-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (V).** К охлажденному до 5°C на ледяной бане раствору 0.30 г (0.65 ммоль) Boc-Ser(Bzl)-OPfp (полученному методом Кишфалуди [22]) в 7 мл DMF добавляли 0.24 г (0.49 ммоль) 2HCl·CH<sub>3</sub>COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>·H-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (получали обработкой соединения (III) HCl в этилацетате) и 0.07 мл (0.50 ммоль) TEA (pH ~ 9). Перемешивали на ледяной бане в течение 1.5 ч, после чего выпавшие в осадок соли отфильтровывали, промывали на фильтре небольшим количеством DMF. К диметилформамидному раствору добавляли 20 мл диэтилового эфира, после уплотнения осадка декантировали слой растворителей, осадок дважды переосаждали из метанола диэтиловым эфиром и этилацетатом. Сушили в вакуум-эксикаторе с P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> и NaOH до постоянной массы. Получили 0.26 г (86%) с чистотой 85% по данным ВЭЖХ; т. пл. 115–117°C;  $R_f$  0.15 (Б); ESI MS,  $m/z$ : 605.4 [ $M + H$ ]<sup>+</sup>, 606.4 [ $M + 2H$ ]<sup>+</sup>, 607.4 [ $M + 3H$ ]<sup>+</sup>.

**N-Ac-Ser-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (VI).** К раствору 0.17 г (0.29 ммоль) 2HCl·H-Ser(Bzl)-Pro-Arg-Gly-

NH<sub>2</sub> (получали обработкой соединения (IV) HCl в этилацетате) в 1.1 мл DMF добавляли 0.04 мл (0.29 ммоль) TEA (pH ~ 8). Реакционную смесь охлаждали на ледяной бане и вносили 0.06 г (0.38 ммоль) сукцинимидного эфира уксусной кислоты (AcOSu). Перемешивали 3 ч, после чего осадок отфильтровывали, промывали на фильтре небольшим количеством DMF. К диметилформамидному раствору добавляли 10 мл диэтилового эфира, после уплотнения осадка декантировали слой растворителей, осадок дважды переосаждали из метанола диэтиловым эфиром и этилацетатом, защиту с OH-группы остатка серина в *N*-Ac-Ser(Bzl)-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> удаляли гидрированием в 1.1 мл раствора уксусной кислоты/метанола (2 : 1) в присутствии палладиевой черни при постоянном перемешивании в течение 1.5 ч, контролируя отщепление защитной группы методом ТСХ. Осадок катализатора отфильтровывали, тетрапептид переводили в осадок добавлением 15 мл диэтилового эфира. *N*-Ac-Ser-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> дважды переосаждали из метанола диэтиловым эфиром и этилацетатом. Очистку соединения проводили методом колоночной хроматографии на силикагеле-60, в качестве элюента использовали смесь хлороформ–метанол–вода в соотношении 10 : 10 : 1. Фракции, содержащий чистый пептид, объединяли и упаривали. После высущивания в эксикаторе получили 0.08 г (60%) соединения (VI) с чистотой 90% по данным ВЭЖХ; т. пл. 120–122°C;  $R_f$  0.19 (Б); ESI MS,  $m/z$ : 457.2 [ $M + H$ ]<sup>+</sup>.

**Boc-D-Ser-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (VII).** Тетрапептид получали аналогично методике синтеза соединения (V). В результате взаимодействия 0.14 г (0.29 ммоль) пептида 2HCl·CH<sub>3</sub>COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>·H-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (синтезировали обработкой соединения (IV) HCl в этилацетате) с 0.13 г (0.35 ммоль) Boc-D-Ser-OPfp получили 0.11 г (73%) Boc-D-Ser-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> с чистотой 87% по данным ВЭЖХ; т. пл. 113–115°C;  $[\alpha]_D^{20} -18^\circ$  (с 0.5, метанол);  $R_f$  0.38 (A), 0.36 (Б), 0.68 (Г); ESI MS,  $m/z$ : 515.3 [ $M + H$ ]<sup>+</sup>, 516.3 [ $M + 2H$ ]<sup>+</sup>, 537.3 [ $M + Na$ ]<sup>+</sup>.

**N-Ac-D-Ser-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (VIII).** Ацетилирование и очистку тетрапептида (VII) проводили аналогично методике синтеза соединения (VI). Из 0.10 г (0.22 ммоль) H-D-Ser-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> и 0.04 г (0.26 ммоль) AcOSu получили 0.08 г (80%) тетрапептида (VIII) с чистотой 98% по данным ВЭЖХ; т. пл. 124–125°C;  $R_f$  0.19 (Б), 0.83 (B); ESI MS,  $m/z$ : 457.2 [ $M + H$ ]<sup>+</sup>, 458.2 [ $M + 2H$ ]<sup>+</sup>.

**Boc-D-Ser-Pro-D-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (IX).** Синтез осуществляли аналогично способу получения соединения (V). В результате взаимодействия 0.32 г

(0.29 ммоль)  $2\text{HCl}\cdot\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5\cdot\text{H-Pro-D-Arg-Gly-NH}_2$  (получали обработкой соединения (IV)  $\text{HCl}$  в этилацетате) с 0.13 г (0.35 ммоль)  $\text{Woc-D-Ser-OPfp}$  получили 0.37 г (90%) с чистотой 90% по данным ВЭЖХ; т. пл. 114–116°C;  $R_f$  0.38 (А), 0.36 (Б), 0.68 (Г); ESI MS,  $m/z$ : 515.3  $[M + \text{H}]^+$ .

***N*-Ac-D-Ser-Pro-D-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (X).** Ацетилирование и очистку тетрапептида (IX) проводили аналогично методике получения соединения (VI). В результате взаимодействия 0.10 г (0.22 ммоль)  $\text{H-D-Ser-Pro-D-Arg-Gly-NH}_2$  (получали обработкой соединения (IX)  $\text{HCl}$  в этилацетате) с 0.04 г (0.26 ммоль)  $\text{AcOSu}$  получили 0.09 г тетрапептида (X) (90%) с чистотой 90% по данным ВЭЖХ; т. пл. 138–140°C;  $R_f$  0.03 (А), 0.09 (Б), 0.83 (В); ESI MS,  $m/z$ : 457.3  $[M + \text{H}]^+$ , 458.3  $[M + 2\text{H}]^+$ , 479.2  $[M + \text{Na}]^+$ .

***Woc-Phe-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>* (XI).** Синтез тетрапептида осуществляли по методике, описанной для соединения (V). В результате взаимодействия 0.20 г (0.41 ммоль)  $2\text{HCl}\cdot\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5\cdot\text{H-Pro-Arg-Gly-NH}_2$  с 0.26 г (0.53 ммоль)  $\text{Woc-Phe-OPfp}$  (синтезировали методом Кишфалуди [22]) получили тетрапептид (XI) массой 0.21 г (73%) с чистотой по ВЭЖХ 95%; т. пл. 119–121°C;  $R_f$  0.28 (А), 0.66 (Б), 0.65 (Д); ESI MS,  $m/z$ : 575.3  $[M + \text{H}]^+$ , 576.3  $[M + 2\text{H}]^+$ , 577.3  $[M + 3\text{H}]^+$ , 597.3  $[M + \text{Na}]^+$ .

***N*-Ac-Phe-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (XII).** Ацетилирование и очистку тетрапептида (XII) проводили аналогично методике, описанной для соединения (VI). В результате взаимодействия 0.08 г (0.15 ммоль)  $\text{H-Phe-Pro-Arg-Gly-NH}_2$  (получали обработкой соединения (XI)  $\text{HCl}$  в этилацетате) с 0.03 г (0.21 ммоль)  $\text{AcOSu}$  получили 0.06 г (77%) с чистотой по ВЭЖХ 90%; т. пл. 115–117°C;  $R_f$  0.16 (А), 0.43 (Д); ESI MS,  $m/z$ : 517.3  $[M + \text{H}]^+$ , 518.3  $[M + 2\text{H}]^+$ .

***N*-Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (XIII).** К раствору 0.98 г (2.0 ммоль)  $2\text{HCl}\cdot\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5\cdot\text{H-Pro-Arg-Gly-NH}_2$  (получен обработкой соединения (III)  $\text{HCl}$  в этилацетате) в 7.0 мл DMF добавляли 0.03 мл (2.0 ммоль) ТЕА (рН ~ 8). Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин, а затем добавляли 0.53 г (2.0 ммоль) *N*-Ac-Trp-OH. После охлаждения до 0°C в раствор добавляли 0.28 (2.1 ммоль)  $\text{NO}_2\text{t}$  и 0.32 мл (2.1 ммоль)  $\text{DIPSC}$ . Реакционную смесь перемешивали 1 ч при (0–5°C) и 18 ч при 20°C. Осадок *N,N'*-диизопропилмочевины отделяли фильтрованием, промывали DMF. Обработку синтеза проводили аналогично методике, описанной для соединения (VI). Сушили в вакуум-эксикаторе с  $\text{P}_2\text{O}_5$  и  $\text{NaOH}$  до постоянной массы. Получили 1.0 г (90%) пептида (XIII) с чистотой 95% по данным ВЭЖХ; т. пл.

125–127°C;  $R_f$  0.49 (Б), 0.44 (Д); ESI MS,  $m/z$ : 556.3  $[M + \text{H}]^+$ , 557.4  $[M + 2\text{H}]^+$ , 578.4  $[M + \text{Na}]^+$ .

**Влияние синтезированных пептидов на показатели поведения крыс линии Wistar в тесте принудительного плавания.** Фармакологическую активность полученных соединений изучали в опытах на половозрелых крысах-самцах линии Wistar с массой тела 250–350 г (питомник вивария Института биоорганической химии НАН Беларуси), содержавшихся в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде в соответствии с требованиями Санитарных правил и норм 2.1.2.12-18-2006 [29]. Всего было задействовано 194 крысы. Эксперименты проводили в период с сентября по январь (с 12:30 до 17:30).

Для создания депрессивноподобного состояния (поведение отчаяния) у грызунов использовали парадигму принудительного плавания. Установка и условия эксперимента соответствовали модифицированному методу Possolt [24, 30]; разграничивали поведение, направленное на выход из стрессовой ситуации в FST, на две категории: 1) плавание (*swimming*) по всей камере для проведения теста с движениями лапок животного в горизонтальной плоскости, 2) вскарабкивание (*climbing*) с движением передних конечностей в вертикальной плоскости. Прозрачный пластиковый цилиндр диаметром 30 см и высотой 66 см на высоту 38 см наполняли водой, температуру которой поддерживали на уровне 25°C. Температуру регистрировали каждые 16 мин с помощью автоматического термометра (Jiedong Hualing Plastic Co., LTD, Китай), при необходимости извлечения животного, добавляли горячую воду до достижения необходимой температуры. При проведении эксперимента продолжительностью 16 мин животное помещали в цилиндр с водой таким образом, чтобы оно не могло ни выбраться из сосуда, ни найти в нем опору, т.е. касаться дна лапками или хвостом. В ходе эксперимента визуально регистрировали следующие показатели: 1) суммарную длительность иммобилизации; 2) суммарную длительность активного плавания в варианте *swimming*; 3) суммарную длительность активного плавания в варианте *climbing*; 4) суммарную длительность пассивного плавания; 5) латентный период первой иммобилизации ( $\text{ЛП}_{\text{иммоб}}$ ); 6) латентный период первого акта активного плавания в варианте *swimming* ( $\text{ЛП}_{\text{лакт}}$ ). Критерием антидепрессивной активности исследуемых соединений в FST считали статистически достоверное уменьшение длительности иммобилизации в сравнении с контролем. За сутки до тестирования каждое животное помещали в сосуд с водой на тот же промежуток времени для адаптации (“пре-тест”,

по аналогии с работами [24, 30]), затем регистрировали вышеперечисленные показатели. При повторных тестированиях в FST у крыс наблюдается выученная иммобилизация, которая объясняется тем, что стрессовая ситуация становится более знакомой животному [31].

Экспериментальных крыс разделили на контрольные и опытные группы. Особям контрольных групп 1–4 (по 5–15 крыс в группе) назначали однократно интраназально дистиллированную воду (за 10–30 мин до эксперимента) в объеме 1 мкл на 10 г массы тела; контрольные группы 1–4 служили для сопоставления с основными группами при введении пептидов (VI); (VIII) и (XII); (X) и (XIII); флуоксетина соответственно (за 10–30 мин до эксперимента). Исследуемые соединения в виде водных растворов применяли у животных основных групп однократно интраназально в дозах 0.1, 1.0 и 10.0 мкг/кг с использованием эквивалентного объема растворителя. Число особей в каждой из основных групп составляло 10, кроме группы животных, которым вводили соединение (XIII) (доза 10.0 мкг/кг) – 19 крыс. В качестве препарата сравнения использовали флуоксетин (Флуксен, Украина), который вводили интратрибушинно в дозе 20 мг/кг ( $n = 10$ ).

Изменения значений изученных показателей на этапе “тест” относительно таковых в контроле определяли по формуле:

$$A_1 = \frac{X_{\text{оп}} - X_{\text{к}}}{X_{\text{к}}} \times 100,$$

где  $A_1$  – активность соединения, %;  $X_{\text{оп}}$  и  $X_{\text{к}}$  – среднее значение измеряемого показателя у животных основной и контрольной группы соответственно, с.

Изменения значений исследуемых параметров на этапе “тест” относительно таковых в “пре-тесте” определяли по формуле:

$$A_2 = \frac{X_{\text{test}} - X_{\text{pre-test}}}{X_{\text{pre-test}}} \times 100,$$

где  $A_2$  – изменения значений показателя в “тесте” относительно таковых в “пре-тесте”, %;  $X_{\text{test}}$  и  $X_{\text{pre-test}}$  – среднее значение измеряемого показателя у животных на этапе “тест” и “пре-тест” соответственно, с.

При определении статистической значимости различий в вариационных рядах использовали метод непараметрической статистики; для сравнения двух зависимых выборок применяли критерий Уилкоксона, для сравнения двух независимых выборок – критерий Манна–Уитни; при наличии трех и более групп использовали критерий Крускала–Уоллиса для независимых выборок. Для анализа качественных признаков применяли

точный критерий Фишера. Критический уровень статистической значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0.05.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования, используя компьютерное моделирование, были предложены структуры тетрапептидных аналогов АВП<sub>6-9</sub>, потенциально обладающих поведенческой активностью. Разработаны методики синтеза смоделированных соединений (*N*-Ac-Ser-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>, *N*-Ac-D-Ser-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>, *N*-Ac-D-Ser-Pro-D-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>, *N*-Ac-Phe-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> и *N*-Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>) классическими методами пептидной химии в растворе и получены их опытные образцы. В результате изучения влияния однократного интраназального введения синтезированных тетрапептидов в дозах 0.1, 1.0, 10.0 мкг/кг на показатели поведения крыс-самцов линии Wistar в FST установлено, что действие *N*-Ac-D-Ser-Pro-D-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (в дозе 1.0 мкг/кг) и *N*-Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (в дозах 0.1, 1.0, 10.0 мкг/кг) наиболее сходны с референтным препаратом флуоксетин. Полученные данные позволяют предположить наличие антидепрессивной активности у данных пептидов. При подтверждении эффектов *N*-Ac-D-Ser-Pro-D-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> и *N*-Ac-D-Ser-Pro-D-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> в других моделях данные вещества могут быть перспективными в качестве фармакологических субстанций для создания новых антидепрессантов и ноотропов с интраназальным способом введения.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.б.н., доценту, старшему научному сотруднику биологического факультета МГУ О.Г. Воскресенской и д.б.н., профессору, заведующему кафедрой физиологии человека и животных биологического факультета МГУ А.А. Каменскому за плодотворное обсуждение ряда вопросов, изложенных в данной работе.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках гранта Национальной академии наук Беларуси № 2021-27-169 “Синтез пептидных нейропротекторов, обладающих анксиолитической и антидепрессивной активностью”.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В ходе исследований соблюдались требования Санитарных правил и норм 2.1.2.12-18-2006 “Устройство, оборудование и содержание экспериментально-биологических клиник (вивариев)”, 02.01.07 (Минск,

2006), а также основных положений Технического кодекса установившейся практики “Надлежащая лабораторная практика” ТКП 125-2008 (02040), 01.05.08 (Минск, 2008). Эксперименты выполнены в соответствии с Хельсинской Декларацией о гуманном обращении с животными (1986 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Белакоскова С.Г., Цикунов С.Г.* // *Обзоры по клинич. фармакол. и лек. терапии.* 2018. Т. 16. С. 5–12. <https://doi.org/10.17816/RCF1635-12>
2. *Stark H., Burbach J.P.H., Van Der Kleij A.A.M., De Wied D.* // *Peptides.* 1989. V. 10. P. 717–720. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(89\)90102-2](https://doi.org/10.1016/0196-9781(89)90102-2)
3. *Burbach J.P.H., Schoots O., Hernando F.* // *Progress in Brain Res.* 1999. V. 119. P. 127–139. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)61566-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)61566-6)
4. *Hirate K., Hirano M., Nakajima Y., Hiayma A., Maeda O., Asakura W.* // *Behav. Brain Res.* 1997. V. 83. P. 205–208. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(97\)86070-6](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(97)86070-6)
5. *Sermasi E., Howl J., Wheatley M., Coote J.H.* // *Exp. Brain Res.* 1998. V. 119. P. 85–91. <https://doi.org/10.1007/s002210050322>
6. *Tanabe S., Shishido Y., Nakayama Y., Furushido M., Hashimoto S., Terasaki T., Tsujimoto G., Yokokura E.* // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1999. V. 63. P. 549–553. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(99\)00034-9](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(99)00034-9)
7. *Ostrowski N.L., Lolait S.T., Young W.S.* // *Endocrinology.* 1994. V. 135. P. 1511–1528. <https://doi.org/10.1210/endo.135.4.7925112>
8. *Jurzak M., Fahrenholz F., Gerstberger R.* // *J. Neuroendocrinol.* 1993. V. 5. P. 523–531. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.1993.tb00517.x>
9. *Gouzenes L., Dayanithi G., Moos F.C.* // *J. Neuroendocrinol.* 1999. V. 10. P. 1735–1739. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-05-01879.1998>
10. *Maegawa H., Katsube N., Okegawa T., Aishita H., Kawasaki A.* // *Life Sci.* 1992. V. 51. P. 285–293. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(92\)90087-6](https://doi.org/10.1016/0024-3205(92)90087-6)
11. *Nakayama Y., Takano Y., Shimohigashi Y., Tanabe S., Fujita T., Kamiya H., Tsujimoto G.* // *Brain Res.* 2000. V. 858. P. 416–423. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)01955-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)01955-7)
12. *Tanabe S., Shishido Y., Furushido M., Kado K., Hashimoto S., Yokokura E., Terasaki T.* // *Patent EP0919567A1, 02.06.1999.*
13. *Гуревич К.Г.* // *Качественная клиническая практика.* 2008. №. 1. С. 2–5.
14. *Мартиневич В.П., Слободчикова Л.К., Голубович В.П., Ахрем А.А., Титов С.А., Воскресенская О.Г.* // *Хим.-фарм. журнал.* 1989. Т. 23. С. 713–716. <https://doi.org/10.1007/BF00764432>
15. *Hurby V.J., Chow M.S., Smith D.D.* // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1990. V. 30. P. 501–534. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.30.040190.002441>
16. *Воскресенская О.Г., Ким А.П., Голубович В.П., Каменский А.А.* // *Нейрохимия.* 2008. Т. 25. С. 64–69.
17. *Белякова А.С., Воскресенская О.Г., Каменский А.А., Голубович В.П.* // *Вестн. Моск. ун-та. Биология.* 2012. Т. 16. С. 3–7. [*Belyakova A.S., Voskresenskaya O.G., Kamensky A.A., Golubovich V.P.* // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2012. V. 67. P. 1–5.] <https://doi.org/10.3103/S0096392512010026>
18. *Slusarz M.J., Sikorska E., Slusarz R., Ciarkowski J.* // *J. Med. Chem.* 2006. V. 49. P. 2463–2469. <https://doi.org/10.1021/jm051075m>
19. *Slusarz R., Slusarz M.J.* // *QSAR & Combinatorial Science.* 2009. V. 28. P. 1166–1175. <https://doi.org/10.1002/qsar.200810164>
20. *Mouillac B., Chini B., Balestre M.N., Elands J., Trumpp-Kallmeyer S., Hoflack J., Hibert M., Jard S., Barberis K.* // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 25771–25777. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.43.25771>
21. *Бородина К.В., Стаханова А.А., Мартинович В.П., Воскресенская О.Г., Голубович В.П., Каменский А.А.* // *Известия НАН Беларуси. Сер. хим. наук.* 2021. Т. 57. С. 61–69. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-1-61-69>
22. *Kisfaludi L., Schon I., Szirtes T., Nyeki O., Low M.* // *Tetrahedron Lett.* 1974. V. 15. P. 1785–1786.
23. *Benoiton N.L.* // *Chemistry of Peptide Synthesis. USA: CRC Press Taylor & Francis Group,* 2006. 290 p.
24. *Slattery D.A., Cryan J.F.* // *Nature Prot.* 2012. V. 7. P. 1009–1014. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.044>
25. *Гарубова Т.Л., Крайнева В.А., Воронина Т.А.* // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2017. № 3. С. 14–19.
26. *Contreras C.M., Rodriguez-Landa J.F., Gutiérrez-García A.G., Bernal-Morales B.* // *J. Psychopharmacol.* 2001. V. 15. P. 231–236. <https://doi.org/10.1177/026988110101500401>
27. *Aksoy A., Schulz D., Yilmaz A., Canbeyli R.* // *Int. J. Neurosci.* 2004. V. 114. P. 1513–1520. <https://doi.org/10.1080/00207450490509131>
28. *Borsini F., Lecci A., Stasi M.A., Pessia M., Meli A.* // *Behav. Pharmacol.* 1990. V. 1. P. 395–401.
29. СТБ 2.1.2.12-18-2006. Устройство, оборудование и содержание экспериментально-биологических клиник (вивариев). Минск: Министерство здравоохранения, 2006. 22 с.
30. *Mezadri T.J., Batista G.M., Portes A.C., Marino-Neto J., Lino-de-Oliveira C.* // *J. Neurosci. Methods.* 2011. V. 195. P. 200–205. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.12.015>
31. *Parra A., Vinader-Caerols C., Monleón S., Simón V.M.* // *Psicothema.* 1999. V. 11. P. 239–246.

## Synthesis and Study of Anti-Depressive Properties of New Analogs of Arginin-Vasopressin

**K. V. Borodina\*<sup>#</sup>, O. N. Savanets\*, E. S. Pustylga\*, V. P. Martinovich\*, E. N. Kravchenko\*,  
L. M. Olgomets\*, and V. P. Golubovich\***

<sup>#</sup>Phone: +375 (44) 777-40-36; e-mail: borodina@iboch.by

\*Institute of Bioorganic Chemistry of National Academy of Science of Belarus,  
ul. Academica V.F. Kuprevicha 5/2, Minsk, 220141 Belarus

Using the method of computer modeling the new analogs of C-terminal fragment of arginine-vasopressin (*N*-Ac-D-Ser-Pro-D-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>, *N*-Ac-Phe-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>, *N*-Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>) with antidepressant activity were proposed. The article presents the method of synthesis of simulated substances. The Forced Swimming Test was used to identify substances which are potentially possessing antidepressant activity. It was shown that intranasal administration of studied peptides to Wistar male rats at doses of 0.1–10.0 µg/kg effected on swimming behavior of rodents. The greatest similarity for a number of study parameters with the reference preparation (fluoxetine) possess *N*-Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (0.1, 1.0 and 10.0 µg/kg) and *N*-Ac-D-Ser-Pro-D-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (1.0 µg/kg).

*Keywords: peptides, arginine-vasopressin, computer modeling, intranasal administration, depression, rats*



УДК 577.352.5

## ЭЛЕКТРОПОДВИЖНЫЙ БЕЛОК ПРЕСТИН КАК ЧУВСТВИТЕЛЬНОЕ ЯДРО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИНДИКАТОРА МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА

© 2022 г. Л. А. Кост\*, В. А. Юнусова\*, В. О. Иванова\*\*, Е. С. Никитин\*\*,  
К. А. Лукьянов\*, А. М. Богданов\*.#

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

\*\*ФГБУН “Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии” РАН,  
Россия, 117485 Москва, ул. Бутлерова, 5А

Поступила в редакцию 10.08.2021 г.

После доработки 20.08.2021 г.

Принята к публикации 21.08.2021 г.

В настоящей работе мы впервые применили престин – электроподвижный белок слухового анализатора млекопитающих – в качестве потенциал-чувствительного ядра генетически кодируемого индикатора мембранного потенциала. Prestin-5 – один из вариантов химерного белка, полученного нами путем слияния полипептидных цепей престина и флуоресцентного репортера FusionRed, – при электрофизиологическом тестировании продемонстрировал флуоресцентный ответ на изменение мембранного потенциала, характеризующийся субмиллисекундной кинетикой. Таким образом, мы показали работоспособность престина в составе флуоресцентных потенциал-чувствительных конструкций.

*Ключевые слова:* индикатор мембранного потенциала, флуоресцентный биосенсор, нейробиология, флуоресцентные белки, престин

DOI: 10.31857/S0132342322030095

### ВВЕДЕНИЕ

Перспективный подход к мониторингу электрической активности нервных клеток – использование генетически кодируемых индикаторов мембранного потенциала (ГКИМП) [1], которые представляют собой химерные белки с трансмембранным доменом. Индикаторы разной структурной организации объединяет наличие у них двух функциональных активностей: чувствительности к мембранному потенциалу и способности реагировать на его колебания изменением своих оптических свойств. В большинстве ГКИМП эти функциональные активности реализуются структурно различающимися белковыми доменами, потенциал-чувствительным (ПЧД) и репортерным (чаще всего представлен вариантом флуоресцентного белка). Имеющийся репертуар ПЧД сравнительно беден [1], и поиск новых кандидатов на эту роль представляется актуальной научной задачей.

Сокращения: ГКИМП – генетически кодируемые индикаторы мембранного потенциала; ПЧД – потенциал-чувствительный домен; FP – флуоресцентный белок (fluorescent protein); cpFP – циркулярный пермутант флуоресцентного белка (circularly permuted fluorescent protein).

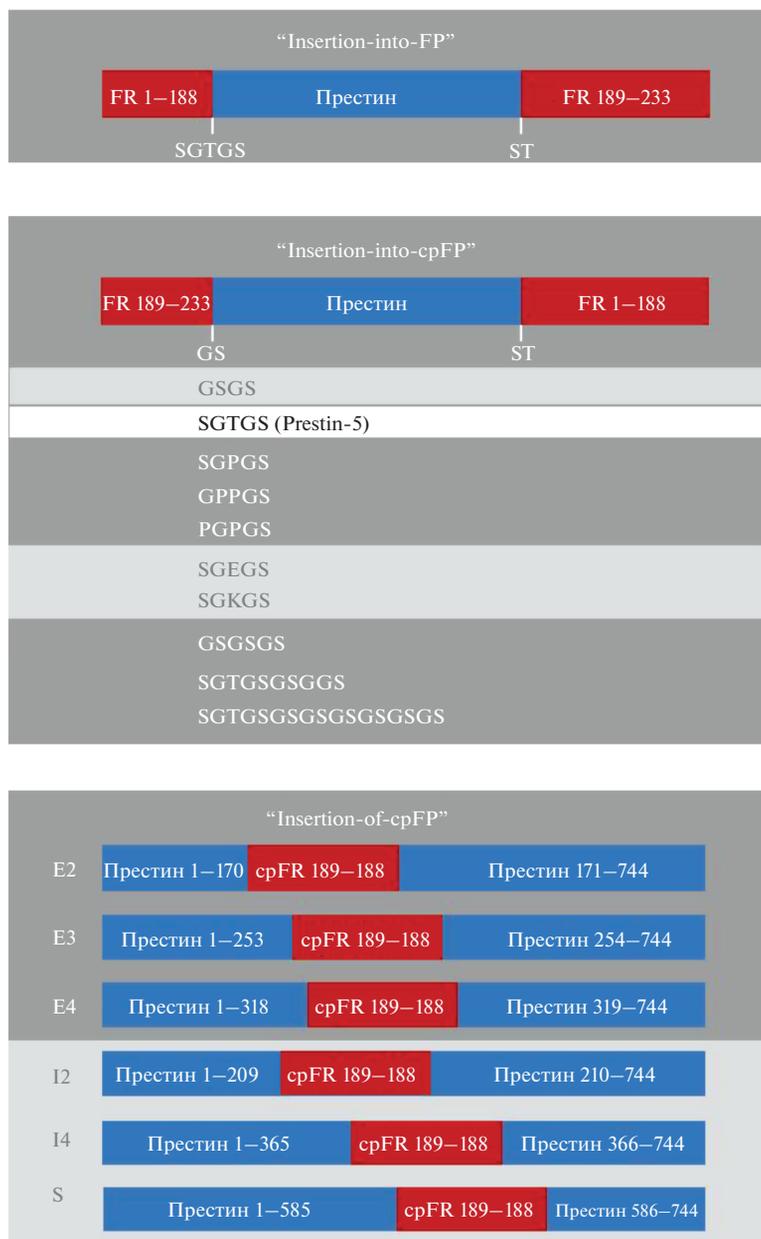
# Автор для связи: (тел.: +7 (903) 746-08-49; эл. почта: noobissat@ya.ru).

Престин – электроподвижный белок латеральной мембраны внешних волосковых клеток млекопитающих, конформационные изменения которого в ответ на изменения электрохимического потенциала происходят в субмиллисекундной временной шкале [2, 3]. Недавно была также выявлена роль престина в работе сердечной мускулатуры [4]. Цель настоящей работы – определить, возможно ли использование престина в роли потенциал-чувствительного домена ГКИМП.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно данным компьютерного моделирования [5], молекула престина состоит из 14 трансмембранных сегментов и цитоплазматического STAS-домена. Принимая во внимание крупный размер и сложность организации молекулы престина, мы предложили три топологических варианта молекулы индикатора: “insertion-into-FP”, “insertion-into-cpFP”, а также “insertion-of-cpFP” (рис. 1). В качестве репортерного домена был взят красный флуоресцентный белок FusionRed, потенциально пригодный для визуализации индикатора *in vivo*.

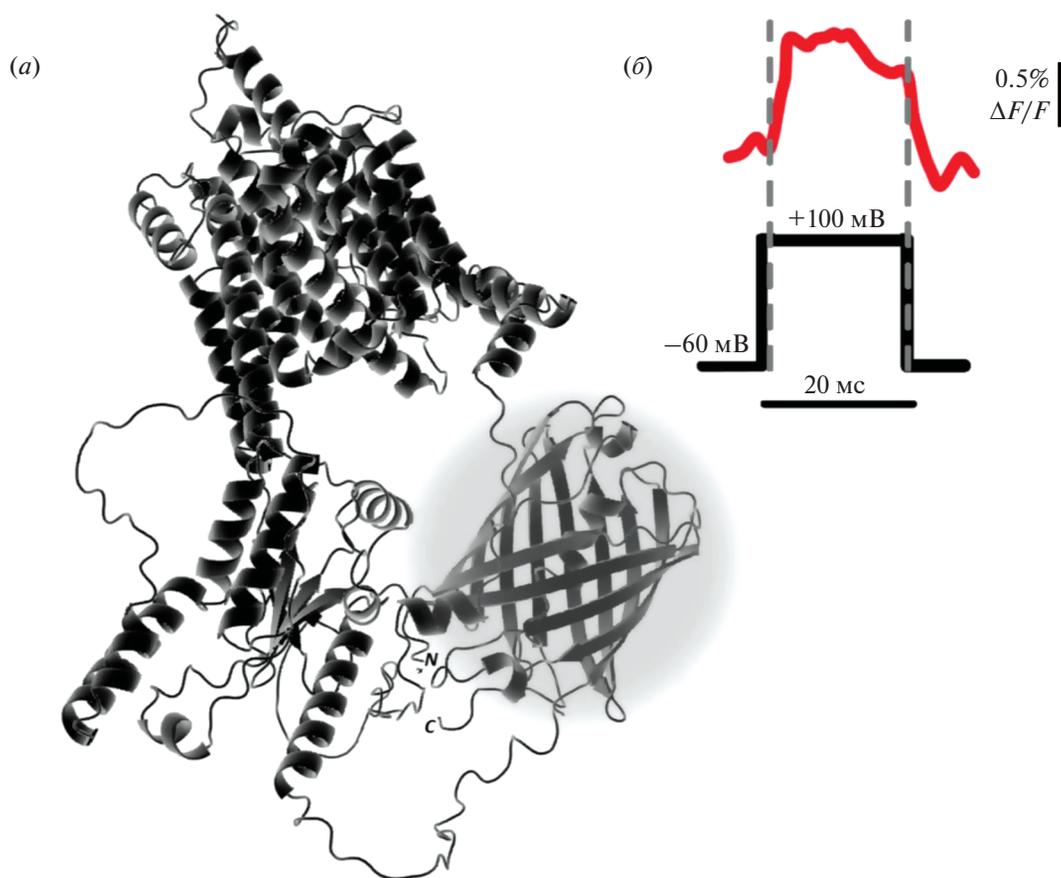
Первый вариант предполагает вставку гена чувствительного ядра (престина) внутрь гена флуоресцентного белка с сохранением “нативно-



**Рис. 1.** Линейные схемы химерных белков на основе престины (синий) и флуоресцентного белка FusionRed (красный). Прямоугольниками обозначены фрагменты полипептидных цепей доменов, входящих в состав индикатора (нумерация аминокислот представлена в соответствии с нативной первичной структурой). Под вертикальными линиями, разделяющими функциональные домены, указаны последовательности аминокислотных линкеров в однобуквенном коде. В конструкциях “insertion-of-cpFP” состав линкеров стандартный: N-концевой GS, C-концевой GT. На белом фоне представлен функциональный вариант ГКИМП, на светло-сером – варианты, прошедшие первичное тестирование, на темно-сером – остальные химерные молекулы. FR – FusionRed, cpFR – циркулярно пермутированный FusionRed.

го” порядка следования аминокислот FusionRed, но с фрагментацией его последовательности. Второй вариант представляет собой вставку гена престины внутрь гена циркулярного пермутанта флуоресцентного белка cpFusionRed 189–188. Выбор положения вставки чувствительного ядра обоснован успешным применением этого способа организации химерного гена в ГКИМП семейства VSDFR 189–188, описанных нами ранее [6, 7].

Третий вариант, топология “insertion-of-cpFP”, основан на инсерции кодирующей последовательности cpFusionRed 189–188 в последовательность чувствительного ядра (престины). Для инсерции были выбраны три петельных участка, локализованных во внеклеточном пространстве (E2, E3, E4), два петельных участка во внутриклеточном пространстве (I2, I4) и участок, соединяющий трансмембранный домен I4 и STAS-домен (S).



**Рис. 2.** (а) – Модель пространственной структуры ГКИМП Prestin-5, полученная с помощью онлайн-ресурса AlphaFold2. Трансmemбранный домен престилина сверху; (б) – усредненное изменение интенсивности флуоресцентного сигнала Prestin-5 (красная кривая) в клетках линии НЕК293Т ( $n = 6$ ) при изменении мембранного потенциала от  $-60$  мВ до  $+100$  мВ (черная кривая).

Всего было сконструировано 18 вариантов индикатора (рис. 1), каждый из которых включен в соответствующий ДНК-вектор для экспрессии в клетках эукариот.

При экспрессии в клетках линии НЕК293Т оценивали корректность мембранной локализации, склонность к агрегации и интенсивность флуоресцентного сигнала индикаторов. Восемь конструкций, продемонстрировавших удовлетворительные результаты этого первичного тестирования (рис. 1), были направлены на функциональное тестирование методом whole-cell voltage clamp, которое представляло собой непрерывное измерение интенсивности флуоресценции при циклически запрограммированных сдвигах мембранного потенциала от удерживающего потенциала ( $-60$  мВ) до  $+100$  мВ.

Один из вариантов в топологической группе “insertion-into-cpFP” – Prestin-5 – при электрофизиологическом тестировании продемонстрировал индикаторные свойства (рис. 2). Его флуоресцентный ответ на изменение мембранного потенциала характеризуется динамическим диапазоном

$1.23\% \Delta F/F$ , временем активации флуоресцентного ответа индикатора  $\tau_{\text{on}} = 0.57$  мс и временем его инактивации  $\tau_{\text{off}} = 1.50$  мс (рис. 2б). Prestin-5 был успешно экспрессирован нами в первичной эмбриональной культуре нейронов мыши, что показывает возможность использования данного ГКИМП в модельной системе, релевантной для задач нейробиологии.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экспрессионные векторы содержали кодирующую последовательность гена престилина монгольской песчанки *Meriones unguiculatus* (UniProt ID: Q9JKQ2, любезно предоставлена Peter Dallos) и фрагменты красного флуоресцентного белка FusionRed (Евроген, Россия). Упомянутые последовательности амплифицировали методом ПЦР, используя праймеры, содержащие сайты узнавания эндонуклеазы рестрикции BsaI и участки, гомологичные последовательностям престилина и FusionRed, температура отжига  $60^\circ\text{C}$ , элонгация 20–120 с, 18–25 циклов. ПЦР-фрагменты вставля-

ли в вектор pICH47742 (Addgene, США) методом модульного клонирования Golden Gate [8].

Транзистентную трансфекцию клеток НЕК293Т (из коллекции АТСС) и первичных эмбриональных нейронов мыши проводили методом липофекции с использованием FuGene HD (Promega, США) согласно протоколу производителя. Флуоресцентный сигнал оценивали спустя 48 ч после трансфекции на флуоресцентном микроскопе BioRevo BZ-9000 (Keyence, Япония) с использованием светофильтров TxRed (возбуждение 562/40 нм, эмиссия 624/40 нм). Электрофизиологическое тестирование методом локальной фиксации потенциала в конфигурации whole cell проводили на клетках линии НЕК293Т. Сигнал усиливали при помощи стандартного внутриклеточного усилителя Axoclamp 2B (Axon Instruments, США) в режиме фиксации потенциала.

Флуоресцентный ответ на изменение мембранного потенциала регистрировали с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 5 live (Zeiss, Германия), объектив 63× W.I. NA 1.0 IR DIC (Zeiss, Германия).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы получена химерная конструкция Prestin-5, представляющая собой циркулярно пермутированный красный флуоресцентный белок FusionRed со вставкой полипептидной цепи престины внутрь молекулы и демонстрирующая индикаторные свойства. Кинетические характеристики этого варианта индикатора ставят его в один ряд с наиболее “быстрыми” ГКИМП на основе прокариотических опсинов. Таким образом, мы показали, что престин пригоден для использования в качестве потенциал-чувствительного ядра ГКИМП.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-34-90140).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bando Y., Grimm C., Cornejo V.H., Yuste R. // BMC Biol. 2019. V. 17. P. 71. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0682-0>
2. Zheng J., Shen W., He D.Z., Long K.B., Madison L.D., Dallos P. // Nature. 2000. V. 405. P. 149–155. <https://doi.org/10.1038/35012009>
3. Santos-Sacchi J., Tan W. // J. Neurosci. 2018. V. 38. P. 5495–5506. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0425-18.2018>
4. Zhang X.-D., Thai P.N., Ren L., Perez Flores M.C., Ledford H.A., Park S., Lee J.H., Sihm C.R., Chang C.W., Chen W.C., Timofeyev V., Zuo J., Chan J.W., Yamoah E.N., Chiamvimonvat N. // Cell Rep. 2021. V. 35. P. 109097. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109097>
5. Geertsma E.R., Chang Y.-N., Shaik F.R., Shaik F.R., Neldner Y., Pardon E., Steyaert J., Dutzler R. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2015. V. 22. P. 803–808. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3091>
6. Kost L.A., Nikitin E.S., Ivanova V.O., Sung U., Putintseva E.V., Chudakov D.M., Balaban P.M., Lukyanov K.A., Bogdanov A.M. // PLoS One. 2017. V. 12. P. e0184225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184225>
7. Kost L.A., Ivanova V.O., Balaban P.M., Lukyanov K.A., Nikitin E.S., Bogdanov A.M. // Sensors. 2019. V. 19. P. 2982. <https://doi.org/10.3390/s19132982>
8. Weber E., Engler C., Gruetzner R., Werner S., Marillonnet S. // PLoS One. 2011. V. 6. P. e16765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016765>

## The Electromotive Protein Prestin as a Sensitive Core of the Fluorescent Voltage Indicator

L. A. Kost\*, V. A. Iunusova\*, V. O. Ivanova\*\*, E. S. Nikitin\*\*, K. A. Lukyanov\*, and A. M. Bogdanov\*.,#

#Phone: +7 (903) 746-08-49; e-mail: noobissat@ya.ru

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

\*\*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, ul. Butlerova 5A, Moscow, 117485 Russia

In this study, we first used prestin, an electromotive protein of the mammalian auditory analyzer, as a voltage-sensitive core of a genetically encoded voltage indicator. Prestin-5, one of the chimeric proteins obtained as a fusion of prestin and the fluorescent reporter FusionRed, demonstrated a fluorescent response to change in membrane potential, characterized by submillisecond kinetics. Thus, we demonstrate the performance of prestin in fluorescent voltage-sensitive constructs.

*Keywords: voltage indicator, fluorescent biosensor, neurobiology, fluorescent proteins, prestin*



УДК 547.782

## ВЛИЯНИЕ ПОЛОЖЕНИЯ СОПРЯЖЕННОГО ЗАМЕСТИТЕЛЯ НА ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ ХРОМОФОРА БЕЛКА Kaede<sup>1</sup>

© 2022 г. И. Н. Мяснянко\*, \*\*, Н. С. Балеева\*, \*\*, #, М. С. Баранов\*, \*\*

\*ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,  
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10\*\*Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова,  
Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Поступила в редакцию 13.09.2021 г.

После доработки 20.09.2021 г.

Принята к публикации 29.09.2021 г.

Синтезированы новые производные хромофора белка Kaede – (Z)-2-(4-метоксибензилиден)-6/8-фенилимидазо[1,2-a]пиридин-3(2H)-оны. Установлено, что положение фенильного заместителя в имидазопиридиновом фрагменте не влияет на оптические свойства подобных соединений.

*Ключевые слова:* имидазолы, хромофоры, флуоресцентный белок Kaede, флуоресценция

DOI: 10.31857/S0132342322030149

### ВВЕДЕНИЕ

Синтетические аналоги хромофоров флуоресцентных белков – бензилиденимидазолы – высокоперспективны в качестве основы для новых флуоресцентных меток. Благодаря большому количеству существующих синтетических методов модификации этих соединений можно легко получить вещества разного строения и с разными заместителями, что потенциально позволяет значительно варьировать их оптические свойства [1, 2]. В частности, для флуоресцентных красителей важна способность поглощать и испускать свет длинноволнового диапазона – менее токсичный для биологических тканей. Эффективный подход к батохромному смещению максимумов абсорбции и эмиссии красителей – увеличение системы сопряженных π-связей. Например, флуоресцентные белки Kaede и DsRed, хромофоры которых содержат во 2-м положении имидазолон заместители с кратными связями, имеют максимум флуоресценции 580–585 нм [3], в то время как флуоресцентный белок GFP (Green Fluorescent Protein), хромофор которого имеет алкильную группу в этом положении, характеризуется флуоресценцией с максимумом 510 нм [3]. Аналогично показано, что синтетические аналоги хромофора GFP, имеющие во 2-м положении иные стироль-

ные заместители, испускают свет в области ~600 нм [4–8]. Схожими свойствами обладают конденсированные производные [9, 10], у которых данный фрагмент циклически замкнут на атом азота имидазолонного цикла. Ранее на примере пары синтетических аналогов хромофора Kaede нами была изучена зависимость оптических свойств от подвижности кратной связи во 2-м положении имидазолон (рис. 1) [11]. Было установлено, что фиксация двойной связи для конденсированного производного (I) приводит к батохромному сдвигу максимумов абсорбции на 79 нм и эмиссии на 19 нм (рис. 1).

Цель настоящей работы – изучение влияния положения фенильного заместителя в имидазопиридиновом фрагменте на оптические свойства производных хромофора белка Kaede.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы нами из бромопиридин-2-аминов были получены пиридиновые производные глицина (II) и (III). Затем с помощью конденсации с анисовым альдегидом были синтезированы соответствующие имидазопиридины (IV). На заключительной стадии синтеза с помощью реакции арилирования бромпроизводных (IV) были получены целевые соединения (V).

Установлено, что оптические свойства полученных соединений (V) (схема 1) не отличаются от свойств ранее описанного аналога (I) (рис. 1). Все производные характеризуются абсорбцией с максимумом 500–505 нм и эмиссией с максимумом

<sup>1</sup> Дополнительные материалы к этой статье доступны по doi 10.31857/S0132342322030149 для авторизованных пользователей.

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



Также мы установили, что новые производные (V) обладают слабой флуоресценцией с квантовым выходом 1.5–2.0% (в ацетонитриле). Многие производные хромофоров флуоресцентных белков с подобными свойствами могут быть использованы в качестве флуорогенных красителей [10, 12]. Поэтому можно предположить, что производные (V) и родственные им соединения также перспективны для применения во флуоресцентной микроскопии в данной роли.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Оборудование.** Спектры ЯМР ( $\delta$ , м.д.;  $J$ , Гц) регистрировали на спектрометре Fourier 300 (300 МГц; Bruker, США) при 303 К в DMSO- $d_6$  (внутренний стандарт – Me<sub>4</sub>Si), спектры поглощения – на спектрофотометре Cary 100 Bio (Varian, США), спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США). Температуры плавления определяли на приборе SMP 30 (Stuart Scientific, Великобритания) и не исправляли. Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на приборе micrOTOF II (Bruker, Германия), ионизация электрораспылением.

**Синтез этил(бромопиридин-2-ил)глицината (II).** Бромопиридин-2-амин (10 г, 58 ммоль) растворяли в смеси HClO<sub>4</sub> (50%, 24.0 мл) и EtOH (50 мл), добавляли водный раствор гликосяля (40%, 8.00 мл, 64 ммоль). Полученную смесь кипятили в течение 40 ч. Затем реакционную смесь охлаждали до 0°C, разбавляли насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> до pH 7, экстрагировали CHCl<sub>3</sub> (4 × 160 мл), сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Продукт очищали методом флеш-хроматографии (элюент – этилацетат и гексан, 1 : 1).

**Синтез гидрохлорида (бромопиридин-2-ил)глицина (III).** Этил-2-((бромопиридин-2-ил)амино)ацетат (32 ммоль) растворяли в HCl (5 М, 32 мл) и кипятили 6 ч. Затем смесь упаривали, остаток промывали Et<sub>2</sub>O (2 × 50 мл) и сушили в вакууме.

**Синтез (Z)-бromo-2-(4-метоксибензилиден)имидазо[1,2-*a*]пиридин-3(2H)-она (IV).** 2-((3-Бромопиридин-2-ил)амино)уксусной кислоты гидрохлорид (800 мг, 3.0 ммоль) помещали в колбу Шленка, вакуумировали, заполняли аргоном и добавляли 4.5 мл PCl<sub>3</sub> (51 ммоль). Полученную смесь кипятили в течение 5 ч и упаривали. К остатку в токе аргона добавляли анисовый альдегид (0.330 мл, 2.7 ммоль), пиридин (3.0 мл) и триэтиламин (0.50 мл). Реакционную смесь выдерживали при 70°C в течение 12 ч, а затем упаривали. Полученный остаток растворяли в EtOAc (50 мл), промывали насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> (10 мл) и насыщенным раствором NaCl (3 × 15 мл), сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Полученный продукт очищали методом

флеш-хроматографии (элюент – этилацетат и гексан, 1 : 3).

**Синтез (Z)-2-(4-метоксибензилиден)-фенилимидазо[1,2-*a*]пиридин-3(2H)-она (V).** В колбу Шленка помещали (Z)-бromo-2-(4-метоксибензилиден)имидазо[1,2-*a*]пиридин-3(2H)-он (33 мг, 0.1 ммоль), фенилбороновой кислоты пинаколовый эфир (54 мг, 0.26 ммоль) и CsCO<sub>3</sub> (163 мг, 0.5 ммоль). Колбу вакуумировали, заполнили аргоном и добавляли PhMe (2 мл) и Pd(Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub> (12 мг, 0.01 ммоль). Смесь выдерживали 4 ч при 75°C, затем добавляли CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 мл) и промывали водой (2 × 80 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Продукт очищали флеш-хроматографией (элюент – хлороформ).

Выходы реакций, температуры плавления и спектральные характеристики синтезированных соединений (II–V) приведены в дополнительных материалах.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированы новые производные хромофора белка Kaede – (Z)-2-(4-метоксибензилиден)-6/8-фенилимидазо[1,2-*a*]пиридин-3(2H)-оны. Установлено, что оптические свойства этих соединений не зависят от положения фенильного заместителя в имидазопиридиновом фрагменте, что, вероятно, объясняется неполным сопряжением с  $\pi$ -системой молекулы.

Новые соединения могут быть использованы в качестве флуорогенных красителей, поскольку они, как и многие производные хромофоров флуоресцентных белков, обладают слабой флуоресценцией.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

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

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранов М.С., Лукьянов К.А., Ямпольский И.В. // Биоорг. химия. 2013. Т. 39. С. 255–276. [Baranov M.S., Lukyanov K.A., Yampolsky I.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2013. V. 39. P. 223–244.] <https://doi.org/10.1134/S1068162013030047>

2. *Baleeva N.S., Baranov M.S.* // Chem. Heterocycl. Compd. 2016. V. 52. P. 444–446.  
<https://doi.org/10.1007/s10593-016-1909-4>
3. *Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A.* // Physiological Rev. 2010. V. 90. P. 1103–1163.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2009>
4. *Chuang W.-T., Chen B.-S., Chen K.-Y., Hsieh C.-C., Chou P.-T.* // Chem. Commun. 2009. V. 45. P. 6982–6984.  
<https://doi.org/10.1039/b908542d>
5. *Feng G., Luo C., Yi H., Yuan L., Lin B., Luo X., Hu X., Wang H., Lei C., Nie Z., Yao S.* // Nucl. Acids Res. 2017. V. 45 P. 10380–10392.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx803>
6. *Singh A., Rajbongshi B.K., Ramanathan G.* // J. Chem. Sci. 2015. V. 127. P. 941–948.  
<https://doi.org/10.1007/s12039-015-0855-5>
7. *Muselli M., Baudequin C., Perrio C., Hoarau C., Bischoff L.* // Chem. Eur. J. 2016. V. 22. P. 5520–5524.  
<https://doi.org/10.1002/chem.201600602>
8. *Shen B., Qian Y.* // Dyes Pigm. 2019. V. 166. P. 350–356.  
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.03.034>
9. *Baleeva N.S., Myannik K.A., Yampolsky I.V., Baranov M.S.* // Eur. J. Org. Chem. 2015. V. 26. P. 5716–5721.  
<https://doi.org/10.1002/ejoc.201500721>
10. *Bozhanova N.G., Baranov M.S., Baleeva N.S., Gavrikov A.S., Mishin A.S.* // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. P. 3778.  
<https://doi.org/10.3390/ijms19123778>
11. *Зайцева С.О., Зайцева Э.Р., Смирнов А.Ю., Балеева Н.С., Баранов М.С.* // Биоорг. химия. 2020. Т. 46. С. 106–109. [*Zaitseva S.O., Zaitseva E.R., Smirnov A.Yu., Baleeva N.S., Baranov M.S.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 120–123.]  
<https://doi.org/10.1134/S1068162020010136>
12. *Myasnyanko I.N., Gavrikov A.S., Zaitseva S.O., Smirnov A.Yu., Zaitseva E.R., Sokolov A.I., Malyshchinskaya K.K., Baleeva N.S., Mishin A.S., Baranov M.S.* // Chem. Eur. J. 2020. V. 27. P. 3986–3990.  
<https://doi.org/10.1002/chem.202004760>

## Study of the Position of the Conjugated Substitute Influence on the Optical Properties of the Kaede Protein Chromophorus Derivatives

I. N. Myasnyanko<sup>\*, \*\*</sup>, N. S. Baleeva<sup>\*, \*\*, #</sup>, and M. S. Baranov<sup>\*, \*\*</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (926) 704-13-72; e-mail: [nsbaleeva@gmail.com](mailto:nsbaleeva@gmail.com)

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

<sup>\*\*</sup>*Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovitianova 1, Moscow, 117997 Russia*

We report novel derivatives of chromophore of the fluorescent protein Kaede – (*Z*)-2-(4-methoxybenzylidene)-6/8-phenylimidazo[1,2-*a*]pyridine-3(2*H*)-ones. The introduced of phenyl substituent in the 6- and 8-position of the imidazopyridinone fragment does not leads to a shift absorption and emission spectra.

*Keywords: imidazolones, chromophores, fluorescent protein Kaede, fluorescence*