СОДЕРЖАНИЕ

Том 47, номер 5, 2021

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

Бесфосфорные липиды – новые прототипы противоопухолевых лекарств (обзорная статья)

Е. А. Варламова, А. К. Исагулиева, Н. Г. Морозова, Е. В. Шмендель, М. А. Маслов, А. А. Штиль 539

Участие липидов в реализации специфических функций центральной нервной системы (обзорная статья)

О. В. Галкина, О. В. Ветровой, Н. Д. Ещенко 555

Зазеркалье биотехнологии: D-белки как объекты патентной охраны (дискуссия)

И. Б. Никитина, И. В. Горетова, И. В. Федосеев 566

Влияние состава липосом на доставку плазмидной ДНК в эукариотические клетки

А. А. Михеев, Е. В. Шмендель, Г. В. Назаров, М. А. Маслов 573

Энантиомеры *втор*-бутилдодецен-2-оата как половые аттрактанты

К. А. Ефетов, Е. Е. Кучеренко 583

Моделирование регуляции уровня простагландинов нестероидными противовоспалительными препаратами в открытых системах

А. В. Кривошей, А. А. Ефремов, Е. К. Матвейшина, В. В. Панова, П. В. Вржещ 593

Получение и характеристика генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров внеклеточного pH

А. Н. Орса, А. С. Горященко, О. В. Серова, А. А. Можаев, В. И. Мартынов, А. А. Пахомов, Е. В. Свирщевская, А. Г. Петренко, И. Е. Деев 603

Генно-инженерный синтез и свойства гиспидин-3-гидроксилазы – ключевого фермента биосинтеза люциферина грибов

А. С. Герасимов, С. О. Рогожкин, Е. С. Шахова, Т. В. Чепурных, А. Ю. Гороховатский, Н. М. Мышкина, А. В. Балакирева, И. В. Ямпольский 610

Внутриклеточная локализация и механизмы фотодинамического действия диметилового эфира 13^1-[2-(гуанидинил)этиламино]хлорина e_6

А. В. Ефременко, Е. Д. Дьякова, П. В. Островерхов, Н. С. Кирин, А. Ф. Миронов, М. А. Грин, А. В. Феофанов 622

Влияние экспериментальных конъюгатов антигенов БЦЖ и дериватов бетулина на иммунные реакции у морских свинок

И. Н. Кошкин, В. С. Власенко, И. В. Кулаков 632

ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

Cy5-меченый фосфатидилхолин

Ю. А. Грачёва, Д. С. Третьякова, О. Г. Замышляева, Е. С. Кудряшова, Е. Л. Водовозова, А. Ю. Федоров, И. А. Болдырев 642

Тиофеновый аналог хромофора GFP как флуороген для белка FAST

Н. С. Балеева, А. Ю. Смирнов, И. Н. Мяснянко, А. С. Гавриков, М. С. Баранов 647

Мультиплексная ПЦР на чипе с прямой детекцией удлинения иммобилизованного праймера

С. А. Лапа, Е. С. Клочихина, Р. А. Мифтахов, А. С. Заседателев, А. В. Чудинов 652

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 5, с. 539–554

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

УДК 547.426.2:615.277.3

БЕСФОСФОРНЫЕ ЛИПИДЫ – НОВЫЕ ПРОТОТИПЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛЕКАРСТВ[1]

© 2021 г. Е. А. Варламова*, А. К. Исагулиева, Н. Г. Морозова***,[#], Е. В. Шмендель***, М. А. Маслов***, А. А. Штиль***

**ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина", Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24*

***ФГБНУ "Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе", Россия, 119021 Москва, ул. Большая Пироговская, 11, стр. 1*

****Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова, МИРЭА – Российский технологический университет, Россия, 119571 Москва, просп. Вернадского, 86*

Поступила в редакцию 26.03.2021 г.
После доработки 05.04.2021 г.
Принята к публикации 07.04.2021 г.

Основные классы противоопухолевых препаратов (антиметаболиты, антрациклины, таксаны и алкилирующие агенты) действуют путем разрушения клеточной ДНК, предотвращения синтеза ДНК и/или нацеливания на микротрубочки. Фосфорсодержащие алкильные глицеролипиды вызывают гибель опухолевых клеток различного тканевого происхождения, не воздействуя на ДНК и при меньшем повреждении неопухолевых клеток. Однако недостаток данных соединений – способность нарушать целостность эритроцитов (гемолиз). Кроме того, фосфорсодержащие глицеролипиды могут подвергаться гидролизу под действием внутриклеточных фосфолипаз. Этими обстоятельствами обусловлена необходимость поиска новых противоопухолевых соединений в ряду бесфосфорных аналогов липидной природы. В обзоре рассматриваются бесфосфорные катионные и нейтральные глицеролипиды. Бесфосфорные глицеролипиды сохраняют антипролиферативные и цитотоксические свойства фосфорсодержащих глицеролипидов, а также бесфосфорные аналоги не вызывают гемолиз. Особое внимание уделено новым классам положительно заряженных и нейтральных гликоглицеролипидов, а также поликатионным глицеролипидам. Анализ взаимосвязи "структура–активность" обосновывает выбор модификаций бесфосфорных глицеролипидов для разработки новых кандидатов в лекарственные средства.

Ключевые слова: противоопухолевые липиды, эдельфозин, опухолевые клетки, гибель клеток

DOI: 10.31857/S0132342321050353

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественные новообразования – одна из основных причин смертности в России и мире. Эффективность противоопухолевой терапии остается недостаточно высокой [1] по причине незначительной селективности соединений, развития лекарственной устойчивости опухолевых клеток [2, 3], повышенной гидрофобности [4, 5] и низкой эффективности доставки препаратов в опухоль [6, 7], серьезных побочных эффектов и др. [8, 9]. С целью решения вышеперечисленных проблем актуальной задачей является оптимизация структуры химических соединений – кандидатов в лекарственные средства. В настоящем обзоре анализируются химические классы синтетических липидов – перспективных соединений, не получивших требуемое внимание исследователей.

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА ЛИПИДОВ

Исследования противоопухолевых свойств липидов начались во второй половине XX века, когда обнаружили, что небольшие количества природного фосфолипида 2-лизофосфатидилхолина (соединение (**I**), рис. 1) существенно увеличивают фагоцитарную активность макрофагов [10]. Это означало, что соединение (**I**) может играть активную роль в механизмах защиты организма. Однако фосфолипид (**I**) нестабилен и быстро

[1] Статья публикуется по материалам доклада, представленного на конференции "Липиды 2021" (Москва, 11–13 октября 2021 г.).

Сокращения: GAELs – гликозилированные противоопухолевые алкильные липиды; IC_{50} – 50%-ная рост-ингибирующая концентрация; PAF – фактор активации тромбоцитов.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (916) 491-62-70, эл. почта: ngmoroz@mail.ru).

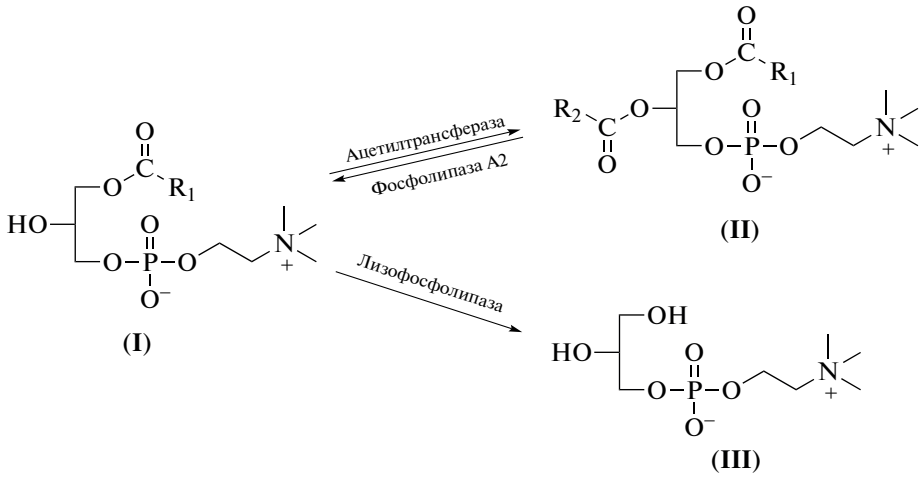


Рис. 1. Превращение 2-лизофосфатидилхолина (**I**) в фосфатидилхолин (**II**) или глицерофосфохолин (**III**).

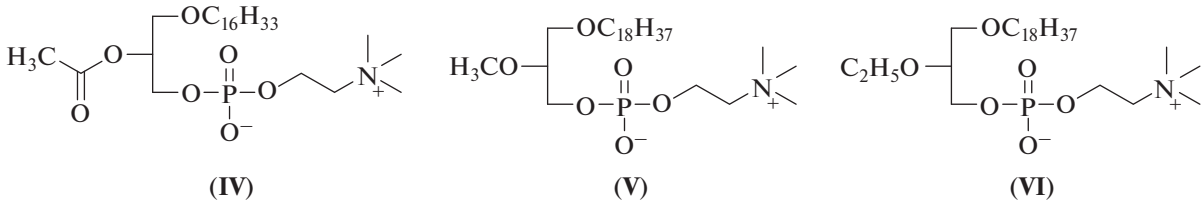


Рис. 2. Структурная формула фактора активации тромбоцитов (**IV**), эдельфозина (**V**) и его структурного аналога (**VI**).

трансформируется в фосфатидилхолин (**II**) или глицерофосфохолин (**III**) под действием ацетилтрансферазы или лизофосфолипазы, что не позволило использовать соединение (**I**) как лекарственное средство [11].

Установление структуры фактора активации тромбоцитов (PAF, соединение (**IV**), рис. 2) стало важным шагом для поиска новых противоопухолевых соединений. В эндотелиальных клетках соединение (**IV**) индуцирует подвижность, экспрессию молекул адгезии, способствует разрушению внеклеточного матрикса, миграции клеток и неоангиогенезу [12]. Активация рецепторов PAF индуцирует антиапоптотические факторы, способствуя выживанию опухолевых клеток [13, 14]. Предполагают, что сочетание антагонистов PAF-рецепторов с химиотерапией может быть перспективным для терапии опухолей [15]. Немало соединений липидной природы имеют структурную схожесть с соединением (**IV**), что объясняет возможность разработки противоопухолевых агентов на основе тех или иных липидов.

Исследования биологической активности синтетических и природных аналогов PAF показали, что различные модификации типа связи в положении C1, а также заместителей в положениях C2 глицерина приводят к появлению у липидных аналогов PAF антагонистических свойств. Поскольку соединение (**IV**) вызывает сильную агрегацию тромбоцитов, его трудно использовать в практике [16]. Синтезировано большое количество структурных аналогов PAF, проявляющих противоопухолевые свойства благодаря воздействиям на различные механизмы: ингибирование клеточных ферментов, индукцию некроза, активацию эффекторов иммунитета, ограничение метастазирования [17, 18].

Биологическое действие PAF-подобных глицеролипидов с простой эфирной связью зависит от длины углеводородных заместителей, формирующих их гидрофобный домен. Замена ацетильной группы при C2-атоме глицерина на короткоцепную алкильную группу приводит к появлению противоопухолевых свойств [19]. Цвиттер-ионные фосфолипиды алкильного типа – структурные аналоги PAF – не обладают способностью агрегировать тромбоциты, но ингибируют пролиферацию опухолевых клеток и вызывают их гибель. Эти липиды обладают противоопухолевым, противовирусным и антибактериальным действием и, в отличие от многих противоопухолевых лекарственных агентов, не вызывают серьезных побочных эффектов, за исключением гемолиза [20–22].

Дальнейшие разработки привели к синтезу 1-*O*-октадецил-2-*O*-метил-3-глицерофосфохолина

(ET-18-OCH_3, эдельфозин, соединение (**V**), рис. 2), который показал более высокую противоопухолевую активность, чем соединение (**I**) [23]. Последующие исследования подтвердили, что эдельфозин и родственные алкиллизофосфолипиды обладают потенциальной противоопухолевой активностью [17, 24]. Эдельфозин был первым успешным глицерофосфолипидом после PAF (**IV**), проявляющим активность в микромолярных концентрациях, и дошел до II фазы клинических испытаний, он стал считаться "золотым стандартом" среди противоопухолевых липидов. Необходимо отметить, что первоначально не был определен механизм действия эдельфозина, из-за его сходства с соединением (**IV**) наиболее вероятными мишенями считали PAF-рецепторы. Позднее было показано, что добавление эдельфозина к клеткам HL60 с низким уровнем экспрессии PAF-рецепторов вызывает апоптоз [25], в то время как инкубация эдельфозин-чувствительных клеток с соединением (**IV**) не приводила к апоптозу [26].

Эдельфозин – первый противоопухолевый агент, взаимодействующий с липидными рафтами на периферии клеток [27, 28]. Он накапливается в эндоплазматическом ретикулуме, что вызывает особую форму стрессового ответа и апоптоз, а также ингибирует синтез фосфатидилхолина путем инактивации фосфохолинцитидилтрансферазы [29, 30], обладает некоторой избирательностью действия и менее токсичен для неопухолевых клеток [17, 31, 32]. Селективность цитотоксического действия эдельфозина объясняется тем, что в трансформированных клетках увеличивается скорость эндоцитоза [33, 34].

Замена метильной группы на этильную при C2-атоме глицерина эдельфозина значительно уменьшает цитотоксический эффект (табл. 1, [19]; соединение (**VI**), рис. 2).

Эдельфозин обладает высокой гемолитической активностью [19], имеет относительно низкую биодоступность (<10% при однократном введении) и малую скорость выведения из организма [35]. Эти факторы обусловили поиск более эффективных структурных аналогов эдельфозина [36, 37]. Поиск менее гемотоксичных, более стабильных и не менее активных аналогов эдельфозина продолжается. Синтезированы положительно заряженные и нейтральные липиды, среди которых выделяются глицеролипиды, гликоглицеролипиды и поликатионные глицеролипиды (глицерополиамины) (схема 1).

Схема 1. Классификация противоопухолевых липидов.

Побочные эффекты эдельфозина и его аналогов определяют необходимость разработки новых способов доставки соединений для улучшения биодоступности. При парентеральном введении достигается быстрое распределение в органах [38], однако из-за гематотоксичности фосфорсодержащих глицеролипидов приходиться ограничивать их дозы. Пероральное введение соединения (**V**) обеспечивает необходимую концентрацию в плазме крови только при многократном применении [35]. Подкожное введение и поверхностное [39] нанесение глицеролипидов также не обеспечивают эффективную концентрацию в плазме, однако в отдельных случаях используют-

Таблица 1. Цитотоксичность (IC_{50}) фосфорсодержащих и бесфосфорных положительно заряженных глицеролипидов

Соединение	IC_{50}, мкМ					
	K562	HL60	HCT116	B16	SKOV-3	MCF-7
Фосфорсодержащие глицеролипиды						
Эдельфозин (**V**)	4.2 ± 0.3	2.0 ± 0.2	0.8 ± 0.1	6.0 ± 0.7	3.4 ± 0.2	6.5 ± 0.5
(**VI**)	8.0 ± 0.3	16.0 ± 0.7	12 ± 0.7	15.0 ± 0.4	n.d.	n.d.
Бесфосфорные положительно заряженные глицеролипиды						
(**XIIa**)	n.d.	17.2 ± 1.3	14.3 ± 0.3	36.2 ± 1.7	40.0 ± 1.8	>50
(**XIIb**)	n.d.	17.3 ± 0.9	14.5 ± 0.4	41.0 ± 2.1	35.2 ± 0.9	>50
(**XIIc**)	n.d.	28.0 ± 1.2	15.0 ± 0.8	>50	42.5 ± 1.9	>50
(**XIId**)	n.d.	4.8 ± 0.4	12.8 ± 0.2	16.1 ± 0.7	12.8 ± 0.8	10.9 ± 1.3
(**XIIe**)	n.d.	3.8 ± 0.6	10.8 ± 0.3	14.1 ± 0.5	8.0 ± 0.5	20.4 ± 0.6
(**XIIf**)	n.d.	4.9 ± 0.6	11.5 ± 0.4	14.8 ± 0.4	8.9 ± 0.7	30.0 ± 1.0
(**XIIg**)	n.d.	4.9 ± 0.3	14.7 ± 0.5	16.2 ± 0.5	9.9 ± 0.4	14.8 ± 0.7
Бесфосфорные положительно заряженные гликоглицеролипиды						
(**XIIIa**)	5.0 ± 0.4	n.d.	0.5 ± 0.2	n.d.	n.d.	n.d.
(**XIIIb**)	12.0 ± 0.3	n.d.	4.0 ± 0.5	n.d.	n.d.	n.d.
(**XIVa**)	9.0 ± 0.3	7.0 ± 0.5	9.0 ± 0.7	n.d.	n.d.	n.d.
(**XIVb**)	11.0 ± 0.4	n.d.	3.0 ± 0.7	n.d.	n.d.	n.d.
(**XVa**)	7.0 ± 0.6	5.0 ± 0.3	5.0 ± 0.3	5.0 ± 0.7	n.d.	n.d.
(**XVb**)	8.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5	4.0 ± 0.7	7.0 ± 0.4	n.d.	n.d.
(**XVIa**)	18.0 ± 0.6	18.0 ± 0.6	22.0 ± 0.5	29.0 ± 1.1	n.d.	n.d.
(**XVIb**)	36.0 ± 1.2	n.d.	16.0 ± 0.7	16.0 ± 1.2	n.d.	n.d.
(**XVIc**)	41.0 ± 0.7	n.d.	17.0 ± 0.5	13.0 ± 0.9	n.d.	n.d.
Бесфосфорные поликатионные глицеролипиды						
(**XVIIa**)	2.06 ± 0.11	n.d.	4.23 ± 0.12	n.d.	1.83 ± 0.05	1.99 ± 0.36
(**XVIIb**)	3.20 ± 0.16	n.d.	11.60 ± 0.58	n.d.	n.d.	2.70 ± 0.13
(**XVIIc**)	2.25 ± 0.25	n.d.	3.83 ± 0.07	n.d.	4.88 ± 0.02	1.86 ± 0.31
(**XVIId**)	2.01 ± 0.13	n.d.	2.97 ± 0.19	n.d.	2.36 ± 0.47	1.93 ± 0.48
(**XVIIe**)	2.07 ± 1.12	n.d.	3.21 ± 0.22	n.d.	1.87 ± 0.35	1.94 ± 0.12
(**XVIIf**)	1.89 ± 0.05	n.d.	3.29 ± 0.03	n.d.	2.29 ± 0.27	1.82 ± 0.41
(**XVIIg**)	2.40 ± 0.12	n.d.	8.10 ± 0.41	n.d.	n.d.	5.80 ± 0.29
(**XVIIh**)	2.18 ± 0.30	n.d.	3.33 ± 0.14	n.d.	2.53 ± 0.42	2.02 ± 0.44
(**XVIIi**)	1.85 ± 0.34	n.d.	1.64 ± 0.02	n.d.	1.63 ± 0.004	1.28 ± 0.24

Примечание: K562 – хронический миелоидный лейкоз, HL60 – лимфоцитарный лейкоз, HCT116 – аденокарцинома толстой кишки, B16 – меланома мыши, SKOV-3 – аденокарцинома яичника, MCF-7 – рак молочной железы; n.d. – нет данных.

ся для терапии кожных метастазов и минимизации системных побочных эффектов [40]. Современные подходы к улучшению биодоступности и доставки глицеролипидов включают использование липидных наночастиц [41–43]. Помимо улучшения биодоступности, при инкапсуляции соединения (**V**) в липидные наночастицы удалось преодолеть резистентность клеток лейкоза к эдельфозину [39].

В обзоре приведена классификация фосфорсодержащих и бесфосфорных липидов с противоопухолевой активностью (схема 1), обоснованы структурные модификации различных липидов и проанализированы механизмы их действия.

Первичный анализ активности проводился нами с использованием МТТ-теста, в котором оценивали цитотоксичность соединения для опухолевых и неопухолевых клеток. Глицеролипиды добавляли к клеткам в конечных концентрациях 0.1–50.0 мкМ. После 72-часовой инкубации жизнеспособные клетки восстанавливали тетразолиевую соль (реагент МТТ) в нерастворимый фор-

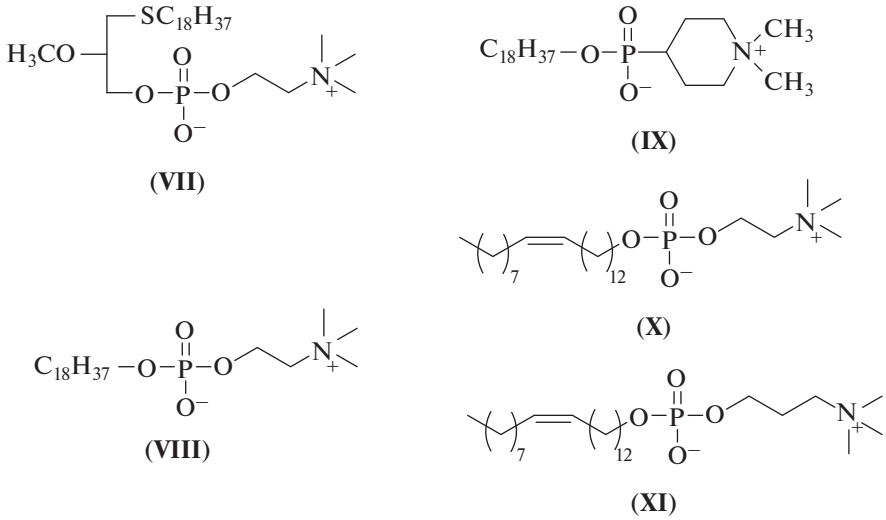


Рис. 3. Фосфорсодержащие противоопухолевые липиды: илмофозин (**VII**), милтефозин (**VIII**), перифозин (**IX**), эруцилфосфохолин (**X**) и эруфозин (**XI**).

мазан; количество последнего (по поглощению света длиной волны 575 нм) определяли в колориметрической реакции. Цитотоксичность соединений рассчитывали как 50%-ные рост-ингибирующие концентрации (IC_{50}), сравнивая степени поглощения света формазаном в клетках, обработанных соединениями, и в интактных (контрольных) клетках. В наших исследованиях соединения со значением $IC_{50} > 20–50$ мкМ для опухолевых линий не представляли интереса. Цитотоксичность $IC_{50} \leq 20$ мкМ считали условным порогом для дальнейших испытаний.

АНАЛОГИ ЭДЕЛЬФОЗИНА

Тиоэфирный вариант эдельфозина – илмофозин (соединение (**VII**), рис. 3) – продемонстрировал цитотоксичность *in vitro* и *in vivo* [44]; в клинических испытаниях илмофозин не показал активность у пациентов и вызывал схожие с эдельфозином побочные эффекты [45]. Аналогичная ситуация наблюдалась для милтефозина (гексадецилфосфохолин, соединение (**VIII**)), хотя в доклинических испытаниях он показывал более высокую по сравнению с соединением (**V**) биодоступность и накопление в плазме крови [46]. При этом милтефозин в значительной степени метаболизируется фосфолипазами до неактивных метаболитов и токсичен при пероральном и внутривенном введении [47]. Однако соединение (**VIII**), в отличие от эдельфозина (**V**), введено в клиническую практику для лечения отдельных опухолей (лимфома кожи, поверхностные метастазы рака молочной железы) и лейшманиоза [48]. Замена холиновой части в милтефозине на гетероциклический пиперидин (перифозин, соединение (**IX**)) привела к расширению круга чувствительных опухолевых клеток и к благоприятной фармакокинетике: перифозин (**IX**) всасывается из желудочно-кишечного тракта в течение 24 ч и не подвергается метаболическим превращениям. Максимальное накопление в опухоли достигается через 48 ч [49, 50]. Эти данные позволяют использовать перифозин (**IX**) для перорального применения, как и милтефозин (**VIII**). Известно, что перифозин (**IX**), как и эдельфозин (**V**), вызывает апоптоз и селективен к миеломе [31]. Эруцилфосфохолин (**X**) и его гомолог эруфозин (**XI**) активны против опухолей головного мозга [51, 52].

Серьезные недостатки эдельфозина и его фосфорсодержащих аналогов – гидролиз под действием фосфолипаз и выраженный гемолитический эффект – положили начало структурно-функциональным исследованиям бесфосфорных липидов.

БЕСФОСФОРНЫЕ ПОЛОЖИТЕЛЬНО ЗАРЯЖЕННЫЕ ЛИПИДЫ

Поиск перспективных бесфосфорных аналогов эдельфозина предусматривал варьирование гидрофобных и гидрофильных структурных доменов. Все рассматриваемые далее бесфосфорные липиды можно условно подразделить на три основных типа (рис. 4): 1) положительно заряженные глицеролипиды (рис. 4*а*); 2) положительно заряженные гликоглицеролипиды (рис. 4*б*); 3) поликатионные глицеролипиды (рис. 4*в*).

Для каждой группы проводились структурно-функциональные исследования, в ходе которых выявлялся вклад отдельных доменов в цитоток-

сичность. Анализ зависимости активности от структуры в значительной степени осложняется тем, что разные по природе злокачественные клетки сильно различаются по чувствительности к “липидотерапии”. При этом увеличение токсичности, вызванное изменением структуры липида, иногда приводит к снижению селективности действия.

Положительно заряженные глицеролипиды. В результате многолетних структурно-функциональных исследований разработан класс бесфосфорных аналогов эдельфозина – алкильные катионные глицеролипиды [53]. Эти соединения разнообразны по структуре; общее – наличие положительно заряженной “головки” и гидрофобных заместителей, размещенных на глицериновой матрице (рис. 4*a*). Различают глицеролипиды с катионной “головкой”, присоединенной к глицериновому фрагменту непосредственно или через спейсерную группу.

Анализ взаимосвязей “структура–активность” показал, что длина цепи заместителей при атомах C1 и C2 глицерина, тип катионной “головки” и наличие спейсерной группы, отделяющей ее от глицеринового фрагмента, оказывают значительное влияние на активность липида [19, 54]. Для цитотоксической активности существенным оказывается наличие в структуре алкильных катионных глицеролипидов следующих фрагментов [19]: 1) длинноцепного алкильного заместителя в C1-положении глицеринового остова (14–19 атомов углерода); 2) короткоцепного алкильного заместителя в C2-положении (1–2 атома углерода); 3) катионной “головки”, представленной гетероциклическими и алифатическими аминами с набором различных функциональных групп и присоединенной непосредственно к C3-атому глицеринового остова или через спейсерную группу ацильного типа.

Механизм действия катионных алкильных глицеролипидов до конца не изучен, хотя предполагается, что он включает эндоцитоз и попадание глицеролипидов в ранние эндосомы [55]. Установлено, что противоопухолевые глицеролипиды способны встраиваться в мембраны злокачественных клеток, вызывая биофизические (изменение текучести плазматической мембраны) и биохимические изменения, приводя к лизису клетки [56].

Основная причина особого внимания к бесфосфорным катионным глицеролипидам алкильного типа состоит в том, что они оказывают лишь незначительное отрицательное воздействие на неопухолевые клетки (в т.ч. клетки крови), что делает эти соединения безопасными [57].

Получены и исследованы новые катионные глицеролипиды с различными алифатическими или гетероциклическими аминами. Представленные в табл. 1 данные для бесфосфорных глицеролипидов (рис. 4*a*) свидетельствуют о том, что клетки линии аденокарциномы толстой кишки HCT116 чувствительны ко всем липидам (**XIIa–XIIg**) [36, 53, 57]. Наиболее высокую активность проявили соединения с метилимидазолиевой (**XIIe**) и этилимидазолиевой (**XIIf**) катионными головками. Значения показателей IC_{50} для остальных исследуемых соединений не превышали 20 мкМ.

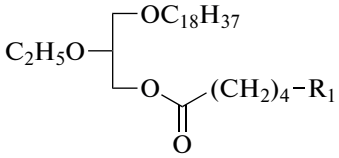
Линия клеток аденокарциномы яичника SKOV-3 оказалась в меньшей степени подвержена действию соединений (**XIIa–XIIc**). Приемлемые результаты показали липиды с пиридиниевым (**XIId**), метилимидазолиевым (**XIIe**), этилимидазолиевым (**XIIf**) и диметил-2-гидроксиэтиламониевым (**XIIg**) фрагментами (IC_{50} не превышают 13 мкМ). Значения показателей IC_{50} для остальных соединений составляли более 35 мкМ, что указывает на незначительный цитотоксический эффект этих соединений для линии SKOV-3.

Для самой устойчивой к тестируемым липидам линии аденокарциномы молочной железы MCF-7 значимый цитотоксический эффект был достигнут при действии липидов с пиридиниевой (**XIId**) и диметил-2-гидроксиэтиламониевой (**XIIg**) полярными головками. Для остальных бесфосфорных соединений IC_{50} составляла более 20 мкМ. Для MCF-7 липиды с имидазолиевой группой в полярном домене (**XIIe**, **XIIf**) оказались малотоксичными, а липиды с метилпиперидиниевой (**XIIa**), метил-4-гидроксипиперидиниевой (**XIIb**) и метилморфолиниевой (**XIIc**) группами не вызывали гибель 50% клеток в интервале используемых концентраций (0.1–50.0 мкМ).

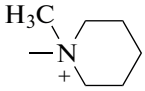
На клетках линии B16 (меланома мыши) липиды с гетероциклическими пиридиниевой (**XIId**), метилимидазолиевой (**XIIe**), этилимидазолиевой (**XIIf**) и диметил-2-гидроксиэтиламониевой (**XIIg**) головками оказались более токсичными, чем соединения с метилпиперидиниевой (**XIIa**), метил-4-гидроксипиперидиниевой (**XIIb**) и метилморфолиниевой (**XIIc**) катионными головками.

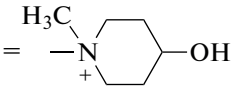
В отличие от перечисленных адгезионных культур, для суспензионных (лейкоз) клеток (линия HL60) все исследованные липиды, кроме соединений с метилпиперидиниевой (**XIIa**), метил-4-гидроксипиперидиниевой (**XIIb**) и особенно с метилморфолиниевой (**XIIc**) группами, оказали выраженный цитотоксический эффект, незначительно превышающий цитотоксичность эдельфозина (**V**). Наиболее активным для линии HL60 оказалось соединение с метилимидазолиевой (**XIIe**) гетероциклической головкой. Установлено, что наличие четвертичной аммониевой группы необходимо для проявления активности, а наличие гидроксильной группы в катионной головке, напротив, несколько снижает цитотоксичность соедине-

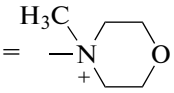
(*а*) Бесфосфорные положительно заряженные глицеролипиды

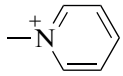


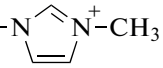
(**XIIa**–**XIIg**)

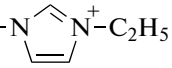
(**XIIa**): R_1 = 

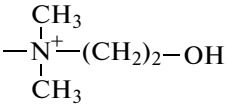
(**XIIb**): R_1 = 

(**XIIc**): R_1 = 

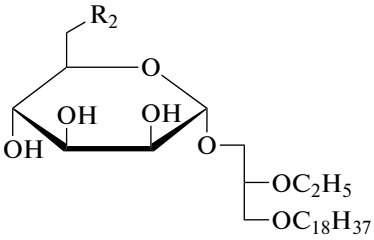
(**XIId**): R_1 = 

(**XIIe**): R_1 = 

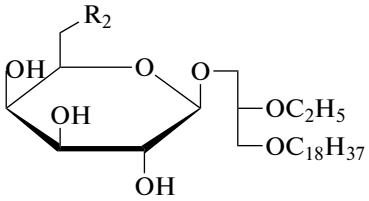
(**XIIf**): R_1 = 

(**XIIg**): R_1 = 

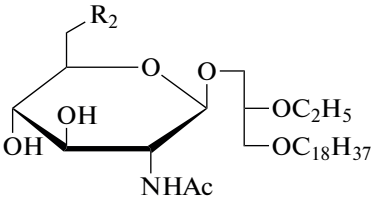
(*б*) Бесфосфорные положительно заряженные гликоглицеролипиды



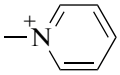
(**XIIIa**, **XIIIb**)

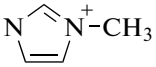


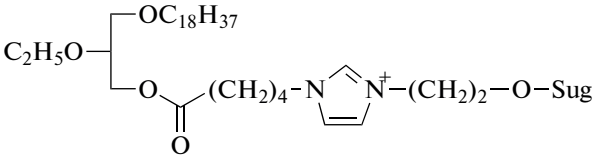
(**XIVa**, **XIVb**)



(**XVa**, **XVb**)

(**XIIIa**, **XIVa, XVa**): R_2 = 

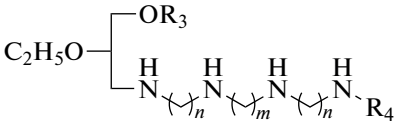
(**XIIIb**, **XIVb, XVb**): R_2 = 



(**XVIa**–**XVIc**)

(**XVIa**): Sug = β-D-Gal
(**XVIb**): Sug = α-D-Man
(**XVIc**): Sug = β-D-Glc

(*в*) Бесфосфорные поликатионные глицеролипиды



(**XVIIa**–**XVIIi**)

(**XVIIa**): $R_3 = C_{16}H_{33}$, R_4 = H, $n = 3$, $m = 4$
(**XVIIb**): $R_3 = C_{18}H_{37}$, R_4 = H, $n = 3$, $m = 4$
(**XVIIc**): $R_3 = C_{10}H_{21}$, R_4 =Et, $n = 3$, $m = 4$
(**XVIId**): $R_3 = C_{12}H_{25}$, R_4 = Et, $n = 3$, $m = 4$
(**XVIIe**): $R_3 = C_{14}H_{29}$, R_4 = Et, $n = 3$, $m = 4$
(**XVIIf**): $R_3 = C_{16}H_{33}$, R_4 = Et, $n = 3$, $m = 4$
(**XVIIg**): $R_3 = C_{18}H_{37}$, R_4 = Et, $n = 3$, $m = 4$
(**XVIIh**): $R_3 = C_{18}H_{37}$, R_4 = H, $n = 3$, $m = 3$
(**XVIIi**): $R_3 = C_{18}H_{37}$, R_4 =Et, $n = 3$, $m = 3$

Рис. 4. Бесфосфорные положительно заряженные глицеролипиды.

ний. На линии K562 исследования для данной группы соединений не проводились.

Изучение действия на неопухолевые клетки (фибробласты) показало, что 50%-ная гибель клеток наступает при действии липидов (**XIId**–**XIIg**) в концентрациях, превышающих 25 мкМ [53]. Слабое воздействие на фибробласты может свидетельствовать об избирательности бесфосфорных алкильных глицеролипидов к опухолевым клеткам. Это важное свойство выгодно отличает указанный хемотип от эдельфозина (**V**) [53].

Положительно заряженные гликоглицеролипиды. Гликозилированные противоопухолевые алкильные липиды (GAELs) представляют собой класс синтетических противоопухолевых липидов, в котором сахарный остаток заменяет фосфохолиновый фрагмент эдельфозина (**V**). GAELs – гликолипиды с выраженной цитотоксичностью для ряда опухолевых моделей [58, 59]. Особенности этих соединений включают апоптоз-независимый механизм гибели клеток и способность элиминировать стволовые клетки опухоли. Цитотоксичность некоторых GAELs превосходит таковую наиболее изученного представителя негликозилированных алкильных липидов – эдельфозина (**V**) [60].

Детали молекулярных механизмов действия GAELs неизвестны. На стволовых опухолевых клетках показано, что GAELs вызывают неапоптотическую гибель, что делает эти соединения перспективными для преодоления лекарственной устойчивости [58, 59, 61, 62]. Гликозилированные липиды проникают в клетки рака молочной железы по механизму эндоцитоза и включаются в ранние эндосомы [55, 61]. GAELs предотвращают созревание эндоцитарных пузырьков, что приводит к образованию крупных кислых вакуолей (возможно, вследствие параптоза). По-видимому, в результате высвобождения катепсинов из вакуолей в цитозоль индуцируется гибель по механизму, отличающемуся от классического апоптоза [61].

Одним из оснований для изучения GAELs стало наблюдение, согласно которому определенные виды растений (например, овес) способны частично заменять фосфоглицеролипиды на гликоглицеролипиды (липиды на основе моно- или олигосахаридов) в условиях недостатка фосфора [63]. Это наблюдение предполагает, что глицеролипид, включающий углеводное звено, может имитировать фосфохолин-глицеролипиды за счет полярности углеводной группы [63].

Одно из направлений поиска новых противоопухолевых глицеролипидов – изменение взаиморасположения катионного домена, глицеринового остова и углеводного фрагмента (рис. 4*б*). Углеводное звено может размещаться в центре молекулы (**XIII**–**XV**) или занимать терминальное положение (**XVI**). В качестве углеводного фрагмента выступают остатки глюкозы, галактозы, маннозы и глюкозамина. Катионная головка представлена, как и в случае катионных глицеролипидов, гетероцикическими основаниями (рис. 4*б*) [64].

Из табл. 1 видно, что наибольшую активность на клетках K562 и HCT116 проявили гликолипиды, включающие маннозу с пиридиниевой катионной головкой (**XIIIa**) [64]. Маннозоглицеролипид с метилимидазолиевой катионной головкой (**XIIIb**), галактоглицеролипиды (**XIVa**, **XIVb**) и глюкозаминглицеролипиды (**XVa**, **XVb**) (приведены наши неопубликованные данные) показали хорошие результаты на линиях K562, HL60, HCT116 и B16. Значительно уступают им соединения с терминально расположенным углеводным остатком (**XVIa**–**XVIc**, рис. 4*б*) [64, 65]. Данное исследование указывает на целесообразность дальнейшей разработки GAELs, содержащих маннозу.

Поликатионные глицеролипиды. В качестве катионных доменов глицеролипидов предложено использовать полиамины с открытой или замещенной терминальной группой. Такой выбор объясняется структурой и биологическими свойствами полиаминов. В этот класс входят природные соединения путресцин, спермин и спермидин. Положительный заряд четырех аминогрупп позволяет спермину и спермидину взаимодействовать с отрицательно заряженными молекулами: нуклеиновыми кислотами, АТФ, фосфолипидами и белками [66, 67]. Бóльшая часть полиаминов находится именно в связанном с РНК состоянии [68]. Спермин и спермидин способны ремоделировать хроматин и, таким образом, воздействовать на экспрессию генов [69, 70]. Ингибирование ферментов, участвующих в биосинтезе и метаболизме полиаминов, с помощью антиметаболитов-миметиков, замедляет пролиферацию клеток. Так, ингибирование орнитиндекарбоксилазы добавлением α-дифторметилорнитина вдвое уменьшает уровень внутриклеточного спермина и снижает скорость пролиферации клеток [71].

Таким образом, использование полиаминов и их производных в качестве положительно заряженных заместителей в глицеролипидах перспективно для поиска новых противоопухолевых соединений [72]. Модифицированные полиамины исследуются в качестве ингибиторов систем транспорта полиаминов [73] и ферментов их биосинтеза [74–76]. В данном обзоре рассматриваются алкильные поликатионные глицеролипиды (рис. 4*в*), в которых катионный домен представлен остатком незащищенного или терминально алкилированного тетраамина.

Глицерополиамины (**XVIIa**–**XVIIi**) оказывают сильное цитотоксическое действие (IC_{50} < 6 мкМ) на опухолевые клетки различного тканевого происхождения, включая сублинию хронического

миелоидного лейкоза K562/4, устойчивую к доксорубицину и другим препаратам, транспортируемым P-гликопротеином (табл. 1), а также на неопухолевые эмбриональные фибробласты человека [77].

Анализируя влияние длины алкильного заместителя при C1 глицерина у глицерополиаминов (табл. 1), можно отметить, что для клеточных линий K562, HCT116, SKOV-3 и MCF-7 удлинение цепи с 10 (**XVIIc**) до 16 (**XVIIf**) атомов углерода незначительно влияет на изменение цитотоксичности (IC_{50} = 1.82–4.88 мкМ). Дальнейшее удлинение цепи до 18 углеродных атомов (**XVIIg**) уменьшает цитотоксичность (для линии SKOV-3 данные отсутствуют). Наличие этильной группы при терминальном атоме азота полиамина несколько уменьшает значение IC_{50}, т.е. повышает эффективность соединений (**XVIIc**–**XVIIg**, **XVIIi**). Этот эффект может быть связан с тем, что терминальная этильная группа предотвращает потенциальное ацилирование и дальнейшее окисление соединения, что повышает его устойчивость в клетках [78].

БЕСФОСФОРНЫЕ НЕЙТРАЛЬНЫЕ ГЛИКОГЛИЦЕРОЛИПИДЫ

Нейтральные гликоглицеролипиды не содержат катионной “головки”, однако сохраняют амфифильность за счет наличия гидрофильного углеводного звена. Этот хемотип представляет интерес для адресной доставки лекарств. Например, D-галактоза и D-манноза служат углеводными лигандами, распознаваемыми рецепторами печени и дендритных клеток [79–81].

Нейтральные гликоглицеролипиды содержат как алкильные, так и ацильные остатки, по-разному локализованные в глицериновом остове и углеводном фрагменте. Структурные домены – гликозильное звено и длинноцепные алкильные и ацильные остатки, размещенные на глицериновом скелете или на углеводном звене. Классификация этих липидов основывается на природе длинноцепных заместителей, их локализации на гликозилглицериновой матрице и удаленности углеводного звена от глицеринового остова. Таким образом, синтетические гликоглицеролипиды подразделяется на:

1) алкильные гликоглицеролипиды:

а) алкильные гликоглицеролипиды с углеводным фрагментом, непосредственно присоединенным к глицериновому остову;

б) алкильные гликоглицеролипиды с углеводным фрагментом, присоединенным через спейсерную группу;

2) ацильные гликоглицеролипиды;

3) комбинированные гликоглицеролипиды (содержат алкильные и ацильные остатки).

Алкильные гликоглицеролипиды. Нейтральные гликоглицеролипиды (GAELs) – ближайшие аналоги природных гликоглицеролипидов, обладающие высокой биодоступностью, что увеличивает их клиническую значимость. Было показано [55], что гибель клеток при действии GAELs не задействует классический апоптоз, что отличает их от бесфосфорных алкильных глицеролипидов. Кроме того, важное преимущество нейтральных GAELs – практически полное отсутствие гемолитической активности [82].

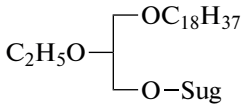
Алкильные гликоглицеролипиды с углеводным фрагментом, непосредственно присоединенным к глицериновому остову. Соединения (**XVIIIa**–**XVIIIf**) содержат в качестве углеводного фрагмента остатки D-маннозы, D-галактозы, D-глюкозамина, *N*-ацетил-D-глюкозамина, D-галактозамина и *N*-ацетил-D-галактозамина, присоединенные к C3-атому глицерина (рис. 5*a*). Соединения (**XVIIIa**, **XVIIIb**) продемонстрировали схожую цитотоксичность и избирательность к линии лейкоза K562 (табл. 2 [82]): у обоих соединений значения IC_{50} ниже в сравнении со значениями, полученными для других линий клеток, и ниже, чем соответствующие значения для эдельфозина (**V**) (см. табл. 1).

Соединения (**XVIIIc**–**XVIIIf**) – алкильные аминогликоглицеролипиды, содержащие остатки D-глюкозамина и D-галактозамина (**XVIIIc**, **XVIIIe**) или *N*-ацетил-D-глюкозамина и *N*-ацетил-D-галактозамина (**XVIIId**, **XVIIIf**) (для соединений (**XVIIId**, **XVIIIf**) приведены наши неопубликованные данные).

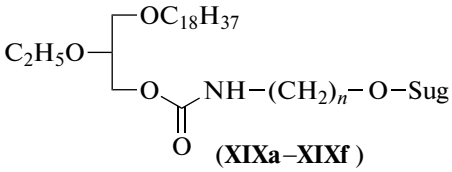
Глицеролипиды (**XVIIIc**–**XVIIIf**) оказывают схожее цитотоксическое действие на клетки линии K562 (IC_{50} находятся в диапазоне 4–8 мкМ). Наиболее активно соединение (**XVIIIe**) с остатком D-галактозамина, в то время как его ацетилированное производное (**XVIIIf**) проявляет меньшую активность. Ацетилирование аминогруппы и для глюко- (**XVIIId**), и для галактопроизводных (**XVIIIf**) приводит к снижению токсичности соединений. Соединения (**XVIIIc**) и (**XVIIIe**) оказались активнее для клеток MCF-7, чем остальные представители данной группы. На клеточных линиях HCT116 и SKOV-3 глицеролипиды (**XVIIIc**–**XVIIIf**) были менее активны, однако также показали схожие результаты (IC_{50} находятся в диапазоне 9–16 мкМ).

Алкильные гликоглицеролипиды с углеводным фрагментом, присоединенным через спейсерную группу. В соединениях (**XIXa**–**XIXf**) (рис. 5*a*) углеводный остаток присоединен к глицериновому звену с помощью спейсерных групп различной длины, что дает возможность проанализировать влияние удаленности углеводного фрагмента от диглицеридного остова на цитотоксические свойства нейтральных алкильных гликоглицеролипидов.

(*а*) Алкильные гликоглицеролипиды



(**XVIIIa**–**XVIIIf**)

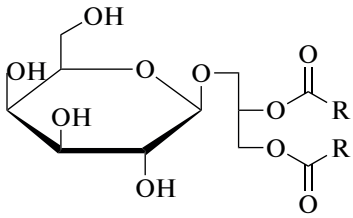


(**XIXa**–**XIXf**)

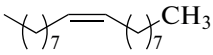
(**XVIIIa**): Sug = α-D-Man
(**XVIIIb**): Sug = β-D-Gal
(**XVIIIc**): Sug = β-D-GlcN
(**XVIIId**): Sug = β-D-GlcNAc
(**XVIIIe**): Sug = β-D-GalN
(**XVIIIf**): Sug = β-D-GalNAc

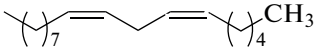
(**XIXa**): *n* = 2, Sug = α-D-Man
(**XIXb**): *n* = 2, Sug = β-D-Gal
(**XIXc**): *n* = 3, Sug = α-D-Man
(**XIXd**): *n* = 3, Sug = β-D-Gal
(**XIXe**): *n* = 4, Sug = α-D-Man
(**XIXf**): *n* = 4, Sug = β-D-Gal

(*б*) Ацильные гликоглицеролипиды

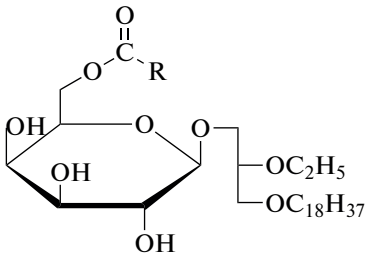


(**XXa**, **XXb**)

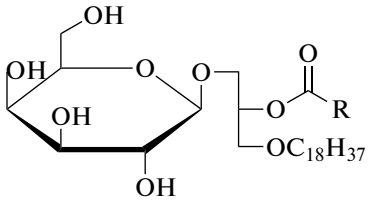
(**XXa**): R = 

(**XXb**): R = 

(*в*) Комбинированные гликоглицеролипиды

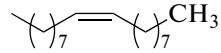


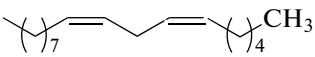
(**XXIa**–**XXIc**)



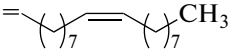
(**XXIIa** –**XXIIc**)

(**XXIa**): R = $C_{11}H_{23}$

(**XXIb**): R = 

(**XXIc**): R = 

(**XXIIa**): R = H

(**XXIIb**): R = 

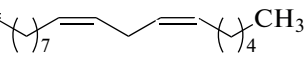
(**XXIIc**): R = 

Рис. 5. Бесфосфорные нейтральные глицеролипиды.

В сравнении с соединениями (**XVIIIa**, **XVIIIb**) [82] гликоглицеролипиды, содержащие спейсерную группу, оказались менее активны для линии K562 и не проявили избирательности. Соединение (**XIXa**) с остатком D-маннозы, присоединенным через диметиленовый спейсер, показало более высокую токсичность для неопухолевых клеток (IC_{50} = 12.5 ± 5.2 мкМ на фибробластах), чем его аналог с тетраметиленовым спейсером (**XIXe**) (IC_{50} > 50 мкМ).

Наилучшие результаты показало соединение (**XIXc**) с остатком D-маннозы, присоединенным через триметиленовый спейсер, на клеточных ли-

Таблица 2. Цитотоксичность (IC_{50}) нейтральных гликоглицеролипидов

Соединение	IC_{50}, мкМ					
	K562	HL60	HCT116	B16	SKOV-3	MCF-7
Алкильные гликоглицеролипиды с углеводным фрагментом, непосредственно присоединенным к глицериновому остову						
(XVIIIa)	3.0 ± 0.9	16.0 ± 0.9	15.0 ± 0.4	12.0 ± 0.7	12.0 ± 0.2	16.0 ± 0.7
(XVIIIb)	2.5 ± 0.9	n.d.	>50	13.5 ± 0.8	n.d.	n.d.
(XVIIIc)	6.0 ± 0.8	n.d.	11.0 ± 0.4	n.d.	13.1 ± 0.3	4.0 ± 0.4
(XVIIId)	8.0 ± 0.2	n.d.	10.1 ± 0.4	n.d.	12.0 ± 0.4	10.0 ± 0.6
(XVIIIe)	4.0 ± 0.6	n.d.	9.3 ± 0.4	n.d.	11.0 ± 0.4	3.0 ± 0.6
(XVIIIf)	7.1 ± 0.4	n.d.	15.1 ± 0.6	n.d.	16.0 ± 0.3	9.0 ± 0.4
Алкильные гликоглицеролипиды с углеводным фрагментом, присоединенным через спейсерную группу						
(XIXa)	34.0 ± 0.4	n.d.	16.1 ± 0.75	n.d.	15.2 ± 0.8	8.8 ± 1.1
(XIXb)	35.0 ± 0.5	17.0 ± 0.8	14.0 ± 0.9	16.0 ± 0.5	n.d.	n.d.
(XIXc)	18.0 ± 0.6	15.0 ± 0.5	8.0 ± 0.7	8.0 ± 0.6	n.d.	n.d.
(XIXd)	17.0 ± 0.5	17.0 ± 0.2	19.0 ± 0.4	15.0 ± 0.5	n.d.	n.d.
(XIXe)	36.0 ± 0.6	n.d.	39.0 ± 0.2	n.d.	>50	>50
(XIXf)	29.0 ± 0.2	n.d.	n.d.	34.0 ± 1.0	n.d.	n.d.
Ацильные гликоглицеролипиды						
(XXa)	>50	n.d.	>50	n.d.	3.4 ± 0.1	>50
(XXb)	6.7 ± 0.7	n.d.	13.6 ± 0.2	n.d.	15.6 ± 0.4	13.4 ± 6.8
Комбинированные гликоглицеролипиды						
(XXIa)	>50	>50	>50	>50	>50	>50
(XXIb)	>50	>50	>50	>50	>50	>50
(XXIc)	>50	>50	>50	>50	>50	>50
(XXIIa)	41.3 ± 2.1	9.5 ± 0.4	>50	>50	>50	>50
(XXIIb)	7.5 ± 0.3	22.1 ± 1.1	>50	>50	>50	>50
(XXIIc)	5.9 ± 0.4	>50	>50	>50	>50	>50

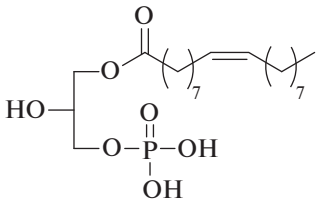
Примечание: K562 – хронический миелоидный лейкоз, HL60 – лимфоцитарный лейкоз, HCT116 – аденокарцинома толстой кишки, B16 – меланома мыши, SKOV-3 – аденокарцинома яичника, MCF-7 – рак молочной железы; n.d. – нет данных.

ниях HL60, HCT116 и B16. В ряду соединений, содержащих остаток D-галактозы (**XIXb**, **XIXd**, **XIXf**), самыми активными были гликоглицеролипиды, соединенные с галактозой через ди- или триметиленовый спейсер (**XIXb**, **XIXd**), в отношении клеток HCT116, B16 и K562 (только для соединения (**XIXd**)). Гликоглицеролипиды с тетраметиленовым спейсером (**XIXe**, **XIXf**) показали наихудшие результаты на исследуемых клеточных линиях вне зависимости от типа углеводного остатка.

Обобщая данные о нейтральных GAELs, можно сделать вывод, что высокую активность проявляли GAELs, в которых остаток D-маннозы присоединен либо непосредственно к глицериновому скелету (**XVIIIa**) (для клеток K562), либо через триметиленовую спейсерную группу (**XIXc**) (табл. 2). Соединения с диметиленовым спейсером (**XIXa**, **XIXb**) показали умеренную активность на исследуемых клеточных линиях. Средние значения IC_{50} для группы соединений (**XVIII**) были ниже, чем для группы соединений (**XIX**), что свидетельствует об отрицательном влиянии наличия спейсера на цитотоксические свойства рассмотренных гликоглицеролипидов.

Ацильные гликоглицеролипиды. Соединения (**XXa**) и (**XXb**) – нейтральные гликозилированные глицеролипиды, содержащие в качестве углеводного фрагмента остаток D-галактозы и отличающиеся степенью ненасыщенности ацильных заместителей в положениях C1 и C2 глицерина (остатки линолевой и олеиновой кислот) (рис. 5*б*). По ацильным гликоглицеролипидам представлены наши данные.

Цитотоксичность гликозилированного ацильного глицеролипида с остатком линолевой кислоты (**XXb**) на линии K562 была незначительно выше цитотоксичности эдельфозина (**V**) (см.



(**XXIII**)

Рис. 6. Лизофосфатидная кислота (**XXIII**).

табл. 1). Соединение с остатком олеиновой кислоты (**XXa**) проявило ярко выраженную избирательность для линии рака яичника SKOV-3 и IC_{50}, схожую с таковой для эдельфозина (**V**). На клетках HCT116 оба соединения были менее активны, однако на сублинии с нокаутом гена *p53* соединение (**XXb**) с двумя ненасыщенными двойными связями оказалось существенно активнее (IC_{50} = = 13.6 ± 0.21), чем соединение (**XXa**), содержащее одну ненасыщенную двойную связь (IC_{50} > 50 мкМ). Белок p53 играет важную роль в механизме апоптоза [83], следовательно, можно предположить, что механизм действия соединения (**XXb**) благодаря наличию полиненасыщенного ацильного остатка связан с апоптозом, что отличает его от остальных GAELs, вызывающих неапоптотическую гибель клеток.

Комбинированные гликоглицеролипиды, содержащие алкильные и ацильные остатки. Комбинированные препараты (пролекарства) – соединения с невысокой фармакологической активностью или без таковой, однако приобретают ее, превращаясь в активное лекарство *in vivo* в результате метаболических реакций [84]. Используя физико-химические свойства липосом, включающих пролекарства, и патофизиологические характеристики опухолей, можно инициировать высвобождение и активацию липидов с простой эфирной связью (AELs) в опухоли. Для этого используют покрытые полимерами липосомы, включающие пролипиды с простой эфирной связью (proAELs) [85]. Пролипиды превращаются в активные препараты при гидролизе фосфолипазой A2 (sPLA2) в опухоли [86–88]. Фосфолипиды гидролизуются sPLA2 с образованием лизофосфолипидов и свободных жирных кислот [86]. Одна из наиболее привлекательных – лизофосфатидная кислота (LPA, (**XXIII**), рис. 6) – природный фосфолипид, функционирующий как биоактивный липидный медиатор и вторичный мессенджер. Соединение (**XXIII**) регулирует пролиферацию, миграцию и выживание опухолевых клеток.

Способность опухолевых клеток приобретать устойчивость к клинически применяемым препаратам снижает эффективность противоопухолевой терапии [2]. Устойчивость, как правило, множественная, делает клетки нечувствительными одновременно к нескольким агентам [3]. Преодоление лекарственной устойчивости возможно при создании препаратов, компоненты которых индуцируют различные механизмы гибели [50, 89].

Как указано выше, GAELs активируют неапоптотическую гибель опухолевых клеток, а наличие в структуре глицеролипидов гликозильного остатка может влиять на амфифильность молекул, что необходимо для улучшения биологической активности и фармакокинетики.

При сочетании противоопухолевых механизмов возможен аддитивный или синергический эффект [89]. Модификация противоопухолевых агентов путем конъюгирования с жирной кислотой способна увеличить селективность и привести к появлению новых гибридных структур с оптимизированной биологической активностью. Модифицированные жирные кислоты могут сделать химиотерапию более эффективной и менее токсичной [90]. В связи с этим перспективным представляется создание комбинированных гликоглицеролипидов, содержащих в диглицеридном или углеводном доменах алкильные и ацильные остатки, различающиеся насыщенностью и длиной.

Соединения (**XXIa**–**XXIc**) – алкильные гликоглицеролипиды, дополненные остатками жирных кислот, локализованными по C6-положению углеводного домена (рис. 5*в*). Концепция такой молекулярной инженерии основана на ожидаемом разрушении клеточными эстеразами сложноэфирной связи в клетке и возникновением двух противоопухолевых агентов, индуцирующих различные механизмы гибели.

Цитотоксичность гликоглицеролипидов (**XXIa**–**XXIc**) на всех исследуемых линиях оказалась неудовлетворительной (IC_{50} > 50 мкМ) (табл. 2). Это свидетельствует о том, что данная комбинация структурных элементов значительно уступает соединениям (**XVIIIa**, **XVIIIb**) без ацильного остатка по C6-положению.

Полиненасыщенные жирные кислоты ω3 также используются в химиотерапии [91]. Ключевой механизм, предложенный для преодоления множественной лекарственной устойчивости, основан на влиянии ω3-кислот на структуру плазматической мембраны и трансмембранный транспорт [93] и на наличии тканеспецифичности в зависимости от структуры [90, 92, 93]. Кроме того, они могут замедлять рост опухолей, вызывая апоптоз или ингибируя ангиогенез [91, 94].

Комбинированные противоопухолевые липиды при внутриклеточном расщеплении могут проявлять аддитивность за счет сочетания следующих свойств: 1) лизолипиды цитотоксичны в микромолярных концентрациях; 2) жирные кислоты могут ингибировать пролиферацию опухо-

левых клеток и повышать их чувствительность к противоопухолевым препаратам; 3) жирные кислоты и лизолипиды могут снижать барьер проницаемости липидных мембран [88].

Были синтезированы лизоглицеролипид (**XXIIa**) и его производные с моно- (**XXIIb**) и диненасыщенными (**XXIIc**) жирными кислотами по C2-положению глицерина и изучена их цитотоксичность (рис. 5*в*, табл. 2). Исследуемые соединения показали наибольший эффект на линиях лейкозов K562 и HL60 (наши неопубликованные данные). На линиях опухолевых клеток A375, MCF-7, HBL100, MDA-MB-231 и HCT116, а также на неопухолевых фибробластах значения IC_{50} превышали 50 мкМ. Наличие и степень ненасыщенности жирных кислот при C2-положении глицерина влияют на цитотоксичность, но обе модификации важны для избирательности к клеткам лейкозов. Замена остатка мононенасыщенной олеиновой кислоты на диненасыщенную линолевую вызывает больший цитотоксический эффект на клетках K562, а отсутствие заместителя при C2 или наличие более насыщенного заместителя увеличивает цитотоксичность для линии HL60.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На первоначальном этапе исследования противоопухолевых липидов основными соединениями были фосфорсодержащие глицеролипиды. Эталоном остается эдельфозин из-за его высокой активности. Однако трактовка эдельфозина как “золотого стандарта” противоопухолевых липидов требует пересмотра, поскольку токсичность в отношении нормальных клеток и низкая избирательность не позволяют получить для него приемлемое “терапевтическое окно” – различие цитотоксических концентраций для опухолевых и неопухолевых клеток. Кроме того, он обладает низкой биодоступностью, нестабильностью, медленным выведением из организма и высоким гемолитическим эффектом.

Среди бесфосфорных липидов имеются отдельные хемотипы (например, положительно заряженные глицеролипиды), которые при сопоставимой с эдельфозином антинеопластической активности вызывают минимальные повреждения неопухолевых клеток. Для некоторых соединений (катионные гликолипиды, нейтральные гликоглицеролипиды и др.) наблюдалась специфичность в отношении лейкозов, что может открыть новые перспективы при разработке препаратов для лечения данного заболевания. Несмотря на относительно невысокий противоопухолевый эффект бесфосфорных липидов, их преимущество заключается в низкой токсичности для неопухолевых клеток; отдельные соединения (катионные глицеролипиды) активнее эдельфозина при меньшем повреждении эритроцитов.

Разработка бесфосфорных аналогов эдельфозина и дальнейшие модификации дизайна бесфосфорных липидов – перспективное направление поиска новых кандидатов в противоопухолевые агенты среди представителей этого класса химических соединений.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность профессору Г.А. Серебренниковой – основателю школы противоопухолевых глицеролипидов в России.

Выражаем признательность к.б.н. А.А. Марковой, В.В. Татарскому и сотрудникам лаборатории механизмов гибели опухолевых клеток НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина за критическое обсуждение работы.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 0706-2020-0019).

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. *Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F.* // CA Cancer J. Clin. 2021. P. 1–41. https://doi.org/10.3322/caac.21660
2. *Mansoori B., Mohammadi A., Davudian S., Shirjang S., Baradaran B.* // Adv. Pharm. Bull. 2017. V. 7. P. 339–348. https://doi.org/10.15171/apb.2017.041
3. *Tan B.L., Norhaizan M.E.* // Molecules. 2019. V. 24. P. 2527. https://doi.org/10.3390/molecules24142527
4. *Gulyakin I.D., Oborotova N.A., Pechennikov V.M.* // Pharm. Chem. J. 2014. V. 48. P. 209–213. https://doi.org/10.1007/s11094-014-1078-7
5. *Burton P.S.* // J. Pharm. Exp. Ther. 2002. V. 303. P. 889–895. https://doi.org/10.1124/jpet.102.035006
6. *Utreja P., Jain S., Tiwary A.* // Curr. Drug Deliv. 2010. V. 7. P. 152–161. https://doi.org/10.2174/156720110791011783

7. *Piao X., Yin H., Guo S., Wang H., Guo P.* // Adv. Sci. 2019. V. 6. P. 1900951. https://doi.org/10.1002/advs.201900951
8. *Tewari D., Rawat P., Singh P.K.* // Food Chem. Toxicol. 2019. V. 123. P. 522–535. https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.041
9. *Oun R., Moussa Y.E., Wheate N.J.* // Dalton Transaction. 2018. V. 7. P. 6645–6653. https://doi.org/10.1039/c8dt00838h
10. *Munder P.G., Ferber E., Modolell M., Fischer H.* // Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 1969. V. 36. P. 117–128. https://doi.org/10.1159/000230731
11. *Mulder E., van Deenen L.L.* // Biochim. Biophys. Acta. 1965. V. 106. P. 348–356. https://doi.org/10.1016/0005-2760(65)90043-3
12. *Iatrou C., Frangia C., Demopoulos C.A.* // Infect. Disord. Drug Targ. 2009. V. 9. P. 390–399. https://doi.org/10.2174/187152609788922555
13. *Jancar S., Chammas R.* // Curr. Drug Targ. 2014. V. 15. P. 982–987. https://doi.org/10.2174/1389450115666140903111812
14. *Onuchic A.C., Machado C.M.L., Saito R.F., Rios F.J., Jancar S., Chammas R.* // Med. Inflam. 2012. P. 1–6. https://doi.org/10.1155/2012/175408
15. *da Silva Junior I., Andrade L.N., Jancar S., Chammas R.* // Clinics. 2018. V. 73. P. e792s. https://doi.org/10.6061/clinics/2018/e792s
16. *Козловский В.И., Ковтун О.М., Сероухова О.П., Детковская И.Н., Козловский И.В.* // Вест. Витеб. гос. мед. универ. 2013. Т. 12. № 4. С. 79–91.
17. *Mollinedo F., de la Iglesia-Vicente J., Gajate C., de Mendoza A.E.H., Villa-Pulgarin J.A., Frias M., Roué G., Gil J., Colomer D., Campanero M.A., Blanco-Prieto M.J.* // Clin. Cancer Res. 2010. V. 16. P. 2046–2054. https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-09-2456
18. *Rahmani M., Reese E., Dai Y., Bauer C., Payne S.G., Dent P., Spiegel S., Grant S.* // Cancer Res. 2005. V. 65. P. 2422–2432. https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-04-2440
19. *Маркова А.А., Плявник Н.В., Плетнева М.В., Серебрянникова Г.А., Штиль А.А.* // Клин. онкогематол. 2012. Т. 5. № 2. С. 141–143.
20. *Berdel W.E., Fink U., Rastetter J.* // Lipids. 1987. V. 22. P. 967–969. https://doi.org/10.1007/bf02535566
21. *Drings P., Günther I., Gatzemeier U., Ulbrich F., Khanavkar B., Schreml W., Lorenz J., Brugger W., Schick H., Pawel J., Nordström R.* // Oncol. Res. Treat. 1992. V. 15. P. 375–382. https://doi.org/10.1159/000217391
22. *Chee K.G., Longmate J., Quinn D.I., Chatta G., Pinski J., Twardowski P., Pan C.X., Cambio A., Evans C.P., Gandara D.R., Lara P.N.* // Clin. Genit. Cancer. 2007. V. 5. P. 433–437. https://doi.org/10.3816/CGC.2007.n.031
23. *Munder P.G., Modolell M., Andreesen R., Weltzien H.U., Westphal O.* // In: Immunostimulation / Eds. Chedid L., Miescher P.A., Mueller-Eberhard H.J. Springer, Berlin, Heidelberg, 1980. P. 177–193. https://doi.org/10.1007/978-3-642-67809-7_12
24. *Tarnowski G.S, Mountain I.M., Stock C.C., Munder P.G., Weltzien H.U., Westphal O.* // Cancer Res. 1978. V. 38. P. 339–344.
25. *Müller E., Dupuis G., Turcotte S., Rola-Pleszczynski M.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1991. V. 181. P. 1580–1586. https://doi.org/10.1016/0006-291x(91)92119-5
26. *Mollinedo F., Fernandez-Luna J.L., Gajate C., Martin-Martin B.* // Cancer Res. 1997. V. 57. P. 1320–1328.
27. *Ausili A., Torrecillas A., Aranda F.J., Mollinedo F., Gajate C., Corbalán-García S., Godos A., Gómez-Fernández J.C.* // J. Phys. Chem. B. 2008. V. 112. P. 11643–11654. https://doi.org/10.1021/jp802165n
28. *Kostadinova A., Topouzova-Hristova T., Momchilova A., Tzoneva R., Berger M.R.* // Adv. Protein Chem. Struct. Biol. 2015. V. 101. P. 27–66. https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2015.08.001
29. *Van der Luit A.H., Budde M., Ruurs P., Verheij M., Blitterswijk W.J.* // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 39541–39547. https://doi.org/10.1074/jbc.m203176200
30. *Gajate C., Mollinedo F.* // Anticancer Agents Med. Chem. 2014. V. 14. P. 509–527. https://doi.org/10.2174/1871520614666140309222259
31. *Gajate C., Mollinedo F.* // Blood. 2007. V. 109. P. 711–719. https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-016824
32. *Hąc-Wydro K., Dynarowicz-Łątka P.* // Colloids Surf. B. Biointerf. 2010. V. 76. P. 366–369. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.10.012
33. *Farooqui A.A., Farooqui T., Horrocks L.A.* // In: Metabolism and Functions of Bioactive Ether Lipids in the Brain. Springer, New York, NY, 2008. P. 219–235. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77401-5_11
34. *Bazill G.W., Dexter T.M.* // Cancer Res. 1990. V. 50. P. 7505–7512.
35. *de Mendoza A.E.H., Campanero M.A., de la Iglesia-Vicente J., Gajate C., Mollinedo F., Blanco-Prieto M.J.* // Clin. Cancer Res. 2009. V. 15. P. 858–864. https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-08-1654
36. *Plyavnik N., Shtil A., Serebrennikova G.* // Min. Rev. Med. Chem. 2006. V. 6. P. 533–542. https://doi.org/10.2174/138955706776876221
37. *Brachwitz H., Vollgraf C.* // Pharm. Ther. 1995. V. 66. P. 39–82. https://doi.org/10.1016/0163-7258(95)00001-w
38. *Arnold B., Reuther R., Weltzien H.U.* // Biochim. Biophys. Acta. Lipids Lipid Metab. 1978. V. 530. P. 47–55. https://doi.org/10.1016/0005-2760(78)90125-x
39. *Lasa-Saracíbar B., Estella-Hermoso de Mendoza A., Mollinedo F., Odero M.D., Blanco-Príeto M.J.* // Cancer Lett. 2013. V. 334. P. 302–310. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.01.018
40. *Smorenburg C.H., Seynaeve C., Bontenbal M., Planting A.S., Verweij J.* // Anticancer Drugs. 2000. V. 11. P. 825–828. https://doi.org/10.1097/00001813-200011000-00006
41. *de Mendoza A.E.H., Préat V., Mollinedo F., Blanco-Prieto M.J.* // J. Control. Release. 2011. V. 156. P. 421–426. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.030
42. *Lasa-Saracíbar B., Aznar M.Á., Lana H., Aizpún I., Gilb A.G., Blanco-Prietoa M.J.* // Int. J. Pharm. 2014. V. 474. P. 1–5. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.07.053

43. *Shim G., Yu Y.H., Lee S., Kim J., Oh Y.K.* // Asian J. Pharm. Sciences. 2016. V. 11. P. 596–602. https://doi.org/10.1016/j.ajps.2016.05.003
44. *Herrmann D.B.J., Pahlke W., Opitz H.G., Bicker U.* // Cancer Treat. Rev. 1990. V. 17. P. 247–252. https://doi.org/10.1016/0305-7372(90)90055-k
45. *Giantonio B.J., Derry C., McAleer C., McPhillips J.J., O'Dwyer P.J.* // Clin. Cancer Res. 2004. V. 10. P. 1282–1288. https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-0837-02
46. *Yanapirut P., Berger M.R., Reinhardt M., Schmähl D.* // Arzneimittelforschung. 1991. V. 41. P. 652–655.
47. *Kötting J., Marschner N.W., Neumüller W., Unger C., Eibl H.* // In: Alkylphosphocholines: New Drugs in Cancer Therapy / Eds. Eibl H., Hilgard C., Unger C. Prog Tumor Res. Basel, Karger, 1992. V. 34. P. 131–142. https://doi.org/10.1159/000420838
48. *Escobar P., Matu S., Marques C., Croft S.L.* // Acta Tropica. 2002. V. 81. P. 151–157. https://doi.org/10.1016/S0001-706X(01)00197-8
49. *Vink S.R., Schellens J.H.M., van Blitterswijk W.J., Verheij M.* // Inv. New Drugs. 2005. V. 23. P. 279–286. https://doi.org/10.1007/s10637-005-1436-0
50. *Gills J.J., Dennis P.A.* // Curr. Oncol. Rep. 2009. V. 11. P. 102–110. https://doi.org/10.1007/s11912-009-0016-4
51. *Rübel A., Handrick R., Lindner L.H., Steiger M., Eibl H., Budach W., Belka C., Jendrossek V.* // Radiat. Oncol. 2006. V. 1. P. 6. https://doi.org/10.1186/1748-717x-1-6
52. *Erdlenbruch B., Jendrossek V., Marx M., Hunold A., Eibl H., Lakomek M.* // Anticancer Res. 1998. V. 18. P. 2551–2557.
53. *Markova A.A., Plyavnik N.V., Morozova N.G., Maslov M.A., Shtil A.A.* // Russ. Chem. Bull. 2014. V. 63. P. 1081–1087. https://doi.org/10.1007/s11172-014-0552-4
54. *Романова С.Г., Романов В.Г., Серебренникова Г.А., Штиль А.А.* // Биомед. хим. 2010. Т. 56. № 4. С. 457–470.
55. *Gilbert A., Bittman R.* // Anticancer Agents Med. Chem. 2014. V. 14. P. 592–606. https://doi.org/10.2174/1871520614666140309231144
56. *Jaffrès P.A., Gajate C., Bouchet A.M., Couthon-Gourvès H., Chantôme A., Potier-Cartereau M., Besson P., Bougnoux P., Mollinedo F., Vandier C.* // Pharmacol. Ther. 2016. V. 165. P. 114–131. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.06.003
57. *Маркова А.А., Плявник Н.В., Татарский В.В., Штиль А.А., Серебренникова Г.А.* // Биоорг. химия. 2010. Т. 36. С. 574–576. [*Markova A.A., Pliavnik N.V., Tatarskii V.V., Shtil' A.A., Serebrennikova G.A.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2010. V. 36. P. 532–534.] https://doi.org/10.1134/S106816201004014X
58. *Ogunsina M., Samadder P., Idowu T., Arthur G., Schweizer F.* // J. Med. Chem. 2017. V. 60. P. 2142–2147. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01773
59. *Idowu T., Samadder P., Gilbert A., Schweizer F.* // J. Med. Chem. 2017. V. 60. P. 9724–9738. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01198
60. *Marino-Albernas J.R., Bittman R., Peters A., Mayhew E.* // J. Med. Chem. 1996. V. 39. P. 3241–3247. https://doi.org/10.1021/jm960164j
61. *Samadder P., Bittman R., Byun H.-S., Arthur G.* // Biochem. Cell Biol. 2009. V. 87. P. 401–414. https://doi.org/10.1139/o08-147
62. *Ogunsina M., Samadder P., Idowu T., Nachtigal M., Schweizer F., Gilbert A.* // Molecules. 2020. V. 25. P. 566. https://doi.org/10.3390/molecules25030566
63. *Andersson M.X., Larsson K.E., Tjellstrom H., Liljenberg C., Sandelius A.S.* // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 27578–27586. https://doi.org/10.1074/jbc.M503273200
64. *Morozova N.G., Shmendel E.V., Timofeev G.A., Ivanov I.V., Kubasova T.S., Plyavnik N.V., Markova A.A., Maslov M.A., Shtil A.A.* // Mend. Commun. 2019. V. 29. P. 166–168. https://doi.org/10.1016/j.mencom.2019.03.016
65. *Шмендель Е.В., Перевощикова К.А., Шишова Д.К., Кубасова Т.С., Тютюнник Л.Л., Маслов М.А., Морозова Н.Г., Штиль А.А.* // Изв. АН. Серия хим. 2015. № 7. С. 1648.
66. *Ramani D., De Bandt J.P., Cynober L.* // Clin. Nutr. 2014. V. 33. P. 14–22. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2013.09.019
67. *Moinard C., Cynober L., Debandt J.* // Clin. Nutr. 2005. V. 24. P. 184–197. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2004.11.001
68. *Igarashi K., Kashiwagi K.* // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2019. V. 107. P. 104–115. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.12.012
69. *Wang J.Y.* // Inflammopharmacol. 2005. V. 13. P. 91–101. https://doi.org/10.1163/156856005774423890
70. *Pasini A., Caldarera C.M., Giordano E.* // Amino Acids. 2013. V. 46. P. 595–603. https://doi.org/10.1007/s00726-013-1550-9
71. *Terui Y., Sakamoto A., Yoshida T., Kasahara T., Tomitori H., Higashi K., Igarashi K., Kashiwagi K.* // Amino Acids. 2015. V. 47. P. 345–356. https://doi.org/10.1007/s00726-014-1867-z
72. *Casero R.A., Murray Stewart T., Pegg A.E.* // Nat. Rev. Cancer. 2018. V. 18. P. 681–695. https://doi.org/10.1038/s41568-018-0050-3
73. *Palmer A.J., Wallace H.M.* // Amino Acids. 2009. V. 38. P. 415–422. https://doi.org/10.1007/s00726-009-0400-2
74. *Casero R.A., Woster P.M.* // J. Med. Chem. 2009. V. 52. P. 4551–4573. https://doi.org/10.1021/jm900187v
75. *Goyal L., Supko J.G., Berlin J., Blaszkowsky L.S., Carpenter A., Heuman D.M., Hilderbrand S.L., Stuart K.E., Cotler S., Senzer N.N., Chan E., Berg C.L., Clark J.W., Hezel A.F., Ryan D.P., Zhu A.X.* // Cancer Chem. Pharm. 2013. V. 72. P. 1305–1314. https://doi.org/10.1007/s00280-013-2293-8
76. *Xie Y., Murray-Stewart T., Wang Y., Yu F., Laurence J.L., Robert J.M., Casero A., Oupickýa D.* // J. Contr. Rel. 2017. V. 246. P. 110–119. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.12.017
77. *Perevoshchikova K.A., Nichugovskiy A.I., Isagulieva A.K., Morozova N.G., Ivanov I.V., Maslov M.A., Shtil A.A.* // Mend. Commun. 2019. V. 29. P. 616–618. https://doi.org/10.1016/j.mencom.2019.11.003
78. *Weisell J., Hyvonen M., Alhonen L., Vepsalainen J., Keinanen T.A., Khomutov A.R.* // Curr. Pharm. Des. 2014. V. 20. P. 262–277. https://doi.org/10.2174/1381612811319999003 7

79. *Huang K.W., Lai Y.T., Chern G.J., Huang S.F., Tsai C.L., Sung Y.C., Chiang C.C., Hwang P.B., Ho T.L., Huang R.L., Shiue T.Y., Chen Y., Wang S.K.* // Biomacromol. 2018. V. 19. P. 2330–2339. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00358

80. *Liu L., Zong Z.M., Liu Q., Jiang S.S., Zhang Q., Cen L.Q., Gao J., Gao X.G., Huang J.D., Liu Y., Yao H.* // Biomaterials. 2018. V. 184. P. 20–30. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.08.064

81. *DeRossi C., Bambino K., Morrison J., Sakarin I., Villacorta-Martin C., Zhang C., Ellis J.L., Fiel M.I., Ybanez M., Lee Y.A., Huang K., Yin C., Sakaguchi T.F., Friedman S.L., Villanueva A., Chu J.* // Hepatology. 2019. V. 70. P. 2107–2122. https://doi.org/10.1002/hep.30677

82. *Morozova N.G., Timofeev G.A., Timakova A.A., Shmendel E.V., Kubasova T.S., Tyutyunnik L.L., Markova A.A., Maslov M.A., Shtil A.A.* // Mend. Commun. 2015. V. 25. P. 248–249. https://doi.org/10.1016/j.mencom.2015.07.003

83. *Vogelstein B., Lane D., Levine A.J.* // Nature. 2000. V. 408. P. 307–310. https://doi.org/10.1038/35042675

84. *Rautio J., Meanwell N.A., Di L., Hageman M.J.* // Nat. Rev. Drug Discov. 2018. V. 17. P. 559–587. https://doi.org/10.1038/nrd.2018.46

85. *Abe T., Sakamoto K., Kamohara H., Hirano Y., Kuwahara N., Ogawa M.* // Int. J. Cancer. 1997. V. 74. P. 245–250. https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19970620)74:3<245::aid-ijc2>3.0.co;2-z

86. *Andresen T.L., Davidsen J., Begtrup M., Mouritsen O.G., Jorgensen K.* // J. Med. Chem. 2004. V. 47. P. 1694–1703. https://doi.org/10.1021/jm031029r

87. *Arouri A., Mouritsen O.G.* // Eur. J. Pharm. Sci. 2012. V. 45. P. 408–420. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.09.013

88. *Kaleağasıoğlu F., Zaharieva M.M., Konstantinov S.M., Berger M.R.* // Anti-Cancer Agents Med. Chem. 2019. V. 19. P. 66–91. https://doi.org/10.2174/1871520618666181012093056

89. *Saputra E.C., Huang L., Chen Y., Tucker-Kellogg L.* // Cancer Res. 2018. V. 78. P. 2419–2431. https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-17-1201

90. *Jóźwiak M., Filipowska A., Fiorino F., Struga M.* // Eur. J. Pharmacol. 2020. V. 871. P. 172937. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.172937

91. *Zhu S., Lin G., Song C., Wu Y., Feng N., Chen W., He Z., Chen Y.Q.* // Oncotarget. 2017. V. 8. P. 109135–109150. https://doi.org/10.18632/oncotarget.22629

92. *Abel S., Riedel S., Gelderblom W.* // Proceed. Nutr. Soc. 2014. V. 73. P. 361–367. https://doi.org/10.1017/S0029665114000585

93. *Gu Z., Shan K., Chen H., Chen Y.Q.* // Curr. Pharm. Rep. 2015. V. 1. P. 283–294. https://doi.org/10.1007/s40495-015-0043-9

94. *Li Z., Li Q., Wang G., Huang Y., Mao X., Zhang Y., Wang X.* // Int. J. Clin. Exp. Med. 2019. V. 12. P. 403–412.

The Phosphorus Free Lipids as New Antitumor Drug Prototypes

E. A. Varlamova*, A. K. Isagulieva, N. G. Morozova***,[#], E. V. Shmendel***, M. A. Maslov***, and A. A. Shtil***

[#]Phone: +7 (916) 491-62-70, e-mail: ngmoroz@mail.ru

**N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Kashirskoe sh. 24, Moscow, 115478 Russia*

***Research Institute for the Research of New Antibiotics named by G.F. Gause, ul. Bolshaya Pirogovskaya 11/1, Moscow, 119021 Russia*

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

The phosphorus containing alkyl glycerolipids induce death of tumor cells of various tissue origin whereas non-malignant counterparts are less damaged. One serious drawback of these compounds is their hemolytic activity, that is, disruption of red blood cells. Moreover, intracellular phospholipases can hydrolyze the phosphorus containing glycerolipids and reduce their antitumor potency. This justifies the search for new antitumor, non-hemolytic phosphorus-free lipids. Modifications of the hydrophobic and polar groups yielded new lipidbased agents. In particular, replacement of the hydrophilic phosphate group with a carbohydrate residue yielded a new chemotype of glycosylated glycerolipids. Further developments resulted in a series of phosphorus-free cationic, polycationic and neutral glycoglycerolipids. New phosphorus-free lipids retained the antiproliferative and cytotoxic properties similarly to edelfosine and other alkyl phosphoglycerolipids. Importantly, the hemolytic activity was negligible or absent. This review analyzes the structure-activity relationship within the class of phosphorus-free glycerolipids as the original antitumor drug candidates.

Keywords: antitumor lipids, edelfosine, tumor cells, cell death

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 5, с. 555–565

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.115:577.115.3:577.125

УЧАСТИЕ ЛИПИДОВ В РЕАЛИЗАЦИИ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ[1]

© 2021 г. О. В. Галкина*, #, О. В. Ветровой*, **, Н. Д. Ещенко*

**ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Россия, 199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9*

***ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Россия, 199034 Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6*

Поступила в редакцию 06.02.2021 г.
После доработки 18.02.2021 г.
Принята к публикации 21.02.2021 г.

Обзорная статья посвящена особенностям липидного состава клеток головного мозга и описанию специфических функций липидов в обеспечении деятельности нервной системы. Липиды представляют собой чрезвычайно гетерогенную группу соединений, что обусловливает большое разнообразие выполняемых ими биологических функций. Реализация функций центральной нервной системы, включающих в себя процессы обучения, памяти, принятия решений, а также прямую и опосредованную эндокринными железами регуляцию функций других органов, достигается величайшим разнообразием путей высвобождения медиаторов и нейромодуляторов, их рецепции, возникновения и распространения потенциала действия. Все это, в свою очередь, определяется липидным составом мембран, присутствием определенных жирных кислот в составе липидов, а также метаболизмом липидов. В данном обзоре основное внимание сосредоточено на роли липидов в нейронах.

Ключевые слова: ЦНС, головной мозг, нейроны, астроциты, липиды, метаболизм липидов

DOI: 10.31857/S0132342321050250

ВВЕДЕНИЕ

Липиды представляют собой чрезвычайно гетерогенную группу соединений, в связи с чем достаточно сложно дать определение этой группе молекул, а также создать единую классификацию. В нее входят как структурные мембранообразующие липиды, резервные липиды, так и воски, гормоны, жирорастворимые витамины, а также предшественники и производные липидов, соединений липидов с другими классами макромолекул. В 2005 г. Международный комитет по классификации и номенклатуре липидов (International Lipid Classification and Nomenclature Committee) по инициативе консорциума LIPID MAPS разработал и ввел комплексную систему классификации липидов, основанную на их биосинтезе (концепция двух основных “строительных блоков”: кетоацильные группы и изопреновые группы) [1]. На основе этой системы классификации липиды были разделены на восемь категорий, каждая категория делится далее на классы, подклассы и, в случае некоторых подклассов липидов, на классы 4-го уровня. Огромное разнообразие в структуре липидных молекул обусловливает многообразие ключевых биологических функций, которые они выполняют.

Головной мозг характеризуется очень высоким содержанием липидов по сравнению с другими органами: липиды составляют примерно половину сухого веса мозга взрослых животных [2, 3]. Протяженность плазматической мембраны клеток (в особенности нейронов и олигодендроцитов) может играть существенную роль в обогащении липидами этого органа и их разнообразии. Липиды – это не только структурные компоненты клеток центральной нервной системы (ЦНС), поддерживающие структурную целостность и физические характеристики мембран, но и важнейшие соединения, обеспечивающие функциональную активность нервной ткани. Уникальные мембранные структуры, такие как синаптические комплексы и миелиновые оболочки, характеризуются специфическим липидным составом и вносят вклад в особые свойства этих структур

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

Сокращения: КЛ – кардиолипины; ЛП – липопротеины; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; ФЛ – глицерофосфолипиды; ФИ – фосфоинозитиды; ФТХ – фосфатидилхолины; ФЭА – фосфатидилэтаноламины; PI4P – фосфатидилинозитол-4-фосфат; PI(4,5)P – фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат; 22:4 (n-6) – арахидоновая кислота; 22:6 (n-3) – докозагексаеновая кислота.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (812) 328-21-82; эл. почта: o.v.galkina@spbu.ru).

нервной системы. Многочисленные сигнальные пути, в которых принимают участие соединения липидной природы, регулируют клеточную дифференцировку и участвуют в синаптической передаче. Один из основных механизмов изменения активности нейрональных рецепторов и действия трофических факторов – модификация белков липидами (жирными кислотами, изопреноидами и др.).

Сложность исследования нервной ткани связана с высокой гетерогенностью ее клеток. Помимо разных типов нейрональных клеток, ЦНС содержит морфологически и функционально различные глиальные клетки: микроглиальные, эпендимальные, олигодендроцитарные и астроглиальные [4–6]. Микроглиальные клетки (микроглия) составляют ~10–15% от клеток головного мозга и представляют собой фагоцитирующие и иммунокомпетентные клетки нервной системы. Эпендимальные клетки (эпендима) выстилают стенки желудочков головного мозга и спинномозгового канала, основная их функция – образование спинномозговой жидкости. Олигодендроциты выполняют изоляционную функцию, образуя специфическую липидно-белковую структуру – миелиновую оболочку, которая оборачивается вокруг части аксона, обеспечивая высокую скорость проведения нервных импульсов. Астроциты представляют собой наиболее многочисленную (20–40%) популяцию глиальных клеток во взрослом мозге. Они выполняют множество важных функций, в том числе обеспечение метаболической поддержки нейронов (например, доступность глюкозы и лактата). Взаимодействие между разными типами клеток ЦНС имеет большое значение для функционирования мозга [4], и в этом взаимодействии не последнюю роль играют липиды.

В данном обзоре основное внимание сосредоточено на роли липидов в нейронах, хотя некоторые аспекты взаимодействия различных клеток ЦНС также упомянуты. Тема нейроглиальных взаимоотношений требует отдельного обсуждения.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ ЛИПИДОВ В ЦНС

В мозге липиды выполняют специфические функции: участвуют в образовании, функционировании нейрональных и нейроглиальных мембран, а также опосредованной липидами передаче сигнала.

Структура и свойства мембраны особенно важны в головном мозге, где от них зависит выполнение специфических функций: распространение потенциала действия, образование и слияние синаптических везикул, высвобождение и связывание нейротрансмиттеров, активность ионных каналов и рецепторов. Функции мембран, как известно, зависят от их биофизических свойств, включая текучесть, проницаемость, упаковку липидов, кривизну, поверхностный заряд, образование мембранных доменов и рафтов. Все это, в свою очередь, определяется липидным составом и присутствием определенных жирных кислот в составе липидов.

Преобладающие компоненты липидов мембран мозга, как и других тканей, – глицерофосфолипиды (ФЛ). На примере ФЛ очень хорошо заметны региональные различия в липидном составе нейрональной ткани. Количество молекулярных видов и распределение этих липидов варьирует в зависимости от региона мозга, а также от возраста [7, 8]. Например, количество ФЛ в сером веществе составляет до 70% от суммарного содержания липидов, тогда как в белом веществе – только 45–50% [9, 10].

Среди ФЛ в мембранах нейронов, так же как и в других тканях, преобладают два основных класса: фосфатидилэтаноламины (ФЭА, ~35% от общего содержания ФЛ), включая плазмалогены (~25% от общего содержания ФЭА), и фосфатидилхолины (ФТХ, ~33% от общего содержания ФЛ) [9, 10]. ФТХ, имея цилиндрическую форму молекулы, могут спонтанно образовывать бислои и поэтому выступают основным структурным элементом биологических мембран, поддерживая также определенную их текучесть. Преобладающий молекулярный вид в нейронах – 1-пальмитоил-2-олеоил-фосфатидилхолин (16:0/18:1) [10]. В отличие от ФТХ, ФЭА имеют небольшую полярную головку, что придает этим липидам форму конуса и способствует образованию инвертированной гексагональной фазы. Кроме того, ФЭА – одни из самых ненасыщенных липидов. Соотношение этих двух классов ФЛ важно для изменения кривизны и текучести мембраны, что способствует обеспечению процесса нейромедиаторной передачи сигнала – образования синаптических везикул и слияния их с пресинапической мембраной при высвобождении нейромедиатора [10]. Показано, что ФЭА могут выступать в качестве шаперонов во время сборки мембранных белков [11], а также нековалентно связываться с суперсемейством ФЭА-связывающих внутриклеточных белков [12]. В последние годы эти ФЛ идентифицированы как эндогенные кофакторы, необходимые для формирования прионов в мозге [13]. Возможно, что такие свойства ФЭА связаны с их влиянием на конформацию белков.

Помимо ФТХ и ФТЭ в мозге присутствуют их аналоги, содержащие простую эфирную связь в положении *sn*-1. Это алкенил-ацил-глицерофосфолипиды и алкил-ацетил-глицерофосфолипиды. Первые представлены в мозге плазмалогенами, в то время как вторые – фактором активации тромбоцитов и его производными. Плазмалогены мозга содержат насыщенный или ненасыщенный спирт в позиции *sn*-1 с длинной цепи 16 и 18 атомов углерода (в основном 16:0, 18:0, 18:1). В позиции *sn*-2 преобладают арахидоновая (20:4 (n-6)) и

докозагексаеновая (22:6 (n-3)) кислоты. Полярная группа представлена фосфоэтаноламином или фосфохолином, при этом этаноламинплазмалогены могут составлять до 90% от общего количества ФЭА и до 20–30% от общего количества фосфолипидов в мембранах нейронов [14, 15]. Эти липиды играют значительную роль в функционировании нейронов. Плазмалогены не только выступают структурными компонентами мембран нервных клеток и источником арахидоновой и докозагексаеновой кислот, они также вовлечены в транспорт ионов через плазматическую мембрану, процессы формирования везикул и слияния мембран, клеточной дифференциации, защиту от окислительного стресса. Эти функции могут быть связаны с особым строением плазмалогенов (наличием спирта в положении *sn*-1), которое влияет на состояние мембраны и изменяет упаковку липидного бислоя, его жидкостность, проницаемость, взаимодействие с ионными каналами и рецепторами [14]. Снижение уровня плазмалогенов вызывает нарушение высвобождения нейромедиаторов, запуска апоптоза и миелинизации [16]. Нарушение содержания плазмалогенов отмечено при старении, воздействии хронического стресса и воспалении [17], нейродегенеративных состояниях, в том числе у пациентов с болезнью Альцгеймера [18].

Для мембран ЦНС характерно также наличие большого количества молекулярных видов ФЛ, что до сих пор не до конца объяснено. Характерная особенностью нейронов, отличающая их от клеток других тканей, – неоднородность плазматической мембраны. Функционально мембрана делится на соматодендритную область и аксональную мембрану, различающиеся наличием специфических белков, особенно в районе синаптических окончаний [19]. Распределение, поддержание и функционирование мембранных белков в нейронах может быть опосредовано определенными молекулярными видами фосфолипидов и процессами их ремоделирования. На нейрональной культуре клеток PC12 было показано, что уникальный молекулярный вид 1-олеоил-2-пальмитоил-ФТХ концентрируется в пресинаптической области [20]. Локализация этого молекулярного вида коррелирует с присутствием белка-переносчика дофамина DAT и G-белка Gαo и регулирует работу этих белков.

Минорные липиды представлены фосфатидилсерином (~17%) и фосфоинозитидами (ФИ, 2.6%) – это ключевые липиды, отвечающие за поверхностный заряд мембран и обеспечивающие функциональные взаимодействия с положительно заряженными доменами периферических и интегральных мембранных белков [10].

Мозг – один из органов, наиболее обогащенных полифисфоинозитидами и предшественником их биосинтеза – миоинозитом, а также ферментами ремоделирования ФИ (киназы, фосфатазы). ФИ сосредоточены преимущественно в плазматических мембранах нейронов и в миелиновых структурах. Их много также во внутриклеточных мембранах: эндоплазматическом ретикулуме, наружной митохондриальной и ядерной мембранах. Полифосфоинозитиды – фосфатидилинозитол-4-фосфат (PI4P) и фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат (PI(4,5)P2) – присутствуют в значительно меньших количествах, чем фосфатидилинозитол [21]. PI(4,5)P2 в основном локализован в плазматической мембране в районе синаптического окончания.

Полифосфоинозитиды, включая PI(4,5)P2, играют очень важную роль в передаче сигнала в нейронах, особенно в области синапса. В пресинаптическом окончании они регулируют слияние синаптических везикул с мембраной (например, через связывание с цитозольными белками CAPS (calcium-dependent activator protein for secretion) или белками синаптических везикул – синаптотагминами), рециклинг синаптических везикул (например, через связывание с клатрином и актином) [22]. Их содержание в пресинаптическом окончании может регулироваться ретроградным мессенджером NO [23]. В постсинаптических структурах нейрона сигнал от метаботропных рецепторов может модулироваться через фосфоинозитидный путь, связанный с активацией ФИ-специфичных фосфолипаз C и образованием инозитолтрифосфата и диацилглицерина. Кроме того, установлено участие PI(4,5)P2 в регуляции плотности AMPA-рецепторов глутамата в постсинаптических мембранах [22].

Диацилглицерин и фосфатидная кислота присутствуют в мембранах нейрона в очень незначительных количествах. Тем не менее они играют важную роль в обеспечении выброса нейромедиаторов в синаптическую щель, способствуя слиянию мембран синаптических везикул с плазматической мембраной [24] и участвуя в связывании белков-регуляторов этого процесса, таких как синтаксин-1A, NSF (*N*-ethylmaleimide sensitive fusion proteins) и небольшие ГТФазы [25]. Показано, что в отличие от других ФЛ, фосфатидная кислота образует водородные связи между фосфатной группой и положительно заряженными остатками аминокислот, в основном лизина и аргинина. Взаимодействуя с различными белками (киназами, фосфатазами, фосфолипазами, G-белками и др.), фосфатидная кислота может регулировать такие процессы, как пролиферация клеток, транспорт везикул, организация цитоскелета, и таким образом играть существенную роль в развитии нейронов [26].

Поддержание определенного липидного состава мембраны конкретного синаптического окончания имеет решающее значение не только для липид-белковых взаимодействий, участвующих в связывании и высвобождении нейромедиатора, но и для непосредственной и специфической ассоциации нейротрансмиттера с мембра-

ной. Эти взаимодействия регулируют основной процесс в ЦНС – процесс передачи сигнала [27].

Мозг уникален среди тканей организма по составу кардиолипина (КЛ). Кардиолипин представляет собой специфический структурный компонент внутренней митохондриальной мембраны, который регулирует активность многочисленных ферментов, особенно связанных с окислительным фосфорилированием и дыханием [28]. КЛ содержит две фосфатные группы, три глицериновых фрагмента, а также четыре ацильные цепи. В митохондриях мозга млекопитающих идентифицировано почти 100 молекулярных видов КЛ. В отличие от таких тканей, как печень и сердце, где КЛ представлен в основном тетрапроизводными (четыре остатка линолевой кислоты), в мозге обнаружены КЛ сложного жирнокислотного состава, различающиеся по длине цепей жирных кислот и степени их ненасыщенности [29]. Эти молекулярные виды присутствуют как в синаптических (синаптосомальная фракция), так и в несинаптических митохондриях (фракция, обогащенная телами нейронов и глией). При этом наблюдается различие в содержании КЛ в двух пулах митохондрий: синаптические содержат ~8%, тогда как несинаптические – до 15% от суммарных липидов, что может объяснять некоторые отличия в активности митохондриальных ферментов в этих компартментах [30].

Уникальное распределение молекулярных видов КЛ мозга, как полагают, необходимо для поддержания интенсивного энергетического метаболизма нейрональных клеток и обеспечения их жизнеспособности [30]. Поэтому неудивительно, что изменения в структуре этого липида или снижение его содержания влекут за собой дисфункцию митохондрий, наблюдаемую при многих нейродегенеративных заболеваниях [31–33]. Кроме того, в поврежденных нейронах КЛ способен запускать процессы митофагии и апоптоза [34, 35].

Помимо глицерофосфолипидов, составляющих основу биомембран, в мозге присутствуют специфические липиды нервной ткани – сфинголипиды. Многие сфинголипиды, в том числе цереброзиды, сульфатиды и ганглиозиды, были впервые обнаружены именно в головном мозге. Высокое содержание данных липидов, а также их структурное разнообразие в основном характерно только для этой ткани. Если цереброзиды и сульфатиды более специфичны для белого вещества головного мозга, представляющего собой миелинизированные волокна, то ганглиозиды в основном присутствуют в нейронах.

В состав гликосфинголипидов входит церамид (сфингоидное основание и жирная кислота) и остатки углеводов. В зависимости от количества углеводных остатков они делятся на моногексозилцерамиды и олигогексозилцерамиды. В то время как в большинстве тканей спиртовой компонент церамида представлен 18-углеродными спиртами сфингозином (4-сфингенин) и дигидросфингозином (сфинганин), в гликосфинголипидах мозга (в основном в ганглиозидах) встречается значительное количество С20-гомологов сфингозина: С20-сфингозин (4-эйкозасфингенин) и С20-дигидросфингозин (эйкозасфинганин) [36]. Жирнокислотный состав гликосфинголипидов отличается от глицерофосфолипидов и в основном представлен насыщенными и мононенасыщенными длинноцепочечными жирными кислотами. В состав олигосахаридной цепи преимущественно входят галактоза, глюкоза, *N*-ацетил-глюкозамин и *N*-ацетил-галактозамин. Ганглиозиды дополнительно содержат остатки *N*-ацетилнейраминовой кислоты. Разнообразие строения данной группы липидов в ЦНС обусловлено возможностью существования более 200 вариаций в комбинации углеводов, а также существованием более 10 молекулярных видов церамидов [37].

Церамид – ключевое промежуточное соединение в биосинтезе всех сложных сфинголипидов. Кроме того, это соединение служит важным внутриклеточным мессенджером, играющим ключевую роль в регуляции клеточной пролиферации, дифференцировки и выживания, а также в индукции апоптоза, и незаменимо для нормального функционирования ЦНС [38, 39].

Функции олигогексозилцерамидов в нейронах связаны с рецепцией, распознаванием и связыванием чужеродных молекул, межклеточными взаимодействиями, что определяется олигосахаридной частью молекулы. Тем не менее растет количество данных, указывающих на то, что природа церамидной части также имеет важное значение для выполнения их функций [40, 41]. Состав церамида гарантирует, что липид займет строго определенное место в плазматической мембране и даст возможность образовать соответствующие водородные связи. Эти свойства церамидов, а также сродство к стеринам создают предпосылки для латеральной гетерогенности мембраны – созданию рафтов и микродоменов, способствующих процессам передачи сигнала [42, 43]. Многие биологические функции сфинголипидов опосредуются их расположением в рафтах, где они могут взаимодействовать со специфическими белками. Метаболиты сфинголипидов (особенно сфингозин-1-фосфат и церамид-1-фосфат) – мощные сигнальные молекулы, служащие внутриклеточными вторичными посредниками. Нарушение соотношения между этими метаболитами в пользу церамид-1-фосфата, обладающего проапоптотическим эффектом, играет важную роль в развитии нейродегенерации при таких заболеваниях, как болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона, латеральном амиотрофическом склерозе и др. [44].

Ганглиозиды – это класс олигогексозилцерамидов, основная масса которых сосредоточена именно в нервной ткани. Они составляют 10–12% от общего содержания липидов, тогда как в дру-

гих тканях их содержание не превышает 1–2% [45, 46]. Установлено, что 20–25% ганглиозидов сосредоточено в наружном монослое плазматических мембран нейронов. Главным образом они локализованы на наружной стороне пре- и постсинаптических мембран, принимающих непосредственное участие в передаче нервного импульса. Ганглиозиды также присутствуют и в других участках нейрональных и глиальных мембран.

Функции ганглиозидов чрезвычайно многообразны и до конца еще не изучены [46]. Необходимо отметить, что содержание и состав гликолипидов, в том числе ганглиозидов, существенно изменяется в процессе развития головного мозга [3]. Очевидно, что такие изменения липидного состава во время созревания мозга коррелируют со стадиями эмбриогенеза и раннего постнатального периода, и ганглиозиды играют решающую роль в развитии и функционировании нервной системы. Показано, что ганглиозиды участвуют в нейритогенезе [47, 48], росте и регенерации аксонов, образовании и стабильности миелина [49, 50], процессах адгезии [51], модуляции рецепторных функций (рецепторы инсулина [52], фактора роста нервов [53], эпидермального фактора роста [54]), в поддержании гомеостаза Ca^{2+} и трансдукции сигнала [55, 56]. Таким образом, ганглиозиды осуществляют различного рода контакты – как между нейронами, так и между нейронами и глией – с помощью узнавания специфических молекул на поверхности клеток и регуляции активности белков в рафтах плазматической мембраны [42].

Пониманию функциональной роли ганглиозидов способствовали результаты экспериментов с нокаутом генов гликозилтрансфераз, которые осуществляют синтез ганглиозидов. Наиболее выраженные эффекты наблюдались при нокауте глюкозилтрансферазы (КФ 2.4.1.80) – ключевого фермента биосинтеза, превращающего церамид в глюкозилцерамид. Такой нокаут приводил к летальному исходу в эмбриональный период, при этом эмбрионы достигали только стадии гаструляции [57].

Присутствие специфических липидов ЦНС – сфинголипидов – необходимо для реализации функций головного мозга, особенно в период его развития. Нарушение в системе их ферментативного расщепления приводит к ряду тяжелых нейропатологий, называемых сфинголипидозами. Во многих случаях накопление определенных сфинголипидов способствует расстройству функций нервной системы, которое наблюдается обычно уже в первые месяцы жизни и часто приводит к летальному исходу [58].

Содержание холестерина также необычайно высоко в головном мозге, при этом максимальный его уровень отмечается в миелине [59]. В нейронах наибольшее количество холестерина присутствует в пресинаптических пузырьках, где он способствует поддержанию формы этих везикул [60]. Участие в создании структуры рафтов объясняет важную роль холестерина в формировании и правильной локализации в нейрональных мембранах рецепторов нейромедиаторов и ионных каналов, в образовании сложных мультибелковых комплексов (например, PSD-95) в постсинаптической мембране и в других процессах, вовлеченных в реализацию специфических функций ЦНС [61]. Значение холестерина в мозге подчеркивается жесткой регуляцией его уровня, а также участием в синтезе жизненно важных сигнальных молекул [62]. Посттрансляционная модификация холестерином компонентов сигнальной системы hedgehog указывает на то, что этот липид необходим на определенных стадиях развития нервной системы [63]. Нельзя оставить без внимания и то, что холестерин выступает в роли предшественника сигнальных молекул, таких как нейроактивные стероиды и оксистеролы [10, 64].

Обращает на себя внимание и необычный жирнокислотный состав различных структур ЦНС, в частности среди жирных кислот мозга много длинноцепочечных и полиненасыщенных кислот [65, 66]. В мозге найдено свыше 40 редко встречающихся жирных кислот, в том числе гидроксикислоты и кислоты с нечетным числом атомов углерода. Именно жирные кислоты – наиболее вариабельная и быстро обновляющаяся структурная часть глицеро- и сфинголипидов. Разнообразное строение (разное число атомов углерода, насыщенные или ненасыщенные цепи, количество и место двойных связей в молекуле) служит основным фактором, определяющим огромное количество индивидуальных представителей каждого класса липидов (молекулярных видов) и различия их физико-химических свойств. Как уже говорилось выше, строение жирнокислотных цепей липидов – ключ к их влиянию на структуру мембран.

Нейрональная ткань весьма богата полиненасыщенными жирными кислотами (ПНЖК), которые по некоторым подсчетам составляют 15–30% от общего содержания жирных кислот. Из ненасыщенных жирных кислот в мозге чаще всего встречаются α-линоленовая (18:3 (n-3)), линолевая (18:2 (n-6)), эйкозапентаеновая (20:5 (n-3)), докозапентаеновые кислоты (22:5 (n-3) и (n-6)), а также докозагексаеновая (22:6 (n-3)) и арахидоновая (20:4 (n-6)) кислоты [67]. Выделены также ПНЖК с длиной цепи 24–36 углеродных атомов и содержащие от 4 до 6 двойных связей [68]. Однако преобладающие ПНЖК нейронов – 22:6 (n-3) и 20:4 (n-6), на долю которых приходится ~8 и 10–15% соответственно, а также докозапентаеновые кислоты (22:5 (n-3) и (n-6)) – ~2% [65, 67, 69]. Соотношение (n-3)/(n-6) в нейронах составляет 0.46–0.50. Большинство ПНЖК мозга накапливается в процессе его развития во время созревания нейронов и интенсивного синаптогенеза [3].

ПНЖК влияют на физико-химические свойства нейрональных мембран, такие как толщина

бислоя, упаковка ацильных цепей, фазовые переходы, включение холестерина в рафты, и таким образом оказывают воздействие на процессы нейротрансмиссии [70, 71]. Докозагексаеновая кислота необходима для нормального развития мозга, в частности, она поддерживает функциональное созревание зрительной коры и сетчатки. От ее присутствия зависит развитие когнитивных функций: 22:6 (n-3) играет решающую роль в поддержании долговременной потенциации, что лежит в основе процессов памяти и обучения [72, 73]. Экспериментально показана корреляция между уровнем ПНЖК (n-3)-серии (особенно 22:6) в плазме и когнитивными способностями [74, 75], в связи с чем предлагается их использование в качестве терапевтических средств при некоторых нейродегенеративных заболеваниях [76].

Некоторые ПНЖК, в первую очередь 20:4 (n-6), – предшественники различных липидных сигнальных молекул, включая эйкозаноиды, а также резолвины, протектины, нейропротектины и др., играющих важную роль в ангиогенезе, регуляции кровоснабжения мозга, апоптозе [69, 77]. С другой стороны, обогащенность нейронов ПНЖК делает их уязвимыми к окислительному стрессу, поскольку ПНЖК – субстрат перекисного окисления липидов [78, 79].

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ЛИПИДОВ НЕРВНОЙ ТКАНИ

Для метаболизма головного мозга, в отличие от других тканей организма, характерен низкий уровень митохондриального β-окисления жирных кислот, за исключением начального периода развития и становления ЦНС [3]. До сих пор ведется много споров, почему жирные кислоты не используются в качестве источника энергии во взрослом мозге, а основным энергетическим субстратом служит глюкоза [80]. Долгое время причиной этого считалось медленное прохождение жирных кислот через гематоэнцефалический барьер. Однако современные экспериментальные данные показывают, что жирные кислоты достаточно быстро попадают из крови в мозг [81]. Кроме того, и нейроны, и астроциты экспрессируют несколько мембранных переносчиков жирных кислот, таких как FATP1, FATP4 и CD36 [81, 82]. Низкая интенсивность β-окисления в нейронах может определяться невысокой скоростью переноса длинноцепочечных жирнокислотных KoA-эфиров через внутреннюю митохондриальную мембрану и низкой активностью во взрослом мозге ферментов β-окисления [80]. Кроме того, в последнее время считается, что β-окисление сопровождается возникновением окислительного стресса, к которому нейроны очень чувствительны. Высказываются предположения, что именно поэтому данный процесс имеет такую низкую интенсивность в нейронах, и этот тип окисления жирных кислот в основном протекает в астроцитах [83, 84].

Нейроны также не используют в качестве энергетического субстрата кетоновые тела, однако это условие не соблюдается на ранних этапах развития и в условиях тяжелого стресса [3]. Например, при гипогликемии кетоновые тела становятся важным источником энергии для мозга, поскольку, как упоминалось выше, этот орган не может эффективно окислять жирные кислоты. Процесс кетогенеза осуществляется преимущественно в клетках печени, и кетоновые тела транспортируются в мозг. Процесс кетолиза и образование ацетил-KoA происходит в астроцитах, которые снабжают им нейроны для последующего синтеза АТФ [85].

Еще одна особенность метаболизма головного мозга заключается в том, что, в отличие от печени и других периферических тканей, почти 95% холестерина здесь синтезируется *de novo*, только очень небольшое количество может транспортироваться в мозг кровотоком в виде комплексов с липопротеинами (ЛП) высокой плотности [64]. Несмотря на высокое содержание, скорость метаболизма холестерина в головном мозге по сравнению с другими тканями невысока. Однако биосинтез этого липида протекает с высокой интенсивностью на ранних этапах развития мозга и в основном совпадает с периодом миелинизации. У взрослых животных скорость биосинтеза холестерина снижается в десятки раз [3].

Несмотря на то что ферменты биосинтеза холестерина присутствуют в обоих типах клеток, интенсивность его образования в нейронах ниже по сравнению с астроцитами, что может быть обусловлено высокой энергозатратностью этого процесса [86]. Астроциты не только активно синтезируют холестерин, но и поставляют его в нейроны в составе ЛП, содержащих аполипопротеин E [64]. При этом холестерин, синтезируемый в астроцитах, активно используется для формирования мембран в ходе синаптогенеза не только в развивающемся, но и во взрослом мозге [87].

Интересно отметить, что нейроны и астроциты используют разные постскваленовые этапы биосинтеза, различающиеся непосредственными предшественниками холестерина: в нейронах это так называемый путь Кандуч–Рассела, в то время как в астроцитах – путь Блоха [86]. Использование разных путей образования холестерина приводит к появлению разных промежуточных метаболитов, помимо самого холестерина. Эти соединения обладают разной биологической активностью и могут быть использованы нейронами в своих целях [88]. На клеточных культурах было показано, что в самих нейронах синтез холестерина протекает в соме клетки, и далее он транспортируется вдоль аксона с помощью невезикулярного транспорта [89]. Нейроны содержат также холестерин-24-гидроксилазу (CYP46A1, КФ 1.14.13.98), которая

Таблица 1. Некоторые функции липидов в центральной нервной системе (по данным Benjamins et al. [9] и Tracey et al. [96], с изменениями)

Классы липидов	Тип клетки	Функции
Глицерофосфолипиды		
Фосфатидная кислота	Нейроны	Контроль формы мембраны, сигнальные функции
	Астроциты	Рост нейритов и ветвление дендритов, сигнальные функции
Фосфатидилхолины (серое вещество – 30.1%, белое вещество – 15%*)	Нейроны	Контроль формы и текучести мембраны, источник холина для синтеза нейромедиатора ацетилхолина, регуляция работы белков синаптических окончаний
Фосфатидилэтаноламины, включая плазмалогены (серое вещество – 27.1%, белое вещество – 23.9%)	Нейроны	Увеличение кривизны и повышение текучести мембраны, облегчение образования синаптических везикул и слияния с с пресинаптической мембраной, антиоксидантная функция (плазмалогены)
Фосфатидилсерины (серое вещество – 8.7%, белое вещество – 7.9%)	Нейроны	Взаимодействие с положительно заряженными белками
Фосфатидилглицерины, кардиолипины	Нейроны	Регуляция работы белков внутренней митохондриальной мембраны, поддержание мембранного потенциала митохондрий
Фосфатидилинозитиды (PI, PI4P, PI(4,5)P2) (серое вещество – 2.7%, белое вещество – 0.9%)	Нейроны	Регуляция передачи сигналов в синаптических окончаниях через взаимодействие с белками пре- и постсинаптической мембраны, запуск фосфоинозитидного сигнального пути через активацию фосфолипаз С
Сфинголипиды		
Сфингомиелин (серое вещество – 6.9%, белое вещество – 7.7%)	Нейроны	Участие в организации работы рафтов
	Олигодендроциты	Участие в образовании миелина
Церамиды	Нейроны	Участие в организации работы рафтов, сигнальные функции (в том числе связанные с образованием церамид-1-фосфата и сфингозин-1-фосфата)
Цереброзиды и сульфатиды (серое вещество – 5.4 и 1.7%, белое вещество – 19.8 и 5.5% соответственно)	Олигодендроциты	Участие в образовании и стабилизации миелина (основные миелиновые липиды)
Олигогексозилцерамиды, включая ганглиозиды	Нейроны	Регуляция работы рецепторов, межклеточная адгезия, участие в синаптогенезе, нейрогенезе, процессах памяти и обучения
	Олигодендроциты	Межклеточная адгезия, участие в образовании и стабилизации миелина
Стероиды		
Холестерин (серое вещество – 22.0%, белое вещество – 27.5%)	Нейроны	Взаимодействие с фосфолипидами для регуляции текучести мембран в зависимости от температуры фазового перехода, участие в построении мембран, в организации и работе рафтов
	Астроциты	Синтез и транспорт холестерина в синаптические окончания и в олигодендроциты
	Олигодендроциты	Синтез холестерина и координация сборки миелиновых мембран во время периода интенсивной миелинизации, обеспечение стабильности миелина во взрослом мозге

Таблица 1. Окончание

Классы липидов	Тип клетки	Функции
Оксистеролы	Нейроны	Регуляция метаболизма холестерина, в том числе через образование 24(*S*)-гидроксихолестерина
Жирные кислоты		
Полиненасыщенные жирные кислоты (в том числе докозагексаеновая, эйкозапентаеновая, арахидоновая)	Нейроны	Поддержание текучести мембран, участие в организации рафтов, регуляция работы мембранных белков, образование биологически активных соединений (эйкозаноидов, докозаноидов, эндогенных лигандов каннабиноидных рецепторов), участие в развитии нервной системы, процессах обучения и памяти
	Астроциты	Метаболическая поддержка нейронов (процессы β-окисления и кетолиза)

* Процент от общего содержания липидов.

окисляет холестерин до 24(*S*)-гидроксихолестерина. Поскольку в мозге холестерин далее не метаболизируется, данный путь отвечает за выведение этого соединения из нейрональной ткани и играет решающую роль в контроле его гомеостаза. Изменения в экспрессии CYP46A1 отмечены при некоторых нейродегенеративных заболеваниях и нарушении когнитивных функций [90].

Следует подчеркнуть, что как избыток холестерина, так и его недостаток, особенно в период развития, отрицательно сказываются на работе ЦНС [91, 92]. Пониженное содержание холестерина связано, главным образом, с нарушением реакций его биосинтеза. К настоящему времени описаны восемь наследуемых дефектов ферментов, участвующих в образовании холестерина. В качестве примера можно привести синдром Смита–Лемли–Опица (SLOS) – наследственное заболевание, сопровождающееся серьезными неврологическими нарушениями, при котором врожденные пороки развития тесно связаны с метаболическими нарушениями в биосинтезе холестерина, приводящими к тяжелой инвалидности и даже смерти [93].

В последнее время большое внимание уделяется липидным каплям (lipid droplets), присутствующим в астроцитах. Липидные капли не только содержат большой пул липидов, необходимый для обеспечения нейронов энергией, но и служат резервуаром для окисленных жирных кислот, транспортируемых из этих клеток. Такой транспорт также осуществляется посредством аполипопротеин-содержащих ЛП. Предполагается, что в периоды интенсивной активности или устойчивого стресса нейроны могут индуцировать образование липидных капель в соседних астроцитах [94].

В табл. 1 кратко суммированы основные функции представителей разных классов липидов в клетках нервной системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Липиды играют значительную роль в функционировании клеток ЦНС. Они представляют собой чрезвычайно гетерогенную группу соединений, что обусловливает большое разнообразие выполняемых ими биологических функций. Реализация функций центральной нервной системы, включающих в себя процессы обучения, памяти, а также прямую и опосредованную эндокринными железами регуляцию функций других органов, достигается величайшим разнообразием путей высвобождения медиаторов и нейромодуляторов, их рецепции, возникновения и распространения потенциала действия. Все это в значительной мере определяется липидным составом мембран, присутствием определенных жирных кислот в составе липидов, а также метаболизмом липидов. Нарушения в структуре и регуляции липидного метаболизма приводят к развитию различных неврологических расстройств, включая биполярные расстройства, шизофрению, депрессивные состояния, аутизм, а также нейродегенеративные заболевания, такие как болезни Альцгеймера, Паркинсона, Ниманна–Пика, Хантингтона и др. [95]. Изменение липидного обмена также считается ключевым событием, которое способствует повреждению ЦНС. Поэтому дальнейшие исследования метаболизма липидов в различных клетках ЦНС, а также его регуляции внесут вклад в понимание участия липидов в развитие нейродегенеративных процессов и, возможно, позволят разработать пути нейропротекции.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2020-921 от 13.11.2020) в рамках проекта Научные центры мирового уровня Павловский центр “Интегративная физиология – медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям стрессоустойчивости”, на-

правление: “Биологические и социальные основы инклюзии”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fahy E., Cotter D., Sud M., Subramaniam S.* // Biochim. Biophys. Acta. 2011. V. 1811. P. 637–647. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.06.009
2. *Sastry P.S.* // Progr. Lipid Res. 1985. V. 24. P. 69–176.
3. *Галкина О.В., Путилина Ф.Е., Ещенко Н.Д.* // Нейрохимия. 2014. Т. 31. № 2. С. 1–7. [*Galkina O.V., Putilina F.E., Eshchenko N.D.* // Neurochemical Journal. 2014. V. 8. № 2. P. 83–88.] https://doi.org/10.1134/S1819712414020044
4. *Barres B.A.* // Neuron. 2008. V. 60. P. 430–440. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.013
5. *Brady S.T., Tai L.* // Basic Neurochemistry. Principles of Molecular, Cellular and Medical Neurobiology / Ed. Brady S.T. 8th ed. Acad. Press, 2012. P. 4–25. ISBN: 978-0-12-374947-5
6. *Jakel S., Dimou L.* // Front Cell Neurosci. 2017. V. 11. P. 24. https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00024
7. *Chaurand P., Cornett D.S., Angel P.M., Caprioli R.M.* // Mol. Cell Proteomics. 2011. V. 10. P. O110.004259. https://doi.org/10.1074/mcp.O110.004259
8. *Skowronska-Krawczyk D., Budin I.* // Exp. Gerontol. 2020. V. 131. P. 110817. https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.110817
9. *Benjamins J.A., Murphy E.J., Seyfried T.N.* // Basic Neurochemistry. Principles of Molecular, Cellular and Medical Neurobiology / Ed. Brady S.T. 8th ed. Acad. Press, 2012. P. 81–99. ISBN: 978-0-12-374947-5
10. *Naudí A., Cabré R., Jové M., Ayala V., Gonzalo H., Portero-Otín M., Ferrer I., Pamplona R.* // Int. Rev. Neurobiol. 2015. V. 122. P. 133–189. https://doi.org/10.1016/bs.irn.2015.05.008
11. *Bogdanov M., Dowhan W.* // EMBO J. 1998. V. 17. P. 5255–5264. https://doi.org/10.1093/emboj/17.18.5255
12. *Wang X., Li N., Liu B., Sun H., Chen T., Li H., Qiu J., Zhang L., Wan T., Cao X.* // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 45855–45864. https://doi.org/10.1074/jbc.M405147200
13. *Deleault N.R., Piro J.R., Walsh D.J., Wang F., Ma J., Geoghegan J.C., Supattapone S.* // PNAS. 2012. V. 109. P. 8546–8551. https://doi.org/10.1073/pnas.1204498109
14. *Farooqui A.A., Farooqui T., Horrocks L.A.* // Metabolism and Functions of Bioactive Ether Lipids in the Brain. New-York: Springer, 2008. 280 p. ISBN 978-0-387-77401-5
15. *Braverman N.E., Moser A.B.* // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1822. P. 1442–1452. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.008
16. *Dean J.M., Lodhi I.J.* // Protein Cell. 2018. V. 9. P. 196–206. https://doi.org/10.1007/s13238-017-0423-5
17. *Hossain M.S., Abe Y., Ali F., Youssef M., Honsho M., Fujiki Y., Katafuchi T.* // J. Neurosci. 2017. V. 37. P. 4074–4092. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3941-15.2017
18. *Grimm M.O., Kuchenbecker J., Rothhaar T.L., Grösgen S., Hundsdörfer B., Burg V.K., Friess P., Müller U., Grimm H.S., Riemenschneider M., Hartmann T.* // J. Neurochem. 2011. V. 116. P. 916–925. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07070.x
19. *Winckler B., Poo M.* // Nature. 1996. V. 379. P. 213. https://doi.org/10.1038/379213a0
20. *Kuge H., Akahori K., Yagyu K., Honke K.* // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. P. 26783–26793. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.571075
21. *Heacock A.M., Fisher S.K.* // Basic Neurochemistry. Principles of Molecular, Cellular and Medical Neurobiology / Ed. Brady S.T. 8th ed. Acad. Press, 2012. P. 442–453. ISBN: 978-0-12-374947-5
22. *Frere S.G., Chang-Ileto B., Di Paolo G.* // Subcell. Biochem. 2012. V. 59. P. 131–175. https://doi.org/10.1007/978-94-007-3015-1_5
23. *Micheva K.D., Holz R.W., Smith S.J.* // J. Biol. Chem. 2001. V. 154. P. 355–368. https://doi.org/10.1083/jcb.200102098
24. *Ammar M., Kassas N., Chasserot-Golaz S., Bader M.F., Vitale N.* // Front. Endocrinol. 2013. V. 4. P. 125. https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00125
25. *Jang J.H., Lee C.S., Hwang D., Ryu S.H.* // Progr. Lipid Res. 2012. V. 51. P. 71–81. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.003
26. *Ammar M., Kassas N., Bader M.F., Vitale N.* // Biochimie. 2014. V. 107. P. 51–57. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.07.026
27. *Postila P.A., Róg T.* // Mol. Neurobiol. 2020. V. 57. P. 910–925. https://doi.org/10.1007/s12035-019-01775-7
28. *Ball W.B., Neff J.K., Gohil V.M.* // FEBS Letts. 2018. V. 592. P. 1273–1290. https://doi.org/10.1002/1873-3468.12887
29. *Oemer G., Koch J., Wohlfarter Y., Alam M.T., Lackner K., Sailer S., Neumann L., Lindner H.H., Watschinger K., Haltmeier M., Werner E.R., Zschocke J., Keller M.A.* // Cell Rep. 2020. V. 30. P. 4281–4291. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.115
30. *Pointer C.B., Klegeris A.* // Cell. Mol. Neurobiol. 2017. V. 37. P. 1161–1172. https://doi.org/10.1007/s10571-016-0458-9
31. *Sathappa M., Alder N.N.* // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1858. P. 1362–1372. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.03.007
32. *Ghio S., Kamp F., Cauchi R., Giese A., Vassallo N.* // Progr. Lipid Res. 2016. V. 61. P. 73–82. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.10.005
33. *Kiebish M.A., Han X., Cheng H., Lunceford A., Clarke C.F., Moon H., Chuang J.H., Seyfried T.N.* // J. Neurochem. 2008. V. 106. P. 299–312. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05383.x

34. *Chu C.T., Bayir H., Kagan V.E.* // Autophagy. 2014. V. 10. P. 376–378. https://doi.org/10.4161/auto.27191
35. *Petrosillo G., Matera M., Casanova G., Ruggiero F.M., Paradies G.* // Neurochem. Int. 2008. V. 53. P. 126–131. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2008.07.001
36. *Sonnino S., Chigorno V.* // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1469. P. 63–77. https://doi.org/10.1016/s0005-2736(00)00210-8
37. *Yu R.K., Tsai Y.T., Ariga T., Yanagisawa M.* // J. Oleo. Sci. 2011. V. 60. P. 537–544. https://doi.org/10.5650/jos.60.537
38. *Echten-Deckert G., Herget T.* // Biochim. Biophys. Acta. 2006. V. 1758. P. 1978–1994. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.06.009
39. *Mencarelli C., Martinez-Martinez P.* // Cell. Mol. Life Sci. 2013. V. 70. P. 181–203. https://doi.org/10.1007/s00018-012-1038-x
40. *Colsch B., Jackson S.N., Dutta S., Woods A.S.* // ACS Chem. Neurosci. 2011. V. 2. P. 213–222. https://doi.org/10.1021/cn100096h
41. *Alonso A., Goñi F.M.* // Annu. Rev. Biophys. 2018. V. 20. P. 633–654. https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070317-033309
42. *Posse de Chaves E., Sipione S.* // FEBS Letts. 2010. V. 584. P. 1748–1759. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.12.010
43. *Bouscary A., Quessada C., René F., Spedding M., Turner B.J., Henriques A., Ngo S.T., Loeffler J.-P.* // Seminars in Cell & Developmental Biology. 2021. V. 112. P. 82–91. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.10.008
44. *Czubowicz K., Jęśko H., Wencel P., Lukiw W.J., Strosznajder R.P.* // Mol. Neurobiol. 2019. V. 56. P. 5436–5455. https://doi.org/10.1007/s12035-018-1448-3
45. *Kolter T.* // International Scholarly Research Network. ISRN Biochemistry. 2012. V. 2012. P. 506160. https://doi.org/10.5402/2012/506160
46. *Sipione S., Monyror J., Galleguillos D., Steinberg N., Kadam V.* // Front. Neurosci. 2020. V. 14. P.1004. https://doi.org/10.3389/fnins.2020.572965
47. *Skaper S.D., Katoh-Semba R., Varon S.* // Brain Res. 1985. V. 55. P. 19–26.
48. *Da Silva J.S., Hasegawa T., Miyagi T., Dotti C.G., Abad-Rodriguez J.* // Nat. Neurosci. 2005. V. 8. P. 606–615. https://doi.org/10.1038/nn1442
49. *Mehta N.R., Nguyen T., Bullen J.W., Jr., Griffin J.W., Schnaar R.L.* // ACS Chem. Neurosci. 2010. V. 1. P. 215–222. https://doi.org/10.1021/cn900029p
50. *Schnaar R.L.* // FEBS Letts. 2010. V. 584. P. 1741–1747. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.011
51. *Doherty P., Ashton S.V., Skaper S.D., Leon A., Walsh F.S.* // J. Cell Biol. 1992. V. 117. P. 1093–1099. https://doi.org/10.1083/jcb.117.5.1093
52. *Pomytkin I., Costa-Nunes J.P., Kasatkin V., Veniaminova E., Demchenko A., Lyundup A., Lesch K.P., Ponomarev E.D., Strekalova T.* // CNS Neurosci. Ther. 2018. V. 24. P. 763–774. https://doi.org/10.1111/cns.12866
53. *Nishio M., Fukumoto S., Furukawa K., Ichimura A., Miyazaki H., Kusunoki S., Urano T., Furukawa K.* // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 33368–33378. https://doi.org/10.1074/jbc.M403816200
54. *Kaucic K., Liu Y., Ladisch S.* // Methods Enzymol. 2006. V. 417. P. 168–185. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)17013-5
55. *Tanaka Y., Waki H., Kon K., Ando S.* // Neuroreport. 1997. V. 8. P. 2203–2207.
56. *Ledeen R.W., Wu G.* // Neurochem. Res. 2002 V. 27. P. 637–647. https://doi.org/10.1023/a:1020224016830
57. *Allende M.L., Proia R.L.* // Glycoconjugate J. 2014. V. 31. P. 613–622. https://doi.org/10.1007/s10719-014-9563-5
58. *Kolter T., Sandhoff K.* // Biochim. Biophys. Acta. 2006. V. 1758. P. 2057–2079. https://doi.org/10.1007/s10719-014-9563-5
59. *Dietschy J.M., Turley S.D.* // J. Lipid Res. 2004. V. 45. P. 1375–1397. https://doi.org/10.1194/jlr.R400004-JLR200
60. *Takamori S., Holt M., Stenius K., Lemke E.A., Gronborg M., Riedel D., Urlaub H., Schenck S., Brügger B., Ringler P., Müller S.A., Rammner B., Gräter F., Hub J.S., De Groot B.L., Mieskes G., Moriyama Y., Klingauf J., Grubmüller H., Heuser J., Wieland F., Jahn R.* // Cell. 2006. V. 127. P. 831–846. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.030
61. *Sooksawate T., Simmonds M.A.* // Neuropharmacol. 2001. V. 40. P. 178–184. https://doi.org/10.1016/s0028-3908(00)00159-3
62. *Korade Z., Kenworthy A.* // Neuropharmacology. 2008. V. 55. P. 1265–1273. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.02.019
63. *Eitan E., Petralia R.S., Wang Y.X., Indig F.E., Mattson M.P., Yao P.J.* // Biol. Open. 2016. V. 5. P. 1086–1092. https://doi.org/10.1242/bio.019422
64. *Pfrieger F.W., Ungerer N.* // Progr. Lipid Res. 2011. V. 50. P. 357–371. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.06.002
65. *Neuringer M., Anderson G., Connor W.* // Annu. Rev. Nutr. 1988. V. 8. P. 517–541. https://doi.org/10.1146/annurev.nu.08.070188.002505
66. *Farooqui A.A.* // In: Beneficial Effects of Fish Oil on Human Brain. New York, NY: Springer, 2009. P. 151–187. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0543-7_5
67. *Joffre C.* // In: Feed Your Mind. How Does Nutrition Modulate Brain Function throughout Life? / Ed. Bosch-Bouju C., Layé S., Pallet V. IntechOpen, 2019. https://doi.org/10.5772/intechopen.88232
68. *Aveldaño M.I.* // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 1172–1179.
69. *Bazinet R.P., Layé S.* // Nat. Rev. Neurosci. 2014. V. 15. P. 771–785. https://doi.org/10.1038/nrn3820
70. *Rapoport S.I., Ramadan E., Basselin M.* // Prostaglandins & Other Lipid Mediators. 2011. V. 96. P. 109–113. https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2011.06.003
71. *Innis S.M.* // Brain Res. 2008. V. 1237. P. 35–43. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.08.078
72. *Su H.-M.* // J. Nutr. Biochem. 2010. V. 21. P. 364–373. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.11.003
73. *Barcelo-Coblijn G., Murphy E.J.* // Progr. Lipid Res. 2009. V. 48. P. 355–374. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.07.002

74. *Lim S.Y., Hoshiba J., Moriguchi T., Salem J.N.* // Pediatr. Res. 2005. V. 584. P. 741–748. https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000180547.46725.CC

75. *Moriguchi T., Salem J.N.* // J. Neurochem. 2003. V. 872. P. 297–309. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01966.x

76. *Ajith T.A.* // Curr. Clin. Pharmacol. 2018. V. 13. P. 252–260. https://doi.org/10.2174/1574884713666180807145648

77. *Phillis J.W., Horrocks L.A., Farooqui A.A.* // Brain Res. Rev. 2006. V. 52. P. 201–243. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.02.002

78. *Галкина О.В.* // Нейрохимия. 2013. № 2. С. 93–102. [*Galkina O.V.* // Neurochemical J. 2013. V. 7. № 2. P. 89–97.] https://doi.org/10.7868/S1027813313020027

79. *Galkina O.* // Int. J. Neurol. Res. 2015. V. 1. P. 123–128. https://doi.org/10.17554/j.issn.2313-5611.2015.01.26

80. *Schonfeld P., Reiser G.* // Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 2013. V. 33. P. 1493–1499. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.128

81. *Bruce K.D., Zsombok A., Eckel R.H.* // Front. Endocrinol. 2017. V. 8. P. 60. https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00060

82. *Le Foll C., Irani B.G., Magnan C., Dunn-Meynell A.A., Levin B.E.* // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2009. V. 297. P. R655–R664. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00223.2009

83. *Waniewski R.A., Martin D.L.* // J. Neurosci. 1998. V. 18. P. 5225–5233. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-14-05225.1998

84. *Speijer D., Manjeri G.R., Szklarczyk R.* // Phil.Trans. R. Soc. B. 2014. V. 369. P. 20130446. https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0446

85. *McPherson P.A., McEneny J.* // J. Physiol. Biochem. 2012. V. 68. P. 141–151. https://doi.org/10.1007/s13105-011-0112-4

86. *Nieweg K., Schaller H., Pfrieger F.W.* // J. Neurochem. 2009. V. 109. P. 125–134. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05917.x

87. *Göritz C., Mauch D.H., Nägler K., Pfrieger F.W.* // J. Physiol. Paris. 2002. V. 96. P. 257–263. https://doi.org/10.1016/s0928-4257(02)00014-1

88. *Moutinho M., Nunes M.J., Rodrigues E.* // Exp. Cell Res. 2017. V. 360. P. 55–60. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.02.034

89. *de Chaves E.I., Rusinol A.E., Vance D.E., Campenot R.B., Vance J.E.* // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 30766–30773. https://doi.org/10.1074/jbc.272.49.30766

90. *Moutinho M., Nunes M.J., Correia J., Gama M., Castro-Caldas M., Cedazo-Minguez A.,Rodrigues C.M., Björkhem I., Ruas J.L., Rodrigues E.* // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 30928. https://doi.org/10.1038/srep30928

91. *Cartocci V., Servadio M., Trezza V., Pallottini V.* // J. Cell Physiol. 2017. V. 232. P. 281–286. https://doi.org/10.1002/jcp.25488

92. *Luo J., Yang H., Song B.L.* // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2020. V. 21. P. 225–245. https://doi.org/10.1038/s41580-019-0190-7

93. *Herman G.E.* // Human Molecular Genetics. 2003. V. 12. P. R75–R88. https://doi.org/10.1093/hmg/ddg072

94. *Teixeira V., Maciel P., Costa V.* // Biochim. Biophys. Acta. 2021. V. 1866. P. 158820. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158820

95. *Adibhatla R.M., Hatcher J.F.* // Future Lipidology. 2007. V. 2. P. 403–422. https://doi.org/10.2217/17460875.2.4.403

96. *Tracey T.J., Kirk S.E., Steyn F.J., Ngo S.T.* // Seminars in Cell & Developmental Biology. 2021. V. 112. P. 69–81. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.08.012

The Role of Lipids in Realization of Specific Functions in the Central Nervous System

O. V. Galkina*, #, O. V. Vetrovoy*, **, and N. D. Eschenko*

#Phone: +7 (812) 328-21-82; e-mail: o.v.galkina@spbu.ru

**Saint-Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia*

***Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, nab. Makarova 6, St. Petersburg, 199034 Russia*

The review article is devoted to the peculiarities of the lipid composition of the brain and the description of the specific functions of lipids in ensuring the activity of the nervous system. Lipids are an extremely heterogeneous group of molecules, which leads to a wide variety of biological functions they perform. The realization of the functions of the central nervous system, including the processes of learning, memory, decision-making, as well as direct and mediated by the endocrine glands regulation of the other organs functions, is achieved by the greatest variety of ways for the release of mediators and neuromodulators, their reception, the emergence and distribution of the action potential. All this, in turn, is determined by the lipid composition of membranes, the presence of certain fatty acids in the lipid composition, as well as lipid metabolism. This review will focus on the role of lipids in neurons.

Keywords: central nervous system, brain, neurons, astrocytes, lipids, lipid metabolism

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 5, с. 566–572

ДИСКУССИЯ

УДК 577.112.6:577.112.4:608.1

ЗАЗЕРКАЛЬЕ БИОТЕХНОЛОГИИ: D-БЕЛКИ КАК ОБЪЕКТЫ ПАТЕНТНОЙ ОХРАНЫ

© 2021 г. И. Б. Никитина*, #, И. В. Горетова*, И. В. Федосеев*

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

Поступила в редакцию 10.11.2020 г.
После доработки 28.11.2020 г.
Принята к публикации 01.12.2020 г.

Статья посвящена патентованию белков, включающих D-изоформы аминокислот, возможным проблемам и перспективам. Ввиду удешевления процесса твердофазного синтеза и появления модифицированных рибосом, способных использовать нестандартные аминокислоты для рибосомного синтеза, технологии биосинтеза белковых конструкций с нестандартными аминокислотами в их составе относятся к наиболее перспективным и быстроразвивающимся направлениям биотехнологии, наравне с технологиями редактирования генома. В статье приведены материалы, указывающие на актуальность и интерес изобретателей к этой области. Поскольку изменение аминокислотной последовательности известного белка, состоящей из цепочки L-аминокислот, путем замены исходных L-аминокислот на D-стереоизомеры приводит к существенным и часто неожиданным функциональным и физико-химическим изменениям белка, это открывает широкие перспективы для создания новых лекарственных препаратов, ферментов, пестицидов и иных белковых продуктов, использующихся в медицине, пищевой, сельскохозяйственной и легкой промышленности. Также в статье затронута тема изменения стандартов Всемирной организации интеллектуальной собственности (ВОИС), касающихся представления последовательностей, в части отображения D-аминокислот в последовательностях согласно стандарту ST.25 или ST.26 ВОИС. Описаны потенциальные проблемы, которые могут возникать в процессе патентной экспертизы при рассмотрении подобных заявок, например, в случае идентичных последовательностей D- и L-белков, обладающих разными биологическими свойствами.

Ключевые слова: D-белок, D-аминокислота, D-форма, зеркальный белок, стереохимия, изомеры, перечень последовательностей аминокислот, патент

DOI: 10.31857/S0132342321050328

ВВЕДЕНИЕ

Как известно, олигопептиды, полипептиды и белки состоят из аминокислотных остатков, ковалентно соединенных между собой пептидными связями [1]. В рибосомном синтезе белков преимущественно принимают участие 20 стандартных, так называемых канонических аминокислот, кодируемых триплетным кодом. Расположение заместителей вокруг α-атома углерода определяет хиральность (или конфигурацию) каждого аминокислотного остатка. В случае стандартных аминокислот (кроме глицина) существуют так называемые D- и L-стереоизомеры; в изолейцине и треонине присутствует второй хиральный центр в β-атоме углерода, что дает два дополнительных стереоизомера.

В живых организмах в рибосомном синтезе белков принимают участие L-изомеры. Строение рибосом и тРНК высококонсервативно и схоже для всех живых организмов, что определяет L-изомерную чистоту природных белков и не допускает биологический синтез белков, построенных из D-аминокислотных остатков (D-белки). В то же время в некоторых белках было обнаружено присутствие D-аминокислот, что обусловливается уже последующими посттрансляционными модификациями L-аминокислот в белковой цепи.

Исследования, проводимые в последние десятилетия, показали, что биологическая активность L- и D-энантиомеров различается, причем отличия – довольно существенные [2, 3]. Впервые данные различия были установлены для полипептидов, специфично связывающихся с лигандами, среди которых D-полипептиды и природные L-полипептиды проявляли разные свойства хиральной специфичности на определенных субстратах. В частности, D-белки не связываются с

Сокращения: ВОИС – Всемирная организация интеллектуальной собственности (WIPO); PCT – Договор о патентной кооперации (Patent Cooperation Treaty).

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (499) 240-61-32; эл. почта: otd1331@rupto.ru).

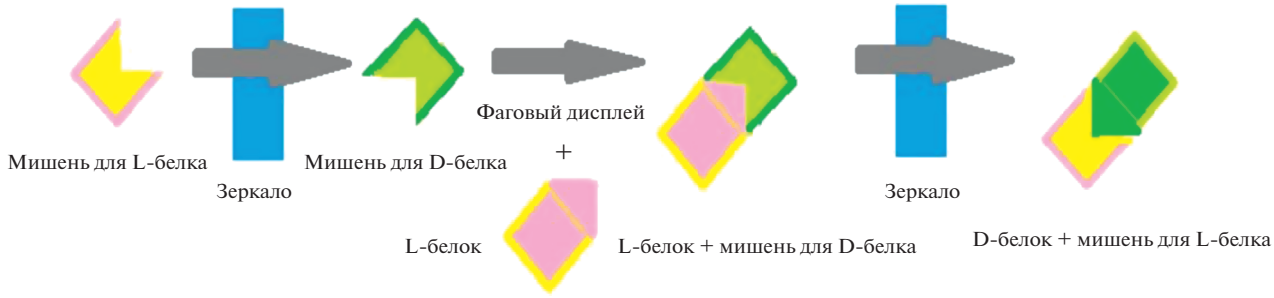


Рис. 1. Принцип работы зеркального фагового дисплея.

лигандами, характерными для их L-изомеров, однако связываются с соответствующими D-изомерами таких лигандов. Было показано, что это свойство D-белков, скорее всего, обусловливает их устойчивость к протеолитическим ферментам [4].

Свойства D-белков – обширная и недостаточно изученная область белковой инженерии. Исследования в этой области могут привести к обнаружению большого множества потенциальных объектов патентной защиты.

Обнаруженные различные свойства хиральной специфичности L- и D-белков и полипептидов открыли, по меньшей мере, следующие перспективы в медицинской биотехнологии: создание более устойчивых к эндогенному протеолизу форм терапевтически активных белков, выступающих основой пролонгированных форм лекарственных средств с минимальными побочными эффектами; возможность создания новых терапевтически активных белков, обладающих уникальными свойствами и не имеющих известных L-аналогов.

Было показано, что введение D-аминокислотных остатков меняет спектр активности белков. Так, на основе микробных полипептидов, содержащих D-аминокислоты, были разработаны новые типы антибиотиков [5, 6], отличающиеся высокой эффективностью и продолжительностью действия. К таким антибиотикам относятся грамицидин, бацитрацин, актиномицин, валиномицин и многие другие. Они разрушают мембраны бактериальных клеток путем формирования ионных каналов [7].

Также созданы полипептиды, состоящие исключительно из D-аминокислот, способные специфично связываться с L-белком-мишенью [8]. Так, полипептид FOXO4 DRI (энантиомер фрагмента транскрипционного фактора fork head box O4), полностью состоящий из D-аминокислот, в отличие от пептида с идентичной аминокислотной последовательностью в L-изоформе, селективно устранял стареющие клетки дозозависимым образом посредством ингибирования ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1), а также значительно усиливал способность вемурафениба и траметиниба уничтожать устойчивые к терапии клетки меланомы LOX-IMVI.

Создание белков, содержащих отдельные D-аминокислоты или полностью состоящих из D-аминокислот, стало возможным благодаря развитию технологий синтеза белковых конструкций. К ним относятся удешевление процесса твердофазного синтеза и развитие технологии зеркального фазового дисплея, а также появление модифицированных рибосом, способных использовать D-аминокислоты.

Зеркальный фаговый дисплей, базирующийся на классическом фаговом дисплее, представляет собой способ проведения скрининга больших библиотек D-пептидов, способных связываться с L-белками. Если L-пептид связывается с D-мишенью, то D-пептид связывается с L-мишенью [2, 9]. При проведении скрининга последовательность ДНК, кодирующую необходимый пептид, сливают с геном белков оболочки бактериофагов и вводят в вектор. Гены слитных белков экспрессируют, продукт биосинтеза очищают и наносят на поверхность, содержащую иммобилизованные D-белки-мишени. Несвязавшиеся пептиды смывают, а оставшиеся элюируют. Бактериофаги не способны продуцировать D-пептиды, поэтому иммобилизуют именно D-белки, синтезируемые химическим путем. Принцип работы зеркального фагового дисплея схематично представлен на рис. 1.

Ограничения твердофазного синтеза не позволяют создавать крупные белки, поэтому в последнее время особое внимание уделяется возможности рибосомного синтеза D-пептидов и белков. Так, исследования ведутся как в области модификации рибосом, которые позволяют последним взаимодействовать с нестандартными аминокислотами, в том числе с D-аминокислотами, например, за счет мутаций в пептидилтрансферазном центре 23S рРНК рибосом *Escherichia coli* [10], так и в области оптимизации тРНК, несущих необходимые D-аминокислоты, например, в части подбора соответствующих аминоацил-тРНК-синтетаз или рибозимов [11].

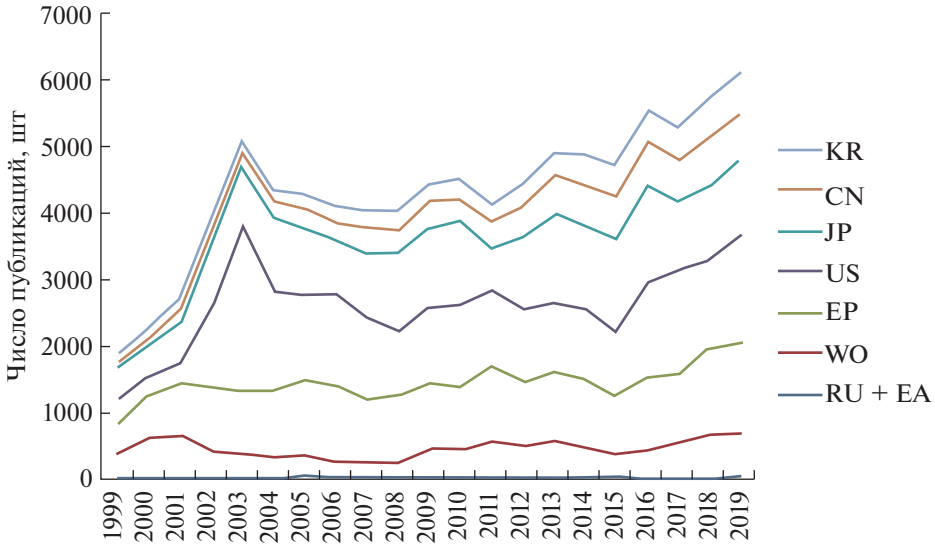


Рис. 2. Динамика публикаций патентных документов на D-белки за 1999–2019 гг. по странам. KR – патентное ведомство Республики Корея; CN – патентное ведомство Китайской Народной Республики; JP – патентное ведомство Японии; US – патентное ведомство США; EP – Европейское Патентное Ведомство; WO – Всемирная организация интеллектуальной собственности (ВОИС); RU + EA – патентное ведомство России (Роспатент) и Евразийское патентное ведомство (ЕАПВ).

Таким образом, в ближайшем будущем возможно создание высокоэффективной системы рибосомного синтеза D-белков, что, естественно, будет стимулировать привлечение инвестиций для инновационных разработок и приведет к увеличению количества патентных заявок в данной области.

Цель данной работы – анализ возможностей патентования белковых объектов, включающих D-формы аминокислот, с выявлением проблематики и перспектив в данной области биотехнологий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Открытие различий в хиральной специфичности L- и D-изомеров аминокислот стимулировало появление патентов на D-белки.

Наибольшую инновационную привлекательность обусловливает тот факт, что биологическая активность белка в D-форме, как правило, не будет идентична его биологической активности в L-форме. При этом невозможно однозначно прогнозировать характер изменений биологической активности D-энантиомеров белков только на основании гомологии их аминокислотных последовательностей с L-энантиомерами.

В качестве наглядного подтверждения можно привести результаты недавнего исследования свойств хиральной специфичности олигопептидных молекул, которые продемонстрировали неожиданное изменение биологических свойств пептидов на прямо противоположные [12]. Так, дипептиды в L-форме (L-Glu–L-Trp-OH, L-Glu–(L-Trp-OH)-OH) и их стереоизомеры в D-форме (D-Glu–D-Trp-OH, D-Glu–(D-Trp-OH)-OH) демонстрировали противоположные свойства: L-пептиды проявляли иммуностимулирующий эффект, в то время как D-пептиды – иммуносупрессивный.

Следовательно, весь имеющийся пласт информации о строении L-белков и о проявлении ими биологических функций, исходя из особенностей их структуры, не может быть экстраполирован на функционирование их D-изоформ при разработке новых структур D-белков, что открывает значительные перспективы в патентовании изобретений в данной области биотехнологий.

Анализ патентной активности в области изобретений, относящихся к белковым объектам, включающим D-формы аминокислот, показал стабильную динамику роста публикаций патентных документов, включая опубликованные заявки и патенты, за последние двадцать лет – с 1999 по 2019 гг. – по патентным ведомствам стран, входящих в IP-5 (пять офисов интеллектуальной собственности), а также России и международным патентным ведомствам – Всемирной организации интеллектуальной собственности (ВОИС) и Евразийскому патентному ведомству (рис. 2).

Выбранные для анализа патентной активности в рамках данной статьи патентные ведомства указанных стран наиболее полно отражают ситуацию на рынке интеллектуальной собственности. Так, ведомства IP5 совместно обрабатывают ~80% мировых патентных заявок и 95% междуна-

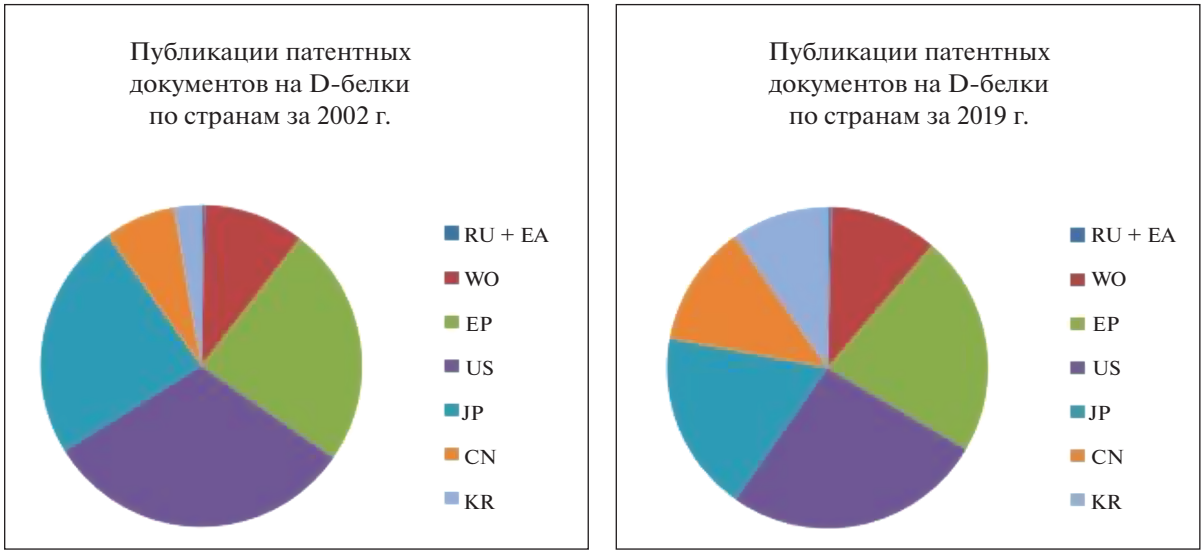


Рис. 3. Соотношения публикаций патентных документов на D-белки по странам в 2002 и 2019 гг. Расшифровку обозначений см. в подписи к рис. 2.

родных заявок, поданных в соответствии с Договором о патентной кооперации (PCT). Члены IP5 – Европейское патентное ведомство (ЕПВ), Патентное ведомство Японии (JPO), Корейское ведомство интеллектуальной собственности (KIPO), Национальное управление интеллектуальной собственностью Китайской Народной Республики (CNIPA) и Ведомство США по патентам и товарным знакам (USPTO).

Выявлены два основных пика активности в начале и конце исследуемого временного периода и незначительные колебания в середине. Первый пик можно наблюдать с начала 2000-х гг., что, наиболее вероятно, связано с описанием различий в свойствах хиральной специфичности L- и D-аминокислот [2, 3], которое привело к интенсификации научных исследований в данной области биотехнологий и активной коммерциализации результатов в виде патентов на D-белки с новыми свойствами. Однако получение D-стереоизомеров белков в те годы было сопряжено со значительными трудностями их синтеза, сложно масштабируемого и требующего значительных финансовых затрат, что обусловливает спад активности и некоторую стагнацию в середине 2000-х гг.

Развитие технологий твердофазного синтеза привело к росту числа патентов о D-белках. С 2016 г. наметился значительный рост публикаций патентных документов в данной области, который сохраняется последние несколько лет. Увеличение за последние годы количества патентных документов на изобретения, относящиеся к D-белкам, связано с развитием технологий автоматизированного твердофазного синтеза полипептидов, благодаря которым становится широкодоступным создание непосредственно молекул D-полипептидов. С помощью технологии зеркального фагового дисплея можно проводить моделирование структур белков, включающих D-энантиомеры аминокислот. Также возможно создание полностью зеркальных белков, т.е. белков, характеризуемых одинаковой аминокислотной последовательностью, но отличающихся оптическими изомерами аминокислот и биологическими свойствами.

Динамика публикации патентов, посвященных D-белкам, в разных странах за последние 20 лет. Имеющиеся данные позволяют сделать вывод об огромном потенциале разработок с использованием D-белков и повышении интереса изобретателей к данной области. Так, если исходить из соотношения публикаций патентных документов, относящихся к изобретениям в области D-белков, по странам в периоды подъема активности в 2002 и 2019 гг., то можно судить о том, что бесспорные лидеры – изобретатели США. Чуть менее, но все же достаточно активны изобретатели, подающие заявки в Европейское патентное ведомство и Патентное ведомство Японии, за ними следуют Китай, Республика Корея, и, конечно, вызывает интерес подача международных заявок по системе PCT. Можно заметить интерес к патентованию в России и на территориях, охватываемых патентами Евразийского патентного ведомства, но в значительно меньшей степени, что говорит о развивающемся рынке технологий (рис. 3).

Отдельно обращает на себя внимание изменение соотношений публикационной активности по странам в периоды подъема интереса к патентованию изобретений в области D-белков, а

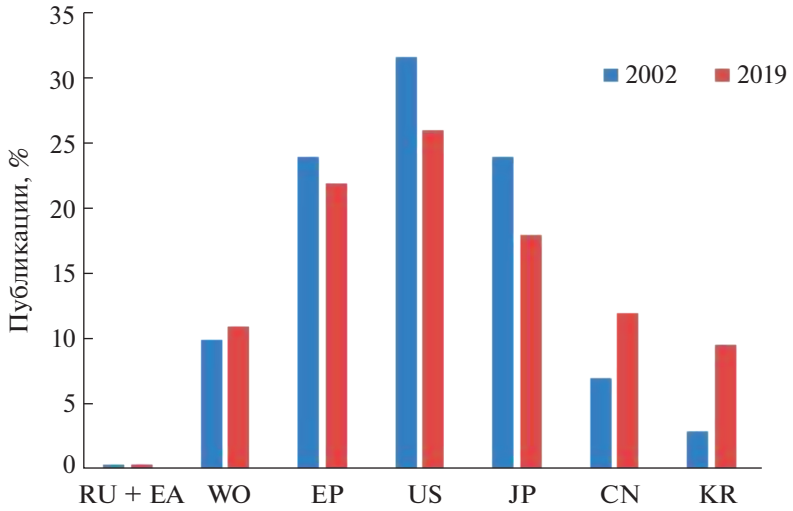


Рис. 4. Патентная активность в области D-белков по странам в 2002 и 2019 гг. Расшифровку обозначений см. в подписи к рис. 2.

именно в 2002 и 2019 гг., в процентах к общему числу публикаций по выбранным для анализа странам. Так, у ряда наиболее активных в патентовании D-белков стран несколько снизился интерес к данной области: США понизили активность с 32% в 2002 г. до 26% в 2019 г., как Япония – с 24 до 18% и Европа – с 24 до 22% соответственно. Однако значительно возросла активность в Республике Корея – с 3% в 2002 г. до 10% в 2019 г. и КНР – с 7 до 12%, число международных заявок также увеличилось – с 10 до 11% соответственно (рис. 4).

Как мы можем видеть, лидеры постепенно сдают позиции в инновационных разработках на тему зеркальных белков, уступая в росте активно развивающимся рынкам Республики Корея и КНР.

Сложности патентования D-белков. Ввиду того, что D-белки относятся к развивающейся области белковой инженерии, в процессе патентования таких объектов можно столкнуться с рядом специфических проблем, поскольку большая часть изобретений в области белковой химии и, соответственно, наработанная ранее практика патентной экспертизы были связаны преимущественно с природными L-белками, методами их синтеза и применения.

Так, основной характеризующий белок признак в формуле изобретения – его аминокислотная последовательность, которая, согласно национальному законодательству Российской Федерации (п. 53(6) и п. 51 Требований к документам заявки на выдачу патента на изобретение [13]), а также Правилу 5.2 Инструкции к Договору о патентной кооперации [14], должна быть представлена в Перечне последовательностей в описании изобретения. При этом Перечень последовательностей должен быть оформлен согласно соответствующему стандарту ВОИС.

В настоящий момент действует стандарт ST.25 ВОИС [15], и в качестве рекомендуемого указан стандарт ST.26 ВОИС [16], который вступит в силу с января 2022 г., прекратив действие предыдущего стандарта.

Согласно определению, изложенному в стандарте ST.25 ВОИС, п. 2 (iv), ““аминокислоты” – такие L-аминокислоты, которые обычно встречаются в натуральных белках и перечислены в табл. 3 Приложения 2. Последовательности аминокислот, которые содержат, по крайней мере, одну D-аминокислоту, не предназначены для включения в данное определение”.

Следовательно, стандарт ST.25 ВОИС явно исключал D-полипептиды и D-белки из требований к перечню, предъявляемых к L-белкам, что делало необязательным предоставление аминокислотной последовательности.

Стандарт ST.26 ВОИС дает новое определение: ““Аминокислота” означает любую аминокислоту, которая может быть представлена любым из символов, указанных в Приложении I (см. раздел 3, табл. 3). Такие аминокислоты включают, среди прочего, D-аминокислоты и аминокислоты, содержащие модифицированные или синтетические боковые цепи. Аминокислоты будут истолкованы как немодифицированные L-аминокислоты, если они далее не описаны в таблице характеристик как модифицированные в соответствии с параграфом 30”.

Таким образом, ST.26 ВОИС, в противовес ST.25 ВОИС, вводит аналогичные требования к D-белкам, какие раньше предъявлялись только к

L-белкам, с учетом указания, что аминокислоты в составе белка представлены в D-форме. Изменения, произведенные в ST.26 ВОИС, – следствие повышенного интереса изобретателей к тематике D-белков и белков, содержащих D-аминокислоты, в такой степени, что это повлекло преобразование стандартов представления материалов патентной заявки для экспертизы.

Следует отметить, что Международная патентная классификация (МПК) не содержит соответствующих рубрик для белков, включающих D-аминокислоты, в то время как в Совместную патентную классификацию (СПК) в 2013 г. введены такие рубрики к отдельным терапевтически активным белкам. Однако информационный поиск по данным рубрикам из СПК будет иметь отношение только к малому числу конкретных белков, в то время как стереохимическим модификациям могут быть подвергнуты тысячи других известных белков, рубрики по включению D-аминокислот в состав которых не предусмотрены в СПК.

Ввиду того, что в предыдущие годы большая часть заявок по новым полипептидам и белкам относилась только к L-белкам, то и существующий объем данных, касающийся их аминокислотных последовательностей, размещен в базах данных без учета оптических изомеров аминокислот в их составе, что в дальнейшем может привести к трудностям в проведении информационного поиска, связанным с проблемой в установлении отличий последовательности нового D-белка от известного L-белка с такой же аминокислотной последовательностью, но имеющего иные биологические свойства.

Учитывая вышеуказанную проблему, а также требования ST.26 ВОИС, возникает необходимость указания D-изомеров в примечаниях к предоставляемой аминокислотной последовательности, что должно быть отражено в существующих базах данных, таких как GenBank и UniProtKB/SwissProt. Отсутствие такой информации препятствует проведению корректного патентного поиска.

Кроме того, на сегодняшний день невозможно судить о биохимических свойствах D-белков по свойствам гомологичных им L-белков. Это связано с отсутствием массива информации о структурах и биологических свойствах D-белков, в отличие от природных L-белков.

Помимо этого, ввиду сложности рибосомного синтеза D-полипептидов, особенно в части оптимизации мРНК и использования стоп-кодонов, представляется проблематичной характеристика заявляемого D-белка через кодирующую его нуклеиновую кислоту ввиду невозможности однозначной интерпретации ее нуклеотидной последовательности для поиска в существующих базах данных.

В связи с переходом на ST.26 ВОИС появляются обнадеживающие перспективы представления наиболее точной и полной характеристики зеркальных белков в заявках на изобретения, с четкими обозначениями наличия аминокислот в D-форме в их аминокислотной последовательности. Данное обстоятельство в совокупности с доработкой имеющихся сведений по D-белкам в соответствующих базах данных должно в значительной степени повысить качество анализа массива данных при проведении информационного поиска и минимизировать риски нарушения объема прав изобретателей при выдаче патентов на зеркальные белки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Значительный потенциал разработок с использованием D-белков и рост интереса изобретателей к данной области биотехнологий требует своевременного и продуманного изменения подходов к экспертизе заявок, касающихся пептидной химии, связанных в том числе с подготовкой изменений не только стандартов представления материалов заявок, но и глобальных изменений поисковых систем, баз данных и классификации. Указанные изменения должны обеспечить оптимальные для всех участников рынка условия охраны изобретений на основе D-белков, что позволит снизить вероятность конфликта интересов и финансовые потери в результате оспаривания патентов.

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. *Elliott W.H., Elliott D.C.* // Biochemistry and Molecular Biology. Oxford: Oxford University Press, 2014. 648 p.
2. *Schumacher T.N.M., Mayr L.M., Minor D.L., Milhollen M.A., Burgess M.W., Kim P.S.* // Science. 1996. V. 271. P. 1854–1857. https://doi.org/10.1126/science.271.5257.1854
3. *Milton R., Milton S., Kent S.* // Science. 1992. V. 256. P. 1445–1448. https://doi.org/10.1126/science.1604320
4. *Feng Z., Xu B.* // Biomol. Concepts. 2016. V. 7. P. 179–187. https://doi.org/10.1515/bmc-2015-0035
5. *Genchi G.* // Amino Acids. 2017. V. 49. P. 1521–1533. https://doi.org/10.1007/s00726-017-2459-5

6. *Adaligil E., Patil K., Rodenstein M., Kumar K.* // ACS Chem. Biol. 2019. V. 14. P. 1498–1506. https://doi.org/10.1021/acschembio.9b00234
7. *Chattopadhyay A., Kelkar D.A.* // J. Biosci. 2005. V. 30. P. 147–149. https://doi.org/10.1007/BF02703693
8. *de Keizer P.L.J.* // International Application WO 2016/118014 A2, 28.07.2016.
9. *Wiesehan K., Willbold D.* // ChemBioChem. 2003. V. 4. P. 811–815. https://doi.org/10.1002/cbic.200300570
10. *Jewett M.C., D'aquino A.E.* // International Application WO 2020/010356 A1, 09.01.2020.
11. *Terasaka N., Iwane Y., Geiermann A.S., Goto Y., Suga H.* // Int. J. Mol. Sci. 2015. V. 16. P. 6513–6531. https://doi.org/10.3390/ijms16036513
12. *Deigin V., Ksenofontova O., Yatskin O., Goryacheva A., Ignatova A., Feofanov A., Ivanov V.* // Int. Immunopharm. 2020. V. 81. P. 106185. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106185
13. Требования к документам заявки на выдачу патента на изобретение (утверждены приказом Минэкономразвития России от 25 мая 2016 года № 316), https://rospatent.gov.ru/ru/documents/prikaz-ministerstva-ekonomicheskogo-razvitiya-rf-ot-25-maya-2016-g-316
14. Инструкция к Договору о патентной кооперации (текст, имеющий силу с 1 июля 2020 г.), https://wipolex.wipo.int/ru/text/577922
15. Стандарт ST.25 ВОИС. Стандарт по представлению перечней нуклеотидных и аминокислотных последовательностей в заявках на патент, https://rospatent.gov.ru/ru/documents/st-25-ctandart-po-predstavleniyu-perechney-posledovatelnostey-nukleotidov-i-aminokislot-v-patentnyh-zayavkah/download
16. Стандарт ST.26 ВОИС. Рекомендуемый стандарт представления перечней нуклеотидных и аминокислотных последовательностей с использованием языка XML (расширяемого языка разметки), https://rospatent.gov.ru/ru/documents/st-26-rekomenduemyy-standart-predstavleniya-perechney-nukleotidnyh-i-aminokislotnyh-posledovatelnostey-s-ispolzovaniem-yazyka-xml-rasshiryaemogo-yazyka-razmetki/download

Through the Looking Glass of Biotechnology: D-Proteins as Objects of Patent Protection

I. B. Nikitina*, #, I. V. Goretova*, and I. V. Fedoseev*

#Phone: +7 (499) 240-61-32; e-mail: otd1331@rupto.ru

**Federal Institute of Industrial Property, Berezhkovskaya nab. 30/1, Moscow, 125993 Russia*

This article is devoted to the patenting of proteins, comprising D-isoforms of amino acids, it's potential problems and perspectives. Today, technologies of the protein constructs biosynthesis with non-standard amino acids in their composition are among the most promising and rapidly developing areas of biotechnology, along with genome editing technologies, due to the cheapening of the solid-phase synthesis process and the appearance of modified ribosomes that use non-standard amino acids in ribosomal synthesis. This article contains materials indicating the relevance and interest of inventors in this area. Due to the fact that changes in the amino acid sequence of a known protein, consisting of a chain of L-amino acids, by converting the original L-amino acids into D-form, leads to unexpected functional and physicochemical changes of the protein, a broad prospects open up for the creation of new drugs, enzymes, pesticides and other protein products used in various industries, including medicine, food, agriculture and light industry. Also, this article also touched upon changes WIPO Standards relating to presentation sequences in terms of the display of D-amino acids in sequences according to WIPO standard ST.25 or ST.26. Here we describe the potential problems that may arise in the process of patent examination of such applications, e.g., the case when identical sequences of D- and L-proteins having different biological properties.

Keywords: D-protein, D-amino acid, D-form, mirror protein, stereochemistry, isomers, non-standard amino acids, patent

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 5, с. 573–582

УДК 547.426:547.922:547.963.32

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ЛИПОСОМ НА ДОСТАВКУ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК В ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ[1]

© 2021 г. А. А. Михеев*, Е. В. Шмендель**, Г. В. Назаров*, М. А. Маслов**, #

*ФГУП "Научный центр "Сигнал", Россия, 107014 Москва, ул. Большая Оленья, 8

**Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова, МИРЭА – Российский технологический университет, Россия, 119571 Москва, просп. Вернадского, 86

Поступила в редакцию 31.03.2021 г.
После доработки 04.04.2021 г.
Принята к публикации 06.04.2021 г.

Генная терапия – перспективный метод лечения различных заболеваний путем введения терапевтических нуклеиновых кислот, для доставки которых широкое распространение получили катионные липосомы. Показана способность катионных липосом, состоящих из поликатионного липида 2Х3 (1,26-бис(холест-5-ен-3β-илоксикарбониламино)-7,11,16,20-тетраазагексакозан тетрагидрохлорид) и липида-хелпера DOPE (1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин) при различных соотношениях (2.5 : 1 (**L1**), 2 : 1 (**L2**), 1.5 : 1 (**L3**), 1 : 1 (**L4**), 1 : 1.5 (**L5**), 1 : 2 (**L6**) и 1 : 2.5 (**L7**)), обеспечивать доставку плазмидной ДНК (пДНК) в клетки HEK293 с эффективностью выше, чем у коммерческого препарата Липофектамин 2000. Мы обнаружили, что трансфицирующая активность катионных липосом зависит как от их состава, так и от состава комплексов, формируемых катионными липосомами и пДНК (соотношение N/P). Катионные липосомы не проявляют токсичных свойств по отношению к эукариотическим клеткам HEK293 и при соотношении N/P ≥ 6/1 оказались эффективнее Липофектамина 2000, при этом наибольшая эффективность достигается для образца **L2**. При более низких значениях N/P = 1/1, 2/1 и 4/1 липосомы **L1** обеспечивают активный транспорт нуклеиновых кислот в клетки. Таким образом, для дальнейших экспериментов *in vivo* выбраны нетоксичные и небольшие по размеру липосомы **L1** и **L2**, в которых содержание амфифила 2Х3 в 2 и более раз превосходит количество липида-хелпера DOPE. Разработанные катионные липосомы могут успешно использоваться в качестве эффективных трансфицирующих агентов.

Ключевые слова: катионные липиды, трансфекция, липосомы, плазмидная ДНК, невирусные системы доставки

DOI: 10.31857/S0132342321050316

ВВЕДЕНИЕ

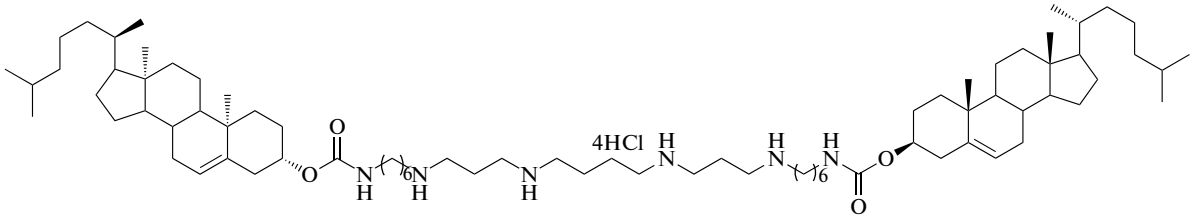
Несмотря на большое количество исследований по поиску и оптимизации систем доставки нуклеиновых кислот (НК), их низкая эффективность по-прежнему остается одним из главных факторов, ограничивающих развитие генной терапии. Разработка транспортной системы, способной эффективно переносить НК в клетки-мишени с минимальным риском возникновения побочных эффектов у пациента, – конечная цель исследований по трансфекции – процесса трансформации клеток эукариот экзогенными НК.

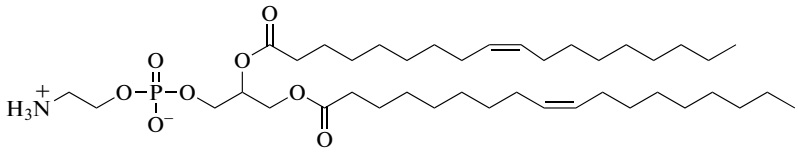
Невирусные системы доставки НК обладают такими преимуществами, как простота синтеза, отсутствие ограничений в размере доставляемых НК, возможность модификации состава, низкая цитотоксичность [1, 2]. К невирусным системам доставки относятся полимеры [3, 4], дендримеры [5, 6] и липосомы [7, 8]. Наиболее эффективные среди них – катионные липосомы [9, 10], состоящие из катионных амфифилов (КА) [11–14]. С целью создания безопасных и эффективных липосом структура КА подвергается различным химическим модификациям, таким как изменение катионной группы [15–19], спейсера [20–23],

[1] Статья публикуется по материалам доклада, представленного на конференции "Липиды 2021" (Москва, 11–13 октября 2021 г.).

Сокращения: КА – катионные амфифилы; НК – нуклеиновые кислоты; пДНК – плазмидная ДНК; ЭТ – эффективность трансфекции; DOPC – 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; DOPE – 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин; FBS – эмбриональная бычья сыворотка; HEK293 – клетки почки эмбриона человека; IC_{50} – концентрация липосом, при которой происходит ингибирование роста 50% клеток; MTT – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид; 2Х3 – 1,26-бис(холест-5-ен-3β-илоксикарбониламино)-7,11,16,20-тетраазагексакозан тетрагидрохлорид.

[#] Автор для связи: (тел. +7 (916) 386-99-82; эл. почта: mamaslov@mail.ru).





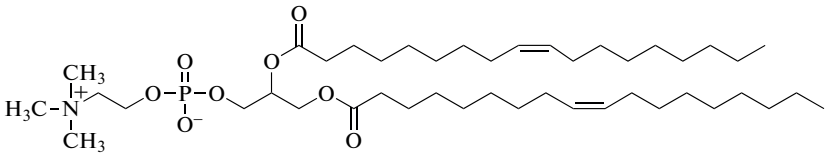


Рис. 1. Строение катионного амфифила 2X3, липидов-хелперов DOPE и DOPC.

гидрофобного заместителя [24, 25], а также линкера [26–30], что, в свою очередь, приводит к изменению эффективности трансфекции (ЭТ) клеток. Несмотря на определенные успехи в области разработки липосомальных систем доставки НК, уровень трансфекции эукариотических клеток, необходимый для практического использования, пока не достигнут. Это связано с недостаточным пониманием закономерностей по влиянию состава катионных липосом на их физико-химические параметры и биологическую активность.

Наиболее перспективные для транспорта НК – КА на основе холестерина и природных полиаминов [15, 31–37]. Так, липосомы на основе амфифила 2X3 (1,26-бис(холест-5-ен-3β-илоксикарбониламино)-7,11,16,20-тетраазагексакозан тетрагидрохлорид, рис. 1), содержащего спермин, два холестериновых остатка, карбамоильный линкер и гексаметиленовый спейсер, трансфицировали эукариотические клетки *in vitro* эффективнее своих аналогов [32], не теряя своей активности в присутствии эмбриональной бычьей сыворотки (FBS).

В состав липосом помимо КА также могут входить липиды-хелперы, которые увеличивают ЭТ. Среди цвиттер-ионных липидов-хелперов часто используются 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE) [38, 39] и 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DOPC) [40, 41] (рис. 1). Использование DOPE в составе липосом приводит к эффективной доставке НК по сравнению с DOPC благодаря способности DOPE формировать инвертированную гексагональную фазу в условиях эндосомального закисления [38]. Также было обнаружено, что использование DOPE в качестве липида-хелпера способствует более компактной упаковке НК [29, 41–44]. В составе катионных липосом DOPE может преобладать по содержанию над КА (КА : DOPE, 1 : 4) [34] или находиться в недостатке (КА : DOPE, 7 : 1) [45]. Наиболее часто используемое соотношение между КА : DOPE – соотношение 1 : 1 [32, 33, 35, 41–43, 45].

Другой важный параметр, влияющий на ЭТ, – это состав комплексов, формируемых липосомами и НК, который определяется соотношением количества положительно заряженных атомов азота КА к количеству отрицательно заряженных фосфатных групп НК (N/P). Так, при соотношении N/P = 1/1 катионные липосомы не полностью компактизируют НК, что приводит к низкой ЭТ [46, 47]. Увеличение соотношения N/P увеличивает ЭТ за счет формирования компактных комплексов с избыточным положительным зарядом, обеспечивающим электростатическое взаимодействие с отрицательно заряженной поверхностью мембраны эукариотических клеток [48, 49]. Однако с увеличением соотношения N/P

Таблица 1. Состав катионных липосом, их физико-химические параметры и цитотоксичность для клеток HEK293

Липосомы	Соотношение, мольн.		Средний размер липосом, нм	ξ-Потенциал липосом, мВ	Индекс полидисперсности	IC_{50}, мкМ
	2X3	DOPE				
L1	2.5	1.0	75.2 ± 0.6	89 ± 1.57	0.264 ± 0.030	>80
L2	2.0	1.0	77.2 ± 1.4	88 ± 2.86	0.266 ± 0.010	>80
L3	1.5	1.0	86.2 ± 0.6	97 ± 2.46	0.259 ± 0.049	>80
L4	1.0	1.0	73.0 ± 1.2	99 ± 2.19	0.231 ± 0.076	>80
L5	1.0	1.5	67.4 ± 0.6	100 ± 2.99	0.290 ± 0.006	>80
L6	1.0	2.0	101.6 ± 1.2	100 ± 2.57	0.260 ± 0.008	>80
L7	1.0	2.5	130.6 ± 0.8	102 ± 2.08	0.335 ± 0.015	>80

также увеличивается цитотоксичность комплексов [50], что диктует необходимость выбора оптимального соотношения N/P, обеспечивающего разумный баланс между ЭТ и безопасностью липосом.

С целью создания эффективных систем доставки нуклеиновых кислот нами изучено влияние состава катионных липосом, сформированных на основе амфифила 2X3 и цвиттер-ионного липида DOPE, а также соотношения N/P, на физико-химические характеристики липосом, их цитотоксичность и ЭТ с целью выявления оптимальных условий для транспорта пДНК в эукариотические клетки *in vitro*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение катионных липосом и изучение их физико-химических характеристик. Катионные липосомы **L1**–**L7**, состоящие из КА 2X3 и липида-хелпера DOPE (рис. 1) при различном соотношении компонентов (табл. 1), были сформированы с использованием метода гидратации липидной пленки и последующей обработки ультразвуком [46, 47]. Количество DOPE в составе липосом может варьироваться в широком диапазоне значений [44, 45]. Ранее была продемонстрирована высокая эффективность доставки пДНК и siРНК липосомами 2X3-DOPE при мольном соотношении 1 : 1 (**L4**) [33, 46, 47] и 1 : 2 (**L6**) [51, 52], однако в одном эксперименте данные липосомы никогда не сравнивались. Кроме того, с целью поиска оптимального состава катионных липосом было важно исследовать соотношения компонентов.

Первый этап при создании систем доставки НК на основе липосом – изучение их физико-химических параметров. Стабильность таких систем может быть оценена по значениям размера и поверхностного потенциала частиц методом динамического светорассеяния (табл. 1).

Гидродинамический диаметр катионных липосом **L1**–**L7** варьирует от 75.2 до 130.6 нм. Небольшое увеличение размера может быть связано с увеличением количества DOPE в их составе (табл. 1). Ранее было показано, что увеличение количества DOPE в составе катионных липосом с амфифилом SPYRIT-7 приводит, наоборот, к уменьшению их размера [20]. Таким образом, размер липосом зависит не только от количества DOPE, но также от природы КА. Поверхностный заряд всех липосом был положительным (88–102 мВ). Значение индекса полидисперсности катионных липосом **L1**–**L7** указывало на формирование однородных по размеру частиц, за исключением липосом **L7** (индекс полидисперсности 0.335).

Цитотоксичность катионных липосом. Цитотоксичность катионных липосом **L1**–**L7** (табл. 1) оценивали с помощью МТТ-теста, используя клетки почки эмбриона человека (HEK293) [46]. Процент гибели клеток зависит от концентрации липосом. Показатель их токсичности – концентрация, при которой выживает 50% клеток (IC_{50}). Значения IC_{50}, полученные с помощью МТТ-теста на клетках HEK293, не были достигнуты при концентрациях липосом **L1**–**L7** от 5 до 80 мкМ.

Физико-химические характеристики комплексов катионных липосом и пДНК. Комплексы катионных липосом **L1**–**L7** и пДНК pGLuc (0.5 мкг/мл) формировали при различных соотношениях N/P (1/1, 2/1, 4/1, 6/1, 8/1, 10/1) путем смешивания эквивалентных объемов растворов катионных липосом и пДНК в среде DMEM. Ранее было показано, что небольшие по размеру (40–80 нм) комплексы обеспечивают более высокую ЭТ в условиях *in vivo*, в то время как частицы с размером 200–400 нм оптимальны для трансфекции клеток *in vitro* [53, 54].

По сравнению с индивидуальными липосомами (табл. 1), при соотношениях N/P = 1/1 и 2/1 гидродинамический диаметр комплексов пДНК с липосомами, содержащими избыток КА (2X3 > 1), увеличивался до значений 200–300 нм (рис. 2*а*). В случае липосом с соотношением компонентов 2X3/DOPE ≤ 1 диаметр комплексов достигал значений 400–600 нм. Дальнейшее увеличение количества липосом в комплексах (N/P = 4/1) приводило к компактизации пДНК и образованию частиц размером 100–280 нм. Начиная с N/P = = 6/1, размер комплексов практически не изменялся и не превышал 200 нм.

Все исследуемые комплексы катионных липосом с пДНК при соотношении N/P = 1/1 имели отрицательный заряд, который изменялся на положительный, начиная с N/P = 2/1 для липосом **L1**, **L2**, **L4**, **L6**, **L7** и с N/P = 4/1 для липосом **L3** и **L5** (рис. 2*б*). Аналогичные закономерности нами наблюдались ранее как для катионных липосом **L6**, так и для адресных липосом на их основе [35].

Доставка пДНК катионными липосомами различного состава. С целью оценки эффективности доставки пДНК pGLuc в эукариотические клетки HEK293 с помощью катионных липосом **L1**–**L7** определяли уровень экспрессии люциферазы с помощью люминесцентного анализа, оценивая среднюю интенсивность люминесценции в клеточной популяции. ЭТ сравнивали с коммерческим препаратом Липофектамин 2000, который состоит из смеси поликатионного липида 2,3-диолеилокси-*N*-[2-(сперминкарбоксамидо)этил]-*N*,*N*-диметил-1-пропиламмоний трифторацетата и DOPE и считается “золотым стандартом” среди трансфицирующих реагентов *in vitro* [55].

Для определения состава катионных липосом и комплексов, оптимальных для доставки пДНК, проводили оценку трансфицирующей активности при разных соотношениях N/P (рис. 3). При соотношении N/P = 1/1 или 2/1 низкая ЭТ наблюдалась для всех исследуемых липосом. Следует отметить, что при соотношении N/P = 2/1 катионные липосомы **L1** и **L2** с соотношением компонентов 2X3/DOPE ≥ 2 формировали небольшие по размеру комплексы (рис. 2) и более эффективно доставляли пДНК (рис. 3) относительно других липосом. При соотношении N/P = 4/1 все комплексы катионных липосом приобретали положительный заряд (ζ-потенциал > 40 мВ) и компактизовали пДНК до 80–160 нм (рис. 2), что способствовало более эффективной доставке НК (рис. 3). Однако только липосомы **L2** превосходили по эффективности коммерческий препарат Липофектамин 2000. При соотношениях N/P ≥ 6/1 все исследуемые липосомы были эффективнее Липофектамина 2000: так, при N/P = 8/1 или 10/1 интенсивность значений люминесценции были от 1.3 до 2 раз выше, чем для Липофектамина 2000. Наибольшие значения наблюдались при соотношении N/P = 10/1 для липосом **L2** и **L3**, содержащих избыток амфифила 2X3. При этом следует отметить, что для липосом **L1**, **L6** и **L7** увеличение соотношения N/P, начиная с 6/1, незначительно влияло на ЭТ.

Сравнительную оценку ЭТ катионных липосом проводили по отношению к ранее изученным липосомам **L4** [33, 46, 47] (рис. 4*а*) и **L6** [51, 52] (рис. 4*б*). Было обнаружено, что наибольшие различия в ЭТ отмечаются при соотношениях N/P = = 1/1, 2/1 и 4/1 (рис. 4). При более высоких соотношениях N/P ЭТ исследуемых липосом **L1**–**L7** была статистически неразличимой.

Наибольшее различие наблюдалось при соотношении N/P = 2/1 для катионных липосом **L1** (2X3/DOPE = 2.5) с максимальным содержанием амфифила 2X3, они оказались в 10^4 раз эффективнее липосом **L4** (2X3/DOPE = 1) и **L6** (2X3/DOPE = = 0.5). Ранее нами было показано, что соотношение N/P = 2/1 – одно из главных условий для адресной доставки НК фолат-содержащими катионными липосомами на основе **L6** [51], поэтому увеличение количества поликатионного амфифила 2X3 в составе адресных липосом до 2.5 мольных эквивалентов может привести к значительному усилению экспрессии белка и повысить эффективность направленной доставки в опухолевые клетки. Также следует отметить, что именно липосомы **L1** формируют при соотношении N/P = 2/1 самые маленькие комплексы (~200 нм, рис. 2*а*) с зарядом ~40 мВ (рис. 2*б*). Дальнейшее увеличение количества липосом в комплексах (N/P = 4/1) приводит как к уменьшению их размера, так и к увеличению их поверхностного заряда, что нивелирует различие в ЭТ между исследуемыми липосомами (рис. 4*а*, 4*б*).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение липосом. Катионный амфифил 2X3 (чистота >95%) синтезировали по описанной ранее методике [31]. В работе использовали цвиттер-ионный фосфолипид DOPE (Avanti Polar Lipids, США) и коммерчески доступный препарат Липофектамин 2000 (Invitrogen, США).

Чистоту синтезированного КА определяли на высокоэффективном жидкостном хроматографе Ultimate 3000, соединенном с масс-спектрометром LCQ Fleet (Thermo Scientific, США). Хроматографирование осуществляли на колонке Thermo Scientific Hypersil Gold C-8 (50 × 2.1 мм, 1.9 мкм) в режиме градиентного элюирования: фаза А – 0.1%-ный раствор муравьиной кислоты в деиони-

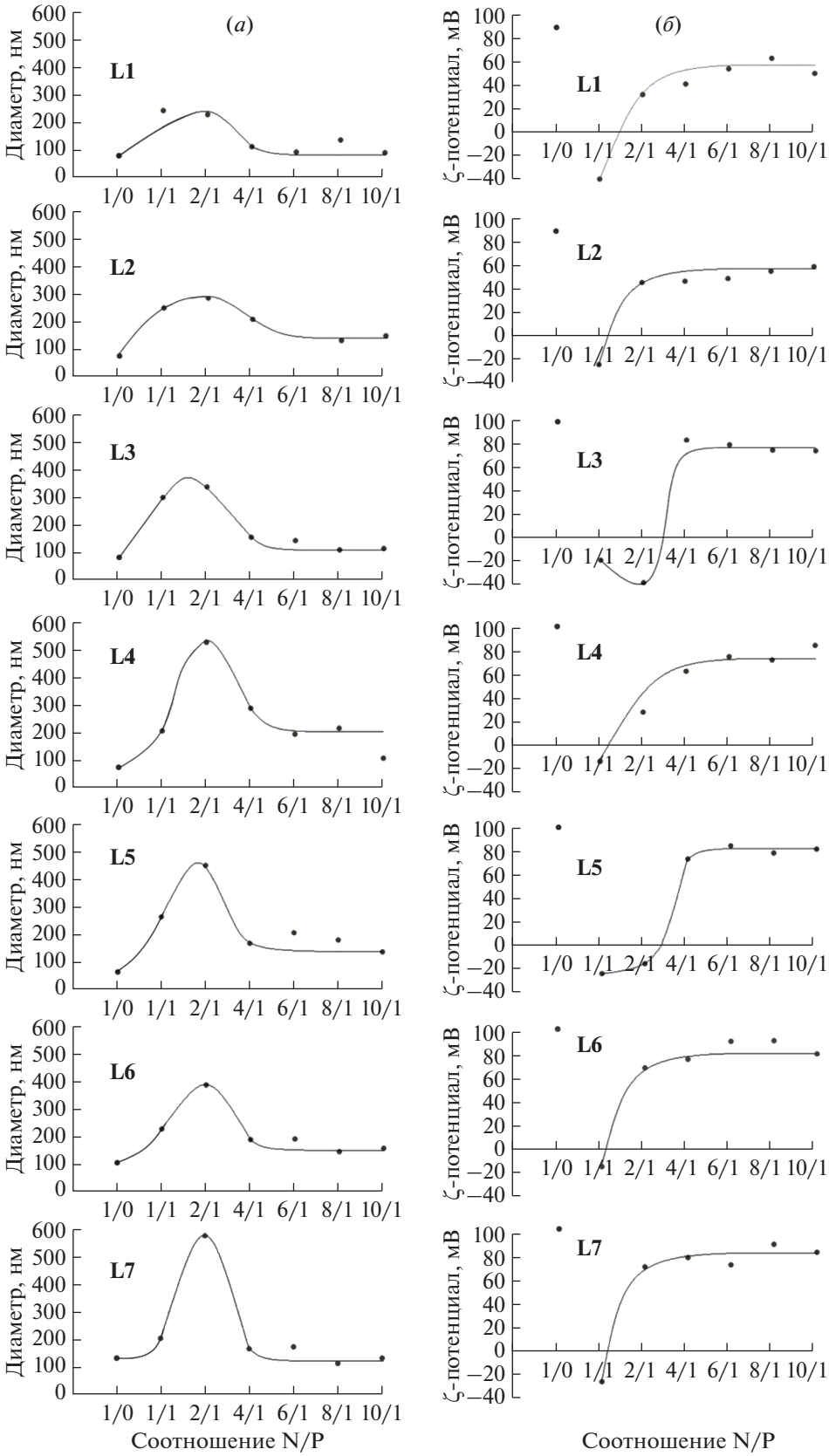


Рис. 2. Гидродинамический диаметр (*а*) и ζ-потенциал (*б*) комплексов катионных липосом **L1**–**L7** и пДНК pGLuc, сформированных при различных соотношениях N/P.

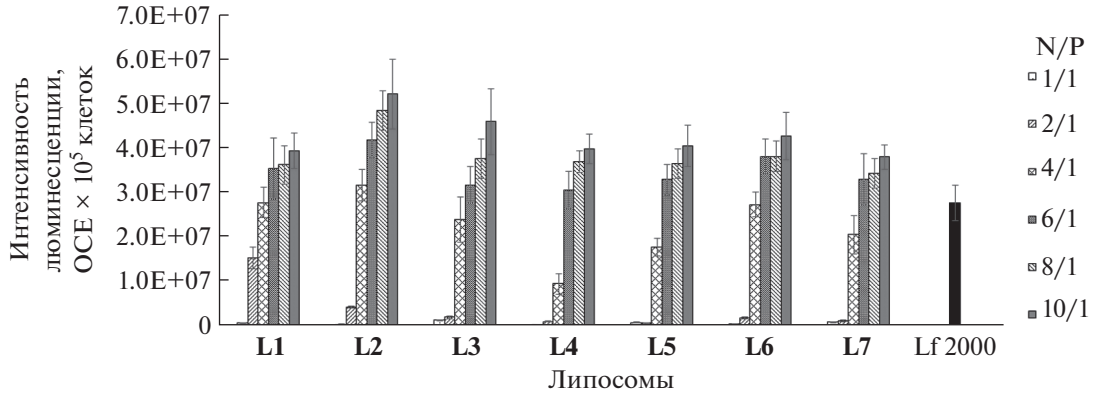


Рис. 3. Доставка пДНК с помощью катионных липосом в клетки HEK293. Клетки инкубировали с комплексами, сформированными pGLuc (0.5 мкг на лунку) и катионными липосомами **L1**–**L7** при различных соотношениях N/P. Уровень средней интенсивности люминесценции клеток измеряли методом люминесцентного анализа через 72 ч после инкубации клеток с комплексами. Результаты 12 экспериментов представлены как среднее трех повторов. Доставку pGLuc с помощью Липофектамина 2000 (Lf2000) осуществляли в соответствии с протоколом фирмы-производителя.

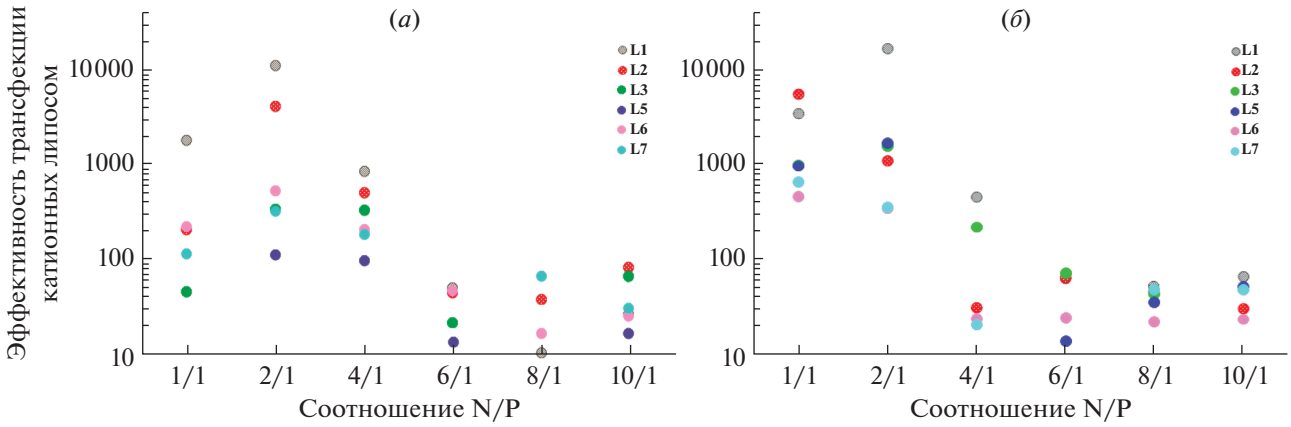


Рис. 4. Сравнительная оценка эффективности трансфекции катионных липосом **L1**–**L3** и **L5**–**L7** по отношению к липосомам **L4** (*а*) и катионных липосом **L1**–**L5** и **L7** по отношению к липосомам **L6** (*б*).

зированной воде; фаза B – 0.1%-ный раствор муравьиной кислоты в смеси ацетонитрил/изопропиловый спирт в соотношении 80/20 (*V*/*V*).

Для получения липосом к раствору 2X3 в системе хлороформ–метанол (5/1, *V*/*V*) добавляли раствор DOPE в хлороформе при различных соотношениях (табл. 1) и затем осторожно удаляли растворитель под вакуумом на роторном испарителе. Полученную липидную пленку сушили в вакууме масляного насоса (0.01 торр) в течение 4 ч, гидратировали в воде для инъекций (Solopharm, Россия) при 50–60°C в течение 10 мин. Липидные дисперсии обрабатывали ультразвуком в течение 15 мин при 60–65°C в ультразвуковой бане (Bandelin Sonorex Digitec DT 52H, Германия) с последующим фильтрованием через стерильный фильтр (Chromafil CA-45/25 (S), Macherey-Nagel, Германия) с размером пор 450 нм. Полученные катионные липосомы **L1**–**L7** с концентрацией 1 мМ по амфифилу 2X3 хранили при 4°C в атмосфере аргона.

Нуклеиновые кислоты. В экспериментах для оценки эффективности доставки гена *GLuc* использовали плазмиду *ps*GLuc-N1 (4544 п.н.) полученную на основе pEGFP-N1 (4733 п.н.; Clontech Laboratories, США, GenBank U55762) путем клонирования в нее гена *GLuc* из плазмиды pNEBR-X1GLuc (4821 п.н.; New England BioLabs, США).

Получение комплексов катионных липосом с пДНК. Для экспериментов по трансфекции были сформированы комплексы катионных липосом с пДНК в среде DMEM (Invitrogen, США) без сыворотки путем смешивания 50 мкл раствора

пДНК (0.5 мкг) в DMEM и 50 мкл раствора липосом **L1**–**L7** в DMEM при соотношениях N/P = = 1/1, 2/1, 4/1, 6/1, 8/1, 10/1 с последующей инкубацией в течение 20 мин при комнатной температуре.

Для измерения физико-химических характеристик 50 мкл липосом смешивали с 950 мкл дистиллированной воды (Milli-Q). Для измерения физико-химических характеристик комплексов 50 мкл пДНК pGLuc в дистиллированной воде (Milli-Q) смешивали с 50 мкл катионных липосом **L1**–**L7** в дистиллированной воде (Milli-Q), при соответствующих соотношениях N/P = 1/1, 2/1, 4/1, 6/1, 8/1 и 10/1, инкубировали в течение 20 мин при 25°C и добавляли 950 мкл дистиллированной воды (Milli-Q).

Физико-химические характеристики липосом и их комплексов с пДНК. Размер и ξ-потенциал липосом и их комплексов с пДНК измеряли на приборе динамического лазерного светорассеивания Malvern Zetasizer Nano (Malvern Instruments Ltd., Великобритания; угол 173°, вязкость 0.890 сП, температура 25°C, время равновесия 2 мин, показатели преломления для воды и липосом 1.33 и 1.46 соответственно). Средний гидродинамический диаметр (нм) по количеству частиц регистрировали как среднее значение трех измерений.

Клеточная линия. Клеточную линию HEK293 (ATCC, США) культивировали в среде DMEM в присутствии 10% FBS с антибиотиком (5000 ед./мл пенициллина и 5000 мкг/мл стрептомицина) в атмосфере 5%-ного CO_2 при 37°C.

Тест на жизнеспособность клеток. Клетки HEK293 культивировали в 96-луночных планшетах (плотность посадки 2×10^5 клеток на лунку, инкубация в атмосфере 5%-ного CO_2 при 37°C в течение 24 ч). В день проведения эксперимента клеточную среду DMEM + 10% FBS с антибиотиком заменяли растворами липосом **L1**–**L7** с концентрациями 5, 10, 20, 40 и 80 мкМ в DMEM (суммарный объем 150 мл на лунку) в отсутствие FBS и инкубировали в атмосфере 5%-ного CO_2 в течение 4 ч при 37°C, после чего добавляли 16 мкл FBS и дополнительно инкубировали 20 ч при 37°C.

По окончании инкубации к клеткам без смены среды добавляли 10 мкл раствора 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромида (MTT) (Sigma, США) с концентрацией 5 мг/мл. Через 4 ч культуральную среду удаляли, кристаллы формазана растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО, 200 мкл на лунку) и определяли разницу между оптической плотностью при 620 и 570 нм (Multiscan RC, Labsystems, Финляндия) [53]. Из экспериментальных данных вычисляли значение IC_{50}. Результаты были выражены как средние значения для трех параллельных измерений и были статистически обработаны с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Трансфекция клеток. Клетки HEK293 культивировали в 24-луночных планшетах (плотность посадки 2×10^5 клеток на лунку, инкубация в атмосфере 5%-ного CO_2 при 37°C в течение 24 ч). Перед проведением трансфекции в планшетах заменяли культуральную среду DMEM + 10% FBS с антибиотиком на среду DMEM + 10% FBS без антибиотика. Комплексы катионных липосом с пДНК объемом 100 мкл добавляли к клеткам. Для равномерного распределения раствора комплексов по всему объему лунки планшет помещали для перемешивания на ротационный миксер, а затем выдерживали в течение 4 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO_2. Далее заменяли среду на свежую DMEM + 10% FBS с антибиотиком и оставляли в CO_2-инкубаторе на 68 ч.

Для определения ЭТ использовали люминесцентный анализ на планшетном люминометре GloMax Multi plus (Promega, США) с автоматическим вводом 50 мкл субстрата BioLux Gaussia Luciferase (New England Biolabs, США), устанавливая параметры по протоколу производителя (5 с интегрирования, 37 с задержки). Все экспериментальные точки были измерены в трех повторах и статистически обработаны с использованием *t*-критерия Стьюдента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований были получены катионные липосомы **L1**–**L7** разного состава на основе амфифила 2X3 и цвиттер-ионного липида DOPE, которые оказались не токсичными в отношении эукариотических клеток HEK293, обладали оптимальными физико-химическими характеристиками и могут быть использованы в качестве систем доставки НК. Для обеспечения более эффективной доставки пДНК содержание поликатионного амфифила 2X3 должно быть больше, чем липида-хелпера DOPE для всех исследуемых соотношений N/P. При соотношении N/P > 4/1 формируются небольшие по размеру положительно заряженные комплексы пДНК с катионными липосомами, которые эффективнее коммерческого препарата Липофектамин 2000. При этом при соотношениях N/P = 8/1 и 10/1 липосомы **L2**, содержащие 2.0 мольных эквивалента поликатионного амфифила 2X3, обеспечивают максимальный уровень трансфекции клеток. При соотношении N/P = 2/1 липосомы **L1**, содержащие 2.5 мольных эквивалента амфифила 2X3, оказались эффективнее липосом **L2**–**L7**, что

может быть использовано для направленного транспорта пДНК.

Разработанные катионные липосомы могут успешно использоваться в качестве эффективных трансфицирующих агентов. Для дальнейших экспериментов *in vivo* могут быть выбраны нетоксичные, небольшие по размеру липосомы **L1** и **L2**, в которых содержание амфифила 2Х3 в 2 и более раз превосходит количество липида-хелпера DOPE.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 0706-2020-0019) с использованием оборудования Центра коллективного пользования МИРЭА – Российского технологического университета.

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. *Yin H., Kanasty R.L., Eltoukhy A.A., Vegas A.J., Dorkin J.R., Anderson D.G.* // Nat. Rev. Genet. 2014. V. 15. P. 541–555. https://doi.org/10.1038/nrg3763
2. *Li S.D., Huang L.* // J. Control. Rel. 2007. V. 123. P. 181–183. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.09.004
3. *Eliyahu H., Barenholz Y., Domb A.J.* // Molecules. 2005. V. 10. P. 34–64. https://doi.org/10.3390/10010034
4. *Saad M., Garbuzenko O.B., Ber E., Chandna P., Khandare J.J., Pozharov V.P., Minko T.* // J. Control. Rel. 2008. V. 130. P. 107–114. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.05.024
5. *Chaplot S.P., Rupenthal I.D.* // J. Pharm. Pharmacol. 2014. V. 66. P. 542–556. https://doi.org/10.1111/jphp.12104
6. *Wu J., Huang W., He Z.* // Sci. World J. 2013. V. 29. P. 1–16. https://doi.org/10.1155/2013/630654
7. *Petrilli R., Eloy J.O., Souza M.C., Barcellos J.P.A., Marchetti J.M., Yung B., Lee R.J.* // Nanobiomat. Drug Del. 2016. V. 9. P. 78–109. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42866-8.00003-4
8. *Allen T.M., Cullis P.R.* // Adv. Drug Del. Rev. 2013. V. 65. P. 36–48. https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037
9. *Shim G., Kim M.G., Park J.Y., Oh Y.K.* // Asian J. Pharm. Sci. 2013. V. 8. P. 72–80. https://doi.org/10.1016/j.ajps.2013.07.009
10. *Elhissi A., Hassan I.U., Papapanou A., Zeb N., Taylor K.M.G.* // Adv. Plan. Lip. Bil. Liposom. 2014. V. 19. P. 53–66. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418699-6.00002-3
11. *Felgner P.L., Gadek. T.R., Holm M., Roman R., Chan H.W., Wenz M., Northrop J.P., Ringold G.M., Danielsen M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 7413–7417. https://doi.org/10.1073/pnas.84.21.7413
12. *Martin B., Sainlos M., Aissaoui A., Oudrhiri N., Hauchecorne M., Vigneron J.P., Lehn J.M., Lehn P.* // Curr. Pharm. Design. 2005. V. 11. P. 375–394. https://doi.org/10.2174/1381612053382133
13. *Maslov M.A., Sycheva E.V., Morozova N.G., Serebrennikova G.A.* // Russ. Chem. Bull. 2000. V. 3. P. 385–400. https://doi.org/10.1007/bf02494765
14. *Mintzer M.A., Simanek E.E.* // Chem. Rev. 2009. V. 109. P. 259–302. https://doi.org/10.1021/cr800409e
15. *Zhi D., Zhang S., Cui S., Zhao Y., Wang Y., Zhao D.* // Bioconjugate Chem. 2013. V. 24. P. 487–519. https://doi.org/10.1021/bc300381s
16. *Biswas J., Mishra S.K., Kondaiah P., Bhattacharya S.* // Org. Biomol. Chem. 2011. V. 9. P. 4600–4613. https://doi.org/10.1039/c0ob00940g
17. *Niyomtham N., Apiratikul N., Chanchang K., Opanasopit P., Yingyongnarongkul B.E.* // Biol. Pharm. Bull. 2014. V. 37. P. 1534–1542. https://doi.org/10.1248/bpb.b14-00349
18. *Ojeda E., Puras G., Agirre M., Zarate J., Grijalvo S., Eritja R., Martinez-Navarrete G., Soto-Sanchez C., Diaz-Tahoces A., Aviles-Trigueros M., Fernandez E., Pedraz J.L.* // Biomaterials. 2016. V. 77. P. 267–279. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.11.017
19. *Puchkov P.A., Shmendel E.V., Luneva A.S., Morozova N.G., Zenkova M.A., Maslov M.A.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2016. V. 26. P. 5911–5915. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.11.005
20. *Sharma V.D., Lees J., Hoffman N.E., Brailoiu E., Madesh M., Wunder S.L., Ilies M.A.* // Mol. Pharmaceutics. 2014. V. 11. P. 545–559. https://doi.org/10.1021/mp4005035
21. *Cho S.M., Lee H.Y., Kim J.C.* // Korean J. Chem. Eng. 2008. V. 25. P. 390–393. https://doi.org/10.1007/s11814-008-0066-6
22. *Rao N.M.* // Chem. Physic. Lip. 2010. V. 163. P. 245–252. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2010.01.001
23. *Puchkov P.A., Kartashova I.A., Shmendel E.V., Luneva A.S., Morozova N.G., Zenkova M.A., Maslov M.A.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2017. V. 27. P. 3284–3288. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.06.026

24. *Ui-Tei K., Naito Y., Takahashi F., Haraguchi T., Ohki-Hamazaki H., Juni A., Ueda R., Saigo K.* // Nucl. Acids Res. 2004. V. 32. P. 936–948.
https://doi.org/10.1093/nar/gkh247

25. *Chen H.M., Li Y.H., Wu S.H.* // PNAS. 2007. V. 104. P. 3318–3323.
https://doi.org/10.1073/pnas.0611119104

26. *Choi J.S., Lee E.J., Jang H.S., Park J.S.* // Bioconjugate Chem. 2001. V. 12. P. 108–113.
https://doi.org/10.1021/bc000081o

27. *Liu D., Hu J., Qiao W., Li Z., Zhang S. Cheng L.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2005. V. 15. P. 3147–3150.
https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.04.010

28. *Liu D., Qiao W., Li Z., Chen Y., Cui X., Li K., Yu L., Yan K., Zhu L., Guo Y. Cheng L.* // Chem. Biol. Drug Des. 2008. V. 71. P. 336–344.
https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2008.00644.x

29. *Fujiwara T., Hasegawa S., Hirashima N., Nakanishi M., Ohwada T.* // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1468. P. 396–402.
https://doi.org/10.1016/s0005-2736(00)00278-9

30. *Puchkov P.A., Shmendel E.V., Luneva A.S., Zenkova M.A., Maslov M.A.* // Chem. Select. 2020. V. 5. P. 4509–4514.
https://doi.org/10.1002/slct.201904879

31. *Petukhov I.A., Maslov M.A., Morozova N.G., Serebrennikova G.A.* // Russ. Chem. Bull. 2010. V. 59. P. 260–268.
https://doi.org/10.1007/s11172-010-0071-x

32. *Maslov M.A., Kabilova T.O., Petukhov I.A., Morozova N.G., Serebrennikova G.A., Vlassov V.V., Zenkova M.A.* // J. Control. Release. 2012. V. 160. P. 182–193.
https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.11.023

33. *Markov O.V., Mironova N.L., Maslov M.A., Petukhov I.A., Morozova N.G., Vlassov V.V., Zenkova M.A.* // J. Control. Release. 2012. V. 160. P. 200–210.
https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.11.034

34. *Ju J., Huan M.L., Wan N., Hou Y.L., Ma X.X., Jia Y.Y., Li C., Zhou S.Y., Zhang B.L.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2016. V. 26. P. 2401–2407.
https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.04.007

35. *Markov O.V., Mironova N.L., Shmendel E.V., Serikov R.N., Morozova N.G., Maslov M.A., Vlassov V.V., Zenkova M.A.* // J. Control. Release. 2015. V. 213. P. 45–56.
https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.06.028

36. *Niyomtham N., Apiratikul N., Suksen K., Opanasopit P., Yingyongnarongkul B.E.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2015. V. 25. P. 496–503.
https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.12.043

37. *Mikheev A.A., Shmendel E.V., Zhestovskaya E.S., Nazarov G.V., Maslov M.A.* // Fine Chem. Technol. 2020. V. 15. P. 7–27.
https://doi.org/10.32362/2410-6593-2020-15-1-7-27

38. *Zuidam N. J., Barenholz Y.* // Biochim. Biophys. Acta. 1998. V. 1368. P. 115–128.
https://doi.org/10.1016/s0005-2736(97)00187-9

39. *Zuidam N.J., Hirsch-Lerner D., Margulies S., Barenholz Y.* // Biochim. Biophys. Acta. 1999. V. 1411. P. 207–220.
https://doi.org/10.1016/s0005-2736(99)00069-3

40. *Balazs D.A., Godbey W.T.* // J. Drug Del. 2011. V. 2011. P. 1–12.
https://doi.org/10.1155/2011/326497

41. *Pisani M., Mobbili G., Bruni P.* // Non-Viral Gene Therapy. 2011. P. 319–348.
https://doi.org/10.5772/21283

42. *Gao X., Huang L.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1991. V. 179. P. 280–285.
https://doi.org/10.1016/0006-291x(91)91366-k

43. *Leventis R., Silvius J.R.* // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1023. P. 124–132.
https://doi.org/10.1016/0005-2736(90)90017-i

44. *Hassan Farhood H., Natalya Serbina N., Leaf Huang L.* // Biochim. Biophys. Acta. 1995. V. 1235. P. 289–295.
https://doi.org/10.1016/0005-2736(95)80016-9

45. *Mochizuki S., Kanegae N., Nishina K., Kamikawa Y., Koiwai K., Masunaga H., Sakurai K.* // Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1828. P. 412–418.
https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.10.017

46. *Luneva A.S., Puchkov P.A, Shmendel E.V., Zenkova M.A., Kuzevanova A.Yu., Alimov A.A., Karpukhin A.V., Maslov M.A.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. P. 724–731.
https://doi.org/10.1134/S1068162019010084

47. *Shmendel E.V., Bakhareva S.A., Makarova D.M., Chernikov I.V., Morozova N.G., Chernolovskaya E.L., Zenkova M.A., Maslov M.A.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 1250–1260.
https://doi.org/10.1134/S106816202006031X

48. *Perrie Y., Gregoriadis G.* // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1475. P. 125–132.
https://doi.org/10.1016/s0304-4165(00)00055-6

49. *Ma B., Zhang S., Jiang H., Zhao B., Lv H.* // J. Controll. Rel. 2007. V. 123 P. 184–194.
https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.08.022

50. *Nguyen L.T., Atobe K., Barichello J.M., Ishida T., Kiwada H.* // Biol. Pharm. Bull. 2007. V. 30. P. 751–757.
https://doi.org/10.1248/bpb.30.751

51. *Kabilova T.O., Shmendel E.V., Gladkikh D.V., Chernolovskaya E.L., Markov O.V., Morozova N.G., Maslov M.A., Zenkova M.A.* // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2018. V. 123. P. 59–70.
https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.11.010

52. *Shmendel E.V., Kabilova T.O., Morozova N.G., Zenkova M.A., Maslov M.A.* // J. Drug Del. Sci. Technol. 2020. V. 57. P. 101609.
https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101609

53. *Carmichael J., De Graff W.G., Gazdar A.F., Minna J.D., Mitchell J.B.* // Cancer Res. 1987. V. 47. P. 936–942.

54. *Zhdanov R.I., Podobed O.V., Vlasov V.V.* // Bioelectrochem. 2002. V. 58. P. 53–64.
https://doi.org/10.1016/s1567-5394(02)00132-9

55. *Dalby B., Cates S., Harris A., Ohki E.C., Tilkins M.L., Price P.J., Ciccarone V.C.* // Methods. 2004. V. 33. P. 95–103.
https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2003.11.023

Influence of Liposome Composition on Plasmid DNA Delivery to Eukaryotic Cells

A. A. Mikheev*, E. V. Shmendel, G. V. Nazarov*, and M. A. Maslov**,[#]**

[#]*Phone: +7 (916) 386-99-82; e-mail: mamaslov@mail.ru*

**Federal State Unitary Enterprise "Scientific Center "Signal", ul. Bolshaya Olenya 8, Moscow, 107014 Russia*

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

Gene therapy is a promising method for the treatment of various diseases by introducing therapeutic nucleic acids, for the delivery of which cationic liposomes are widely used. This work demonstrates the ability of cationic liposomes consisting of a polycationic lipid 2X3 (1,26-bis(cholest-5-en-3β-yloxycarbonylamino)-7,11,16,20-tetraazagehexacosane tetrahydrochloride) and helper lipid DOPE (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine) at various ratios (2.5 : 1 (**L1**); 2 : 1 (**L2**); 1.5 : 1 (**L3**); 1 : 1 (**L4**); 1 : 1.5 (**L5**); 1 : 2 (**L6**); 1 : 2.5 (**L7**)) mediate the delivery of plasmid DNA (pDNA) into HEK293 cells with an efficiency higher than that of the commercial transfectant Lipofectamine 2000. We found that transfection activity of cationic liposomes depends on their composition and lipoplex composition (N/P ratio).Cationic liposomes were non-toxic into eukaryotic HEK293 cells and were more effective than Lipofectamine 2000 at the N/P ratios ≥ 6/1. In this case, the highest efficiency was achieved for liposomes **L2**. At lower N/P ratios = 1/1, 2/1 and 4/1 liposomes **L1** can be used for provide targeted NA delivery into cells. Thus, for further *in vivo* experiments, non-toxic and small-size liposomes **L1** and **L2** in which the amount of lipid 2X3 was 2 or more times higher than that of lipid helper DOPE were selected.

Keywords: cationic lipids, transfection, liposomes, pDNA, non-viral delivery vehicles

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 5, с. 583–592

УДК 577.19:595.787

ЭНАНТИОМЕРЫ *втор*-БУТИЛДОДЕЦЕН-2-ОАТА КАК ПОЛОВЫЕ АТТРАКТАНТЫ[1]

© 2021 г. К. А. Ефетов*, #, Е. Е. Кучеренко*

**Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского, Россия, 295051 Симферополь, бульвар Ленина, 5/7*

Поступила в редакцию 12.03.2021 г.
После доработки 15.03.2021 г.
Принята к публикации 17.03.2021 г.

Интерес к изучению феромонных систем животных растет с каждым годом. Семейство Zygaenidae (Insecta, Lepidoptera), выступающее модельной группой наших исследований, включает более 1000 видов, но структура половых феромонов и аттрактантов выяснена только для небольшого числа видов у двух из пяти подсемейств. Анализ литературных данных о химическом составе и строении известных половых феромонов и половых аттрактантов Zygaenidae позволил выявить особенности молекулярной структуры, предположительно определяющие аттрактивные свойства. Целенаправленный синтез потенциальных половых аттрактантов с заданными структурными особенностями осуществлялся из додекановой кислоты и стереоизомеров хирального спирта бутанола-2. Тестирование аттрактивных свойств полученных соединений (*R*- и *S*-энантиомеров *втор*-бутилдодецен-2-оата, а также оптически неактивной рацемической смеси данных сложных эфиров) проводили в течение семи лет в 14 странах мира. Было показано, что *R*- и *S*-энантиомеры *втор*-бутилдодецен-2-оата – половые аттрактанты, привлекающие самцов 22 видов Zygaenidae, относящихся к шести родам: *Theresimima* Strand, 1917 (1 вид), *Illiberis* Walker, 1854 (1 вид), *Goasrea* Mollet, 2016 (1 вид), *Rhagades* Wallengren, 1863 (3 вида), *Adscita* Retzius, 1783 (9 видов) и *Jordanita* Verity, 1946 (7 видов). Кроме того, аттрактивные свойства *втор*-бутилдодецен-2-оата установлены для трех видов из других семейств Insecta: *Argyresthia semifusca* (Haworth, 1828) (Lepidoptera, Yponomeutidae), *Dolicharthria stigmosalis* (Herrich-Schäffer, 1848) (Lepidoptera, Crambidae) и *Tilloidea unifasciata* (Fabricius, 1787) (Coleoptera, Cleridae). Обонятельные рецепторы самцов, воспринимающие химические сигналы, могут дифференцировать оптические изомеры: одни виды привлекаются преимущественно на *R*-энантиомер *втор*-бутилдодецен-2-оата, другие – на *S*-энантиомер, а для третьих биологически активной оказывается рацемическая смесь. Использование новых синтетических половых аттрактантов в эколого-фаунистических исследованиях дало возможность открыть два новых вида и один род Procridinae (Zygaenidae), уточнить границы ареалов редких видов и изучить их биологию. Применение полученных соединений для обнаружения и мониторинга сезонной динамики численности видов-вредителей (*Theresimima ampellophaga* (Bayle-Barelle, 1808), *Rhagades* (*Rhagades*) *pruni* (Denis & Schiffermüller, 1775), *Illiberis* (*Primilliberis*) *pruni* Dyar, 1905) представляется перспективным для оптимизации борьбы с ними с учетом современных требований охраны окружающей среды. Кроме того, полученные данные о функционировании и строении аттрактантов Procridinae в комплексе с традиционными морфологическими и цитогенетическими подходами могут быть использованы для анализа филогенетических связей и решения проблем биосистематики Zygaenidae.

Ключевые слова: половой аттрактант, втор-бутилдодецен-2-оат, бутанол-2, ненасыщенные жирные кислоты, сложный эфир, энантиомеры, Zygaenidae, Procridinae

DOI: 10.31857/S0132342321050249

ВВЕДЕНИЕ

Со времени установления химической природы первого полового феромона и осуществления его синтеза немецкими биохимиками во главе с А. Бутенандтом интерес к исследованию феромонных систем животных растет с каждым годом [1]. Открытие Бутенандта доказало, что обонятельные сигналы дискретны, имеют молекулярную основу, а значит, могут быть идентифицированы и искусственно воссозданы. Однако трудности, связанные с точным воспроизведением феромонного сигнала вследствие чрезвычайно высокой биологической активности и, как правило, многокомпонентности половых феромонов,

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

Сокращения: EFETOV-2 – рацемическая смесь *R*- и *S*-энантиомеров *втор*-бутилдодецен-2-оата; EFETOV-S-2 – (*R*)-*втор*-бутилдодецен-2-оат; EFETOV-S-S-2 – (*S*)-*втор*-бутилдодецен-2-оат.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (978) 835-24-96; эл. почта: shysh1981@mail.ru).

существенно усложняют их изучение и получение в лабораторных условиях [2, 3]. В связи с этим перспективным выступает создание на основе доступного сырья синтетических аналогов половых феромонов – половых аттрактантов (веществ, привлекающих и/или возбуждающих особей одного из полов, но не присутствующих или пока не найденных в феромонных железах животного этого вида). При этом на первый план выходит прогнозирование молекулярной структуры аттрактантов на основе обобщения и систематизации имеющихся данных о химическом составе и строении природных половых феромонов. Рядом авторов была установлена достоверная связь между структурой аттрактивных веществ и систематическим положением некоторых групп Insecta, в частности Lepidoptera. Было показано, что существует определенная система в распространении привлекающих молекул внутри таксонов [4–6]. Выявленные закономерности необходимо рационально использовать при направленном синтезе аттрактантов, т.к. это позволит с большой долей вероятности не только предсказывать их молекулярную структуру, но и определять в дальнейшем тактику полевого скрининга.

Для нашего исследования было выбрано семейство Zygaenidae (Insecta, Lepidoptera), представители которого осуществляют поиск особей противоположного пола, используя как визуальные сигналы [7], так и половые феромоны [8]. В семействе Zygaenidae есть как редкие, охраняемые виды, так и вредители сельского (виноградарство, садоводство) и лесного хозяйства, в частности *Illiberis* (*Primilliberis*) *pruni* Dyar, 1905, *Hedina tenuis* (Butler, 1877), *Theresimima ampellophaga* (Bayle-Barelle, 1808), *Rhagades* (*Rhagades*) *pruni* (Denis & Schiffermüller, 1775). Часто встречающиеся виды рода *Zygaena* благодаря своей яркой, хорошо заметной окраске и дневному образу жизни могут быть выбраны в качестве удобных биоиндикаторов в экологических исследованиях для оценки благополучия окружающей среды. В настоящее время семейство Zygaenidae включает более 1000 видов и представлено пятью подсемействами: Inouelinae Efetov & Tarmann, 2017; Procridinae Boisduval, 1828; Chalcosiinae Walker, 1865; Callizygaeninae Alberti, 1954 и Zygaeninae Latreille, 1809 [9–16]. Однако структура половых феромонов и аттрактантов выяснена только для небольшого числа видов у двух из пяти подсемейств (Zygaeninae и Procridinae). Все известные аттрактивные молекулы у Zygaenidae принадлежат к классу сложных эфиров. Для Zygaeninae привлекающей способностью обладают эфиры уксусной кислоты и жирных алифатических ненасыщенных спиртов, а для Procridinae – эфиры *втор*-бутилового спирта и жирных ненасыщенных кислот [17–26].

Цель данного исследования – синтез новых половых аттрактантов Procridinae (*R*- и *S*-энантиомеров *втор*-бутилдодецен-2-оата) и изучение их биологической активности путем полевых испытаний в условиях агробиоценозов и естественных биотопов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ литературных данных о составе и строении известных половых феромонов и половых аттрактантов Zygaenidae позволил выделить несколько особенностей химической структуры, присущих всем аттрактивным молекулам Procridinae: 1) принадлежность к классу сложных эфиров, образованных бутанолом-2 и моноеновой жирной кислотой; 2) наличие двойной связи с *цис*-конфигурацией в кислотном радикале у седьмого или девятого атомов; 3) содержание четного количества атомов углерода (12 или 14) в кислотном радикале; 4) наличие одного хирального центра в спиртовом радикале [27, 28]. Таким образом, потенциальными половыми аттрактантами Procridinae могут быть *R*- и *S*-энантиомеры *втор*-бутилдодецен-2-оата, отвечающие практически всем перечисленным требованиям, за исключением расположения двойной связи у второго атома углерода в ацильном радикале. Синтез данных эфиров был осуществлен из бутанола-2 и лауриновой кислоты (см. “Эксперим. часть”). Существенное преимущество предлагаемой схемы синтеза заключается в ее относительной простоте и малостадийности.

Аттрактивные свойства рацемической смеси *R*- и *S*-энантиомеров *втор*-бутилдодецен-2-оата. В 2013 и 2014 гг. тестирование рацемической смеси *R*- и *S*-энантиомеров *втор*-бутилдодецен-2-оата (запатентованное название EFETOV-2) проводили только в Крыму в различных биотопах, известных как местообитания видов Zygaenidae. В 2015–2019 гг. полевые эксперименты выполняли дополнительно в других странах мира. Полученные результаты подтвердили выдвигаемую нами гипотезу об аттрактивности *втор*-бутилдодецен-2-оата. Было установлено, что EFETOV-2 – половой аттрактант для самцов 20 видов Procridinae. При этом в контрольных ловушках (содержащих резиновую пробку, не пропитанную аттрактантом) за все время наблюдений не было обнаружено ни одного представителя Zygaenidae. Относительно высокая аттрактивность EFETOV-2 показана для 13 видов Procridinae: *Theresimima ampellophaga* (Bayle-Barelle, 1808) [29–33], *Adscita* (*Procriterna*) *subtristis* (Staudinger, 1887) [34], *Adscita* (*Adscita*) *alpina* (Alberti, 1937) [35], *Adscita* (*Adscita*) *italica* (Al-

Рис. 1. Ловушка с аттрактантом EFETOV-2 с 56 отловленными самцами *Jordanita* (*Tremewania*) *notata*. Крым, окр. г. Белогорск, гора Сары-Кая, 01.06.2014.

berti, 1937) [35], *Adscita* (*Adscita*) *statices* (Linnaeus, 1758) [30, 36], *Adscita* (*Adscita*) *geryon* (Hübner, 1813) [37], *Adscita* (*Tarmannita*) *mannii* (Lederer, 1853) [35], *Adscita* (*Tarmannita*) *bolivari* (Agenjo, 1937) [38], *Jordanita* (*Tremewania*) *notata* (Zeller, 1847) [37], *Jordanita* (*Tremewania*) *splendens* (Staudinger, 1887) [34], *Jordanita* (*Jordanita*) *graeca* (Jordan, 1907) [29, 37], *Jordanita* (*Praviela*) *anatolica* (Naufock, 1929) [39] и *Jordanita* (*Praviela*) *rietzschi* Keil, 2016 [40].

Самая высокая аттрактивность EFETOV-2 была отмечена для самцов *J.* (*T.*) *notata*. Среднее количество отловленных самцов одной ловушкой в неделю – 30.53 ± 9.60. Максимальная наполненность ловушки за неделю составляла 56 особей, что соответствовало практически полной насыщенности липкого слоя (рис. 1) [37].

Самцы семи видов Procridinae: *Rhagades* (*Wiegelia*) *amasina* (Herrich-Schäffer, 1851) [39], *Rhagades* (*Rhagades*) *pruni* ([Denis & Schiffermüller], 1775) [37], *Adscita* (*Adscita*) *obscura* (Zeller, 1847) [39], *Adscita* (*Adscita*) *dujardini* Efetov & Tarmann, 2014 [35], *Jordanita* (*Jordanita*) *globulariae* (Hübner, 1793) [29, 30, 37], *Jordanita* (*Solaniterna*) *subsolana* (Staudinger, 1862) [30] и *Goazrea lao* Mollet, 2016 – обнаруживались в ловушках при их контроле и/или подлетали к приманкам с EFETOV-2, но в количестве 1–2 особей. Объяснение этому явлению было найдено позже, когда для полевых экспериментов стали использовать приманки с EFETOV-S-2 и EFETOV-S-S-2, содержащие не смесь *R*- и *S*-энантиомеров *втор*-бутилдодецен-2-оата, а каждый из них по отдельности.

В ходе экспериментов с EFETOV-2 мы наблюдали два разных типа поведенческих ответов привлекаемых особей. Самцы таких видов, как *Th. ampellophaga* и *J.* (*T.*) *notata*, не только подлетали к аттрактанту, но и накапливались в больших количествах на клеевых вкладышах ловушек с приманками. Представители других видов, например, *A.* (*A.*) *geryon* и *J.* (*J.*) *graeca*, хоть и подлетали на близкое расстояние к переносным приманкам, проявляя типичное брачное поведение, характерное для самцов Procridinae, но в стационарных ловушках либо отсутствовали, либо обнаруживались в единичных экземплярах [37]. Объяснений может быть несколько. Во-первых, в воздушном пространстве внутри ловушки может создаваться слишком высокая концентрация аттрактанта, дезориентирующая самцов. Вероятно, именно поэтому в 2014 г. две “свежеприготовленные” приманки с аттрактантом EFETOV-2 привлекали только до четырех самцов *A.* (*A.*) *geryon*, которые в течение первых 15–20 мин эксперимента подлетали к резиновым пробкам на близкое расстояние 5–20 см. В то же время в 2016 и 2018 гг. мы наблюдали уже активное “роение” самцов *A.* (*A.*) *geryon* (до 60 особей) вокруг тех же двух приманок. Скорее всего, длительное хране-

ние могло вызвать существенное снижение концентрации аттрактанта за счет его испарения и, как следствие, повышение эффективности приманок с EFETOV-2 по привлечению самцов указанного вида. Во-вторых, хорошо известно, что половые феромоны самок многих видов многокомпонентны [1], что не исключено и для самок *A.* (*A.*) *geryon* и *J.* (*J.*) *graeca*. Тогда *R*- и *S*-энантиомеры *втор*-бутилдодецен-2-оата, входящие в состав аттрактанта EFETOV-2, могут быть структурно похожи на минорные соединения природной феромонной композиции этих видов. В любом случае, необходимо проведение дополнительных исследований по оценке биологической активности EFETOV-2 в отношении указанных видов с разными конструкциями ловушек, дозами аттрактанта и комбинациями его компонентов.

Для *A.* (*P.*) *subtristis*, *A.* (*A.*) *alpina*, *A.* (*A.*) *italica*, *A.* (*A.*) *statices*, *A.* (*A.*) *dujardini*, *A.* (*T.*) *bolivari*, *J.* (*T.*) *splendens*, *Rh.* (*W.*) *amasina* и *J.* (*S.*) *subsolana* половой аттрактант был обнаружен впервые. Кроме того, применение приманок с EFETOV-2 дало возможность открыть два новых для науки вида Procridinae: *Goazrea lao* Mollet, 2016 (обитает в Лаосе и Таиланде) [27, 28] и *Jordanita* (*Praviela*) *rietzschi* Keil, 2016 (обитает в Иране) [27, 28, 40]. Наконец, полевой скрининг аттрактанта EFETOV-2 в разных странах мира позволил расширить границы ареала некоторых видов. Так, *J.* (*J.*) *globulariae* была впервые обнаружена в Турции [30], *Th. ampellophaga* – в Албании [32] и на полуострове Халкидики (Греция) [31]. Ранее достоверных сведений о присутствии этих видов в указанных регионах не было. В Македонии *Th. ampellophaga* с помощью аттрактивных приманок была найдена в первый раз за последние 80 лет [33]. Эти факты указывают на высокую чувствительность и эффективность EFETOV-2 как полового аттрактанта, поскольку он позволяет обнаруживать популяции целевых видов даже с низкой плотностью.

Аттрактивность *R*- и *S*-энантиомеров *втор*-бутилдодецен-2-оата. С 2015 г., после подтверждения аттрактивности рацемической смеси *R*- и *S*-энантиомеров *втор*-бутилдодецен-2-оата для самцов ряда видов Procridinae, полевые испытания были продолжены с каждым изомером по отдельности: (*R*)-*втор*-бутилдодецен-2-оатом (аттрактант EFETOV-S-2) и (*S*)-*втор*-бутилдодецен-2-оатом (аттрактант EFETOV-S-S-2). Приманки сначала тестировали в Крыму. Только после получения положительных результатов сравнительный скрининг синтетических половых аттрактантов проводили в других странах мира.

В обобщенном виде итоги экспериментов, выполненных в Крыму (Россия), представлены в табл. 1. Самцы шести видов Procridinae активно реагировали на тестируемые приманки. Причем были отмечены три различных варианта реакции самцов на аттрактанты EFETOV-S-2 и EFETOV-S-S-2: 1) *Th. ampellophaga*, *J.* (*T.*) *notata*, *J.* (*J.*) *globulariae* и *J.* (*S.*) *subsolana* успешно отлавливались ловушками с EFETOV-S-2 и полностью игнорировали таковые с EFETOV-S-S-2; 2) *Rh.* (*Rh.*) *pruni* активно реагировали на аттрактант EFETOV-S-S-2, а на липких слоях ловушек с EFETOV-S-2 обнаруживались лишь единичные особи; 3) *J.* (*J.*) *graeca* регистрировались в ловушках как с EFETOV-S-2, так и EFETOV-S-S-2, но в количестве не более 1–2 особей в одной ловушке.

Результаты полевого скрининга аттрактантов EFETOV-S-2 и EFETOV-S-S-2, полученные в Крыму, нашли дальнейшее подтверждение во время наших исследований в других странах мира. Так, в ловушки или к переносным приманкам с EFETOV-S-2 привлекались самцы *Th. ampellophaga* в Турции [30], *J.* (*J.*) *globulariae* – в Италии [35], а *J.* (*S.*) *subsolana* – в Австрии, Италии [35] и Турции [30, 39]. При этом к приманкам с EFETOV-S-S-2 самцы этих видов были индифферентны, что подтверждает итоги крымских экспериментов. Однако если в Крыму самая высокая аттрактивность EFETOV-S-2 была отмечена для *J.* (*T.*) *notata* (показатели отловов доходили до 31.42 ± 17.25 самцов на ловушку в неделю в 2015 г.), то в Италии самая высокая эффективность EFETOV-S-2 как полового аттрактанта была отмечена для самцов *J.* (*S.*) *subsolana* (в течение 30 мин к одной приманке могли подлетать более 100 возбужденных особей). Именно благодаря применению EFETOV-S-2 стало возможным открыть новые локалитеты этого вида в трех провинциях Италии [35].

В отличие от указанных видов, наиболее сильными аттрактивными свойствами для *Rh.* (*Rh.*) *pruni* обладает EFETOV-S-S-2 (средние значения отловов в Крыму достигали 15.47 ± 7.21 самцов на ловушку в неделю в 2017 г.). Этот факт был подтвержден экспериментами в Италии, где только с помощью данного аттрактанта стало возможным обнаружить популяции вида впервые с 1906 г. [35], и Испании, где вид также считается очень редким и не регистрировался более четверти века [38]. Кроме того, в Испании к половому аттрактанту EFETOV-S-S-2 был привлечен еще один очень редкий эндемичный вид *Rhagades* (*Wiegelia*) *predotae* (Naufock, 1930), ранее известный лишь по единичным экземплярам, хранящимся в музейных коллекциях [38]. Применение полового аттрактанта дало возможность обнаружить популяцию этого вида в провинции Куэнка на востоке Испании, а впоследствии описать биологию этого вида [41]. Наконец, в Турции, в Центральной Анатолии, самцы еще одного вида данного рода,

Таблица 1. Результаты тестирования половых аттрактантов EFETOV-S-2 и EFETOV-S-S-2 по привлечению самцов шести видов Procridinae (Zygaenidae) в Крыму в 2015–2017 гг.

Аттрактант	Количество самцов, привлеченных аттрактивными ловушками			
	2015	2016	2017	Всего
Theresimima ampellophaga				
EFETOV-S-2	41	4	95	140
EFETOV-S-S-2	–	0	0	0
Rhagades (*Rhagades*) *pruni*				
EFETOV-S-2	13	11	4	28
EFETOV-S-S-2	–	77	91	168
Jordanita (*Tremewania*) *notata*				
EFETOV-S-2	113	52	–	165
EFETOV-S-S-2	–	0	–	0
Jordanita (*Jordanita*) *graeca*				
EFETOV-S-2	2	7	1	10
EFETOV-S-S-2	–	1	0	1
Jordanita (*Jordanita*) *globulariae*				
EFETOV-S-2	25	63	–	88
EFETOV-S-S-2	–	0	–	0
Jordanita (*Solaniterna*) *subsolana*				
EFETOV-S-2	44	28	4	76
EFETOV-S-S-2	–	0	0	0

Примечание: знак "–" указывает на то, что испытания аттрактантов EFETOV-S-2 и/или EFETOV-S-S-2 в местообитаниях вида не проводились.

В контрольных ловушках не было обнаружено ни одного представителя Procridinae за весь период наблюдений.

а именно *Rh.* (*W.*) *amasina*, накапливались на липких слоях ловушек с приманками EFETOV-S-S-2, полностью игнорируя таковые с EFETOV-S-2 [39]. Следует отметить, что в Восточной Фракии (европейская часть Турции) дважды регистрировались одиночные самцы *Rh.* (*Rh.*) *pruni* в ловушках с EFETOV-S-2 [30]. Но этот факт не противоречит данным наших наблюдений в Крыму, особенно с учетом того, что аттрактант EFETOV-S-S-2 в указанной части Турции не тестировался.

Таким образом, результаты тестирования EFETOV-S-2 и EFETOV-S-S-2 в Крыму, Испании, Италии и Турции дали основание выдвинуть гипотезу, что *S*-энантиомер *втор*-бутилдодецен-2-оата – "родовой" половой аттрактант, привлекающий самцов различных видов рода *Rhagades* Wallengren, 1863. Поскольку половые аттрактанты часто напоминают строение половых феромонов, то с определенной долей вероятности можно говорить о консервативности структуры половых феромонов у видов рода *Rhagades*. Для подтверждения данной гипотезы необходимо проверить аттрактивные свойства EFETOV-S-S-2 в отношении двух иранских видов из этого же рода: *Rh.* (*Naufockia*) *brandti* (Alberti, 1938) и *Rh.* (*Wiegelia*) *tarmanni* Keil, 1999.

Скрининг EFETOV-S-2 и EFETOV-S-S-2 за пределами Крыма выявил их аттрактивные свойства в отношении еще нескольких видов Procridinae, не встречающихся в Крыму. В частности, высокая аттрактивность EFETOV-S-S-2 была показана для *Goazrea lao* Mollet, 2016. На севере Таиланда серия самцов этого вида была отловлена с помощью приманок с EFETOV-S-S-2. Причем уже после 10 мин экспозиции аттрактанта к резиновой пробке начинали подлетать первые возбужденные особи. Интересно, что долгое время этот относительно крупный летающий днем вид Procridinae оставался неизвестным науке, а обнаружен был благодаря экспериментам с синтезированными нами половыми аттрактантами.

EFETOV-S-2 оказался новым половым аттрактантом для *Illiberis* (*Primilliberis*) *pruni* Dyar, 1905: 23 самца было отловлено с 4 по 14 июня 2016 г. в Японии в городе Наруто ловушками с EFETOV-S-2. В то же время близкий вид из того же рода и подрода – *Illiberis* (*Primilliberis*) *rotundata* Jordan, 1907 – их игнорировал [42]. В Турции активно реагировали на половой аттрактант EFETOV-S-2

самцы *J.* (*P.*) *anatolica*. При этом ловушками с аттрактантом EFETOV-S-S-2 не было отловлено ни одной особи *J.* (*P.*) *anatolica* [39]. EFETOV-S-2 оказался активным и в отношении самцов *A.* (*A.*) *statices*, что показали полевые эксперименты в России (Московская область) [43], Италии [35], Турции [30] и Швеции [36]. Наиболее массовым оказалось привлечение более 250 самцов подвида *A.* (*A.*) *statices statices* в Швеции, в трех локалитетах провинций Сконе и Естрикланд: 215 самцов в 2016 г. и 40 – в 2017 г. Наконец, в Италии самцы *A.* (*A.*) *alpina* подлетали тоже только к приманкам с EFETOV-S-2 [35].

Если для перечисленных выше видов более сильными аттрактивными свойствами обладал один из двух вариантов синтетических энантиомеров, то самцы таких видов Procridinae, как *A.* (*A.*) *italica* [35], *A.* (*A.*) *obscura* [39], *A.* (*T.*) *mannii* [35] и *Jordanita* (*Jordanita*) *tenuicornis* (Zeller, 1847) [35], не проявляли предпочтение к одному из исследуемых аттрактантов и привлекались к приманкам с EFETOV-S-2 и EFETOV-S-S-2 в относительно равных количествах.

Таким образом, сравнительный полевой скрининг синтетических половых аттрактантов EFETOV-S-2 и EFETOV-S-S-2 показал, что обонятельные рецепторы самцов, воспринимающие химические сигналы, могут дифференцировать оптические изомеры. Такие виды, как *Rh.* (*W.*) *amasina*, *Rh.* (*W.*) *predotae*, *Rh.* (*Rh.*) *pruni*, *G. lao*, привлекаются преимущественно на EFETOV-S-S-2 (*S*-энантиомер *втор*-бутилдодецен-2-оата), в то время как *I.* (*P.*) *pruni*, *Th. ampellophaga*, *A.* (*A.*) *alpina*, *A.* (*A.*) *statices*, *J.* (*T.*) *notata*, *J.* (*J.*) *globulariae*, *J.* (*P.*) *anatolica*, *J.* (*S.*) *subsolana* – на EFETOV-S-2 (*R*-энантиомер).

Интересно отметить, что в литературе описано правило “one-step”, установленное эмпирическим путем для Noctuidae (Lepidoptera). Авторы на конкретных примерах показывают, что компоненты половых феромонов или половых аттрактантов самок разных видов этого семейства отличаются друг от друга только одним структурным изменением (“one-change” step), например, изменением положения двойной связи, длины углеродной цепи или типа функциональной группы [44]. Синтезированные нами энантиомеры *втор*-бутилдодецен-2-оата отличаются от компонентов известных природных половых феромонов/аттрактантов Procridinae, в частности энантиомеров *втор*-бутилдодецен-7-оата [27, 28], также одним структурным изменением – позицией двойной связи не у седьмого, а у второго атома углерода. Значит, правило “one-change” step справедливо и для Zygaenidae. В определенной мере это позволяет прогнозировать структуру половых аттрактантов, определять тактику их полевого скрининга и повышать его результативность.

Привлечение нецелевых видов других семейств. Многокомпонентность половых феромонов большинства групп Insecta приводит к тому, что отдельные составляющие феромонных композиций повторяются у представителей разных таксономических групп [1]. В наших крымских экспериментах также было отмечено присутствие в липких ловушках не только самцов Procridinae, но и представителей других семейств и даже отрядов Insecta.

Argyresthia semifusca (Haworth, 1828) (Lepidoptera, Yponomeutidae). В 2016 г. с 17 мая по 21 июня ловушкой с EFETOV-S-S-2 было отловлено 45 самцов данного вида (Крым, гора Чатыр-Даг, 31 ♂ – 30.05.2016, 7 ♂ – 10.06.2016, 7 ♂ – 21.06.2016). Среднее количество самцов в ловушке за сезон: 1.53 ± 0.93 самец на ловушку в день. В литературе имеются сведения о том, что половым аттрактантом для данного вида выступает сложный эфир – *цис*-додецен-7-илацетат [45]. Такой сложный эфир – половой аттрактант для самцов ряда видов Zygaeninae [27].

Dolicharthria stigmosalis (Herrich-Schäffer, 1848) (Lepidoptera, Crambidae). Всего 16 самцов было отловлено ловушками с EFETOV-S-2: 11 ♂ – Крым, гора Чатыр-Даг, 28.06.2015; 5 ♂ – Крым, окр. г. Алушта, с. Лучистое, 10.06.2016. Для данного вида половой аттрактант обнаружен впервые.

Tilloidea unifasciata (Fabricius, 1787) (Coleoptera, Cleridae). Энантиомеры *втор*-бутилдодецен-2-оата по отдельности и в смеси привлекают самцов этого вида. В 2013–2017 гг. в Крыму в ловушках с разными аттрактантами был зарегистрирован 51 самец: EFETOV-2 (30 ♂), EFETOV-S-2 (15 ♂), EFETOV-S-S-2 (6 ♂). Различия между привлечением *T. unifasciata* на половые аттрактанты разного типа статистически недостоверны ($p > 0.05$). При этом за весь период наблюдений ни в одной из контрольных ловушек (23 штуки) не было обнаружено ни одной особи *T. unifasciata*, что исключает вероятность случайного прилета самцов на приманки. Ранее было показано, что аттрактивными свойствами по отношению к самцам *T. unifasciata* обладает также *втор*-бутилдодеканоат [46], отличающийся от синтезированного нами *втор*-бутилдодецен-2-оата лишь предельностью ацильного радикала. Следовательно, наличие двойной связи в структуре молекулы аттрактанта – не определяющее для данного вида, как и (*R*, *S*)-изомерия спиртового радикала.

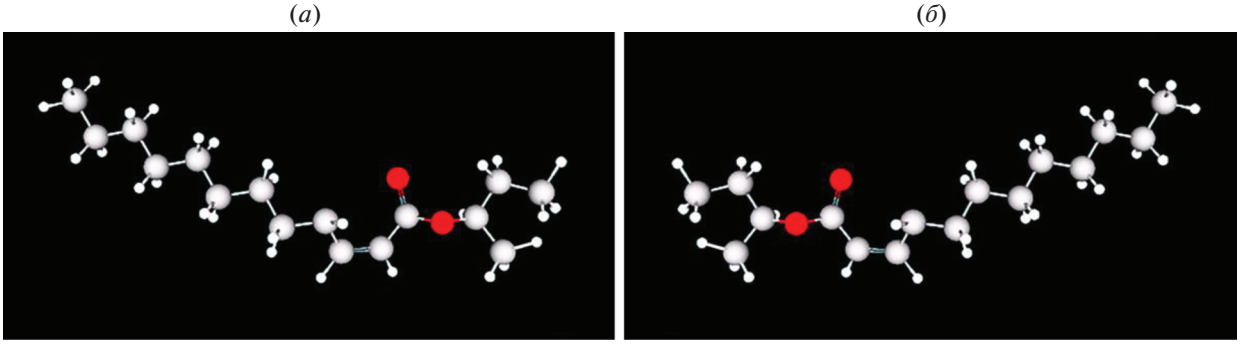


Рис. 2. (*а*) – (*R*)-*втор*-бутилдодецен-2-оат (аттрактант EFETOV-S-2); (*б*) – (*S*)-*втор*-бутилдодецен-2-оат (аттрактант EFETOV-S-S-2). Модель молекул построена с помощью компьютерной программы VChemLab8 (МарГТУ, Россия). Красным цветом выделены атомы кислорода.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Целенаправленный синтез сложных эфиров с заданными структурными особенностями осуществляли в три этапа: 1) бромирование додекановой (лауриновой) кислоты (х.ч., Укроргсинтез, Украина) с получением 2-бромдодекановой кислоты; 2) образование сложного эфира *втор*-бутил-2-бромдодеканоата при взаимодействии 2-бромдодекановой кислоты с бутанолом-2 (99.5%; Sigma-Aldrich, Германия) в условиях кислотного катализа; 3) образование двойной связи во втором положении в кислотном радикале сложного эфира *втор*-бутил-2-бромдодеканоата в присутствии хинолина с целью получения *втор*-бутилдодецен-2-оата [29]. Полученный продукт представлял собой рацемическую смесь, состоящую из эквимолярных количеств *R*- и *S*-энантиомеров *втор*-бутилдодецен-2-оата. Данный эфир маркировали запатентованным названием EFETOV-2 [47].

Энантиомерно чистые (*R*)-*втор*-бутилдодецен-2-оат и (*S*)-*втор*-бутилдодецен-2-оат синтезировали по указанной выше методике, но отличие заключалось в том, что на втором этапе в реакции этерификации использовали или (*R*)-(–)-бутанол-2 (99%, Sigma-Aldrich, США), или (*S*)-(+)-бутанол-2 (99%, Sigma-Aldrich, США). Соответственно, получили два энантиомерно чистых сложных эфира, которые маркировали EFETOV-S-2 – (*R*)-*втор*-бутилдодецен-2-оат и EFETOV-S-S-2 – (*S*)-*втор*-бутилдодецен-2-оат (рис. 2).

Для оценки аттрактивных свойств синтезированных сложных эфиров проводили сравнительный скрининг в полевых условиях в 2013–2019 гг. в 14 странах: Австрии, Албании, Греции, Иране, Испании, Италии, Лаосе, Македонии, России, Таиланде, Таджикистане, Турции, Швеции и Японии.

Половые аттрактанты EFETOV-2, EFETOV-S-2 и EFETOV-S-S-2 наносили на резиновые диспенсеры в объемах 50, 100 или 200 мкл. После полной адсорбции аттрактантов (в течение 48–96 ч) пробки закрепляли в картонные прямоугольные полоски (приманки). При необходимости длительного хранения резиновые пробки с аттрактантом упаковывали в фольгу и помещали в морозильную камеру. Промаркированные приманки фиксировали в прозрачные пластиковые дельта-ловушки со сменными липкими пластинами на расстоянии нескольких сантиметров от клеевой поверхности. На сменные пластины для отлова насекомых наносили клей Tanglefoot® (США), не имеющий запаха и не содержащий инсектициды и пестициды. В зависимости от продолжительности эксперимента ловушки с приманками или непосредственно приманки закрепляли в выбранных биотопах на ветках растений или другой опоре на высоте 1–1.5 м от земли. На расстоянии не менее 10 м размещали контрольную ловушку или картонную прямоугольную полоску с идентичной резиновой пробкой, но не пропитанной аттрактантом. В случае использования приманок разного типа в одном биотопе выдерживали расстояние между ними более 10 м.

Индикатор аттрактивных свойств синтезированных продуктов – наличие особей конкретного вида в опытных ловушках и отсутствие таковых в контрольных. Главный критерий активности аттрактанта – количество и пол привлеченных особей. По данным показателям оценивали видовую и половую специфичность аттрактантов. Сведения о составе половых феромонов и химической структуре половых аттрактантов привлеченных видов, а также их научную новизну проверяли по электронной глобальной базе данных “The Pherobase” (www.pherobase.com) [1], которая находится в свободном доступе и регулярно обновляется.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования показали, что прогнозирование молекулярной структуры половых аттрактантов на основе обобщения и систематизации литературных данных о химическом составе и строении природных феромонов – одна из предпосылок их успешного синтеза. На основе доступного сырья была разработана относительно простая, малостадийная схема получения ранее неизвестных половых аттрактантов Zygaenidae. Эти вещества представляют собой сложные эфиры бутанола-2 и додецен-2-овой кислоты.

В ходе полевого скрининга было установлено, что *R*- и *S*-энантиомеры *втор*-бутилдодецен-2-оата – половые аттрактанты, привлекающие самцов 22 видов Zygaenidae, относящихся к шести родам: *Theresimima* Strand, 1917 (1 вид), *Illiberis* Walker, 1854 (1 вид), *Goasrea* Mollet, 2016 (1 вид), *Rhagades* Wallengren, 1863 (3 вида), *Adscita* Retzius, 1783 (9 видов) и *Jordanita* Verity, 1946 (7 видов). Обонятельные рецепторы самцов, воспринимающие химические сигналы, могут дифференцировать оптические изомеры: одни виды привлекаются преимущественно *R*-энантиомером *втор*-бутилдодецен-2-оата (EFETOV-S-2), другие – *S*-энантиомером (EFETOV-S-S-2), а для третьих биологически активной оказывается рацемическая смесь (EFETOV-2).

Привлечение нецелевых видов *Argyresthia semifusca* (Yponomeutidae), *Dolicharthria stigmosalis* (Crambidae) и *Tilloidea unifasciata* (Cleridae) на синтезированные половые аттрактанты Zygaenidae свидетельствует в пользу гипотезы об использовании филогенетически удаленными группами животных одних и тех же веществ в качестве компонентов половых феромонов вследствие относительно экономного расходования энергетических ресурсов, необходимых для биосинтеза новых соединений.

Использование новых синтетических половых аттрактантов в эколого-фаунистических исследованиях дало возможность открыть два новых вида и один род Procridinae (Zygaenidae), уточнить границы ареалов редких видов и изучить их биологию. Применение полученных соединений для обнаружения и мониторинга сезонной динамики численности видов-вредителей (*Theresimima ampellophaga* (Bayle-Barelle, 1808), *Rhagades* (*Rhagades*) *pruni* (Denis & Schiffermüller, 1775), *Illiberis* (*Primilliberis*) *pruni* Dyar, 1905) представляется перспективным для оптимизации борьбы с ними с учетом современных требований охраны окружающей среды. Кроме того, полученные данные о функционировании и строении аттрактантов Procridinae в комплексе с традиционными морфологическими и цитогенетическими подходами могут быть использованы для анализа филогенетических связей и решения проблем биосистематики Zygaenidae.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность М.Ю. Баевскому и А.И. Поддубову (Россия) за помощь при синтезе аттрактантов; О.Г. Горбунову, Е.В. Паршковой (Россия), G.M. Tarmann (Австрия), B. Vrenozi (Албания), A. Nahirnić-Beshkova (Болгария), T. Keil (Германия), F. Can (Турция), J.-M. Desse и B. Mollet (Франция), N. Ryrholm (Швеция) и C. Koshio (Япония) за содействие при тестировании аттрактантов, а также З.С. Гершензон (Украина) и M. Kahlen (Австрия) за консультационную помощь.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данная работа выполнена за счет собственных средств авторов в рамках инициативной научно-исследовательской работы “Применение комплекса биохимических, иммунологических, молекулярно-генетических и спектральных методов для изучения иммуноглобулинов человека при патологии, а также решения вопросов эволюционной биологии и хемокоммуникации биологических видов” кафедры биохимии Медицинской академии Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского (№ государственной регистрации НИОКТР: АААА-А19-119011790032-0, научный руководитель – профессор К.А. Ефетов).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *El-Sayed A.M.* // The Pherobase: database of pheromones and semiochemicals, http://www.pherobase.com
2. *Blomquist G.J., Vogt R.G.* // Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology: the Biosynthesis and Detection of Pheromones and Plant Volatiles. London: Elsevier Academic Press, 2003. 768 p.
3. *Francke W., Schulz S.* // Compr. Natur. Prod. II. 2010. V. 4. P. 153–224. https://doi.org/10.1016/b978-008045382-8.00095-2
4. *Гричанов И.Я., Овсянникова Е.И.* // Феромоны для фитосанитарного мониторинга вредных чешуекрылых. СПб.–Пушкин: ВИЗР РАСХН, 2005. 244 с. [*Grichanov I.Ya., Ovsyannikova E.I.* // Pheromones for phytosanitary monitoring of Lepidoptera pests / St. Petersburg–Pushkin: VIZR RAAS, 2005. 244 p.]

5. *Byers J.A.* // J. Anim. Ecol. 2006. V. 75. P. 399–407. https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2006.01060.x
6. *Сафонкин А.Ф.* // Зоол. журн. 2007. Т. 86. С. 1464–1467. [*Safonkin A.F.* // Zool. Zh. 2007. V. 86. P. 1464–1467.]
7. *Назаров В.В., Ефетов К.А.* // Зоол. журн. 1993. Т. 72. С. 54–67. [*Nazarov V.V., Efetov K.A.* // Zool. Zh. 1993. V. 72. P. 54–67.]
8. *Efetov K.A.* // A Review of the Western Palaearctic Procridinae (Lepidoptera: Zygaenidae). Simferopol: CSMU Press, 2001. 328 p.
9. *Efetov K.A.* // Entomol. Gaz. 1999. V. 50. P. 91–95.
10. *Efetov K.A., Hofmann A., Tarmann G.M., Tremewan W.G.* // Nota Lepi. 2014. V. 37. P. 123–133. https://doi.org/10.3897/nl.37.7871
11. *Efetov K.A., Tarmann G.M.* // Entomol. Gaz. 2013. V. 64. P. 33–39.
12. *Efetov K.A., Tarmann G.M.* // Entomol. Gaz. 2013. V. 64. P. 197–206.
13. *Efetov K.A., Tarmann G.M.* // Entomol. Gaz. 2014. V. 65. P. 62–70.
14. *Efetov K.A., Tarmann G.M.* // Entomol. Gaz. 2014. V. 65. P. 179–200.
15. *Efetov K.A., Tarmann G.M.* // SHILAP Revta. Lepid. 2016. V. 44. P. 81–89.
16. *Efetov K.A., Tarmann G.M.* // J. Lep. Soc. 2017. V. 71. P. 20–49. https://doi.org/10.18473/lepi.v71i1.a5
17. *Subchev M.* // Acta Zool. Bulg. 2014. V. 66. P. 147–157.
18. *Efetov K.A., Can F., Toshova T.B., Subchev M.* // Acta Zool. Bulg. 2010. V. 62. P. 315–319.
19. *Subchev M., Efetov K.A., Toshova T., Parshkova E.V., Tóth M., Francke W.* // Entomol. Gen. 2010. V. 32. P. 243–250.
20. *Efetov K.A., Subchev M.A., Toshova T.B., Kiselev V.M.* // Entomol. Gaz. 2011. V. 62. P. 113–121.
21. *Subchev M.A., Koshio C., Toshova T.B., Efetov K.A.* // Entomol. Sci. 2012. V. 15. P. 137–139. https://doi.org/10.1111/j.1479-8298.2011.00485.x
22. *Subchev M., Toshova T., Koshio C., Efetov K.A., Francke W.* // Acta Zool. Bulg. 2013. V. 65. P. 391–396.
23. *Efetov K.A., Hofmann A., Tarmann G.M.* // Nota Lepi. 2014. V. 37. P. 151–160. https://doi.org/10.3897/nl.37.7871
24. *Efetov K.A., Tarmann G.M., Toshova T.B., Subchev M.A.* // Nota Lepi. 2015. V. 38. P. 161–169. https://doi.org/10.3897/nl.38.6312
25. *Subchev M.A., Efetov K.A., Toshova T.B., Koshio C.* // Entomol. Gaz. 2016. V. 67. P. 51–57.
26. *Razov J., Efetov K.A., Franin K., Toshova T.B., Subchev M.A.* // Entomol. Gaz. 2017. V. 68. P. 49–53.
27. *Ефетов К.А., Кучеренко Е.Е.* // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2020. Т. 56. С. 337–349. https://doi.org/10.31857/S0044452920040063
28. *Efetov K.A., Kucherenko E.E.* // J. Evol. Biochem. Physiol. 2020. V. 56. P. 381–395. https://doi.org/10.1134/S0022093020050014
29. *Ефетов К.А., Паршкова Е.В., Баевский М.Ю., Поддубов А.И.* // Укр. биохим. журн. 2014. Т. 86. С. 175–182. [*Efetov K.A., Parshkova E.V., Baevsky M.Y., Poddubov A.I.* // Ukr. Biochem. J. 2014. V. 86. P. 175–182.] https://doi.org/10.15407/ubj86.06.175
30. *Can Cengiz F., Efetov K.A., Kaya K., Kucherenko E.E., Okyar Z., Tarmann G.M.* // Nota Lepi. 2018. V. 41. P. 23–36. https://doi.org/10.3897/nl.41.21065
31. *Tarmann G.M., Efetov K.A., Kucherenko E.E.* // Entomol. Gaz. 2019. V. 70. P. 19–26. https://doi.org/10.31184/G00138894.701.1705
32. *Vrenozi B., Toshova T.B., Efetov K.A., Kucherenko E.E., Rredhi A., Tarmann G.M.* // SHILAP Revta. Lepid. 2019. V. 47. P. 567–576.
33. *Nahirnić-Beshkova A., Beshkov S., Kucherenko E.E., Efetov K.A.* // SHILAP Revta. Lepid. 2021. V. 49. P. 161–170.
34. *Ефетов К.А., Кучеренко Е.Е., Дессе Ж.-М.* // Крымский журн. эксп. и клин. мед. 2016. Т. 6. С. 33–36. [*Efetov K.A., Kucherenko E.E., Desse J.-M.* // Crimean J. Exp. Clin. Med. 2016. V. 6. P. 33–36.]
35. *Efetov K.A., Kucherenko E.E., Tarmann G.M.* // SHILAP Revta. Lepid. 2020. V. 48. P. 733–749.
36. *Efetov K.A., Ryrholm N., Kucherenko E.E.* // XVI International Symposium on Zygaenidae (Izmir, Turkey, 1–5 May 2018). P. 4–5. Izmir: Mustafa Kemal University, 2018. I–VIII.
37. *Efetov K.A., Kucherenko E.E., Parshkova E.V., Tarmann G.M.* // SHILAP Revta. Lepid. 2016. V. 44. P. 519–527.
38. *Efetov K.A., Kucherenko E.E., Tarmann G.M.* // SHILAP Revta. Lepid. 2019. V. 47. P. 307–315.
39. *Can F., Efetov K.A., Burman J., Kaya K., Kucherenko E.E., Ulaşlı B., Tarmann G.M.* // Turk. J. Entomol. 2019. V. 43. P. 189–199. https://doi.org/10.16970/entoted.512580
40. *Keil T.* // Entomol. Nachr. Ber. 2016. V. 60. P. 201–203.
41. *Efetov K.A., Tarmann G.M.* // SHILAP Revta. Lepid. 2020. V. 48. P. 513–524.
42. *Efetov K.A., Koshio C., Kucherenko E.E.* // SHILAP Revta. Lepid. 2018. V. 46. P. 263–270.
43. *Ефетов К.А., Горбунов О.Г.* // Таврический мед.-биол. вестник. 2016. Т. 19. С. 40–46. [*Efetov K.A., Gorbunov O.G.* // Tavricheskiy Mediko-biologicheskiy Vestnik. 2016. V. 19. P. 40–46.]
44. *Steck W., Underhill E.W., Chisholm M.D.* // J. Chem. Ecol. 1982. V. 8. P. 731–754. https://doi.org/10.1007/BF00988315
45. *Tóth M., Szöcs G., Sziráki G., Sauter W.* // J. Appl. Entomol. 1992. V. 113. P. 342–355. https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1992.tb00674.x
46. *Ефетов К.А., Бекетов А.А., Паршиков В.А.* // Таврический мед.-биол. вестник. 2012. Т. 15. С. 345–347. [*Efetov K.A., Beketov A.A., Parshikov V.A.* // Tavricheskiy Mediko-biologicheskiy Vestnik. 2012. V. 15. P. 345–347.]
47. *Ефетов К.А., Кучеренко Е.Е.* // Патент RU 2701644 C1, 30.09.2019.

Enantiomers of 2-Butyl 2-Dodecenoate as Sex Attractants

K. A. Efetov*, # and E. E. Kucherenko*

#Phone: +7 (978) 835-24-96; e-mail: shysh1981@mail.ru

**V.I. Vernadsky Crimean Federal University, bulv. Lenina 5/7, Simferopol, 295051 Russia*

In recent years, there has been an increasing interest in study pheromone systems of animals. The family Zygaenidae (Insecta, Lepidoptera), which is a model group of our research, includes more than 1000 species, but the structure of sex pheromones and sex attractants are known only for a few number of species in two of the five subfamilies. We analyzed the available literature data on the chemical composition and structure of the known sex pheromones and sex attractants of Zygaenidae and revealed the features of the molecular structure presumably determining the attractive properties of it. Synthesis of potential sex attractants with specified structural features was carried out from dodecanoic acid and stereoisomers of the chiral alcohol 2-butanol. The field testing of the attractive properties of the received compounds: *R*- and *S*-enantiomers of 2-butyl 2-dodecenoate, as well as the optically inactive racemic mixture of these esters, was carried out for seven years in fourteen countries of the world. It has been shown that *R*- and *S*-enantiomers of 2-butyl 2-dodecenoate are the sex attractants for the males of 22 Zygaenidae species from six genera: *Theresimima* Strand, 1917 (1 species), *Illiberis* Walker, 1854 (1 species), *Goasrea* Mollet, 2016 (1 species), *Rhagades* Wallengren, 1863 (3 species), *Adscita* Retzius, 1783 (9 species) and *Jordanita* Verity, 1946 (7 species). In addition, the attractive properties of 2-butyl 2-dodecenoate were established for three species of other Insecta families: *Argyresthia semifusca* (Haworth, 1828) (Lepidoptera, Yponomeutidae), *Dolicharthria stigmosalis* (Herrich-Schäffer, 1848) (Lepidoptera, Crambidae) and *Tilloidea unifasciata* (Fabricius, 1787) (Coleoptera, Cleridae). Olfactory receptors of the males, which perceive chemical signals, can differentiate optical isomers: some species are attracted mainly to the *R*-enantiomer of 2-butyl 2-dodecenoate, others to the *S*-enantiomer, and for the third group, the racemic mixture is biologically active. An application of new synthetic sex attractants in ecological and faunistic studies allowed to discover two new species and one genus of Procridinae (Zygaenidae), to clarify distribution boundaries of rare species and to study their biology. The use of synthesized compounds for the detection and monitoring of seasonal dynamics of the quantity of pest species (*Theresimima ampellophaga* (Bayle-Barelle, 1808), *Rhagades* (*Rhagades*) *pruni* (Denis & Schiffermüller, 1775), *Illiberis* (*Primilliberis*) *pruni* Dyar, 1905) can optimize the pest control, taking into account modern environmental protection requirements. In addition, the obtained data on the functioning and structure of Procridinae attractants in combination with traditional morphological and cytogenetic approaches can be used to analyze phylogenetic relationships and solve problems of biosystematics in Zygaenidae.

Keywords: sex attractant, 2-butyl 2-dodecenoate, 2-butanol, unsaturated fatty acids, ester, enantiomers, Zygaenidae, Procridinae

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 5, с. 593–602

УДК 577.151.63:577.151.05:577.151.042

МОДЕЛИРОВАНИЕ РЕГУЛЯЦИИ УРОВНЯ ПРОСТАГЛАНДИНОВ НЕСТЕРОИДНЫМИ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ В ОТКРЫТЫХ СИСТЕМАХ[1]

© 2021 г. А. В. Кривошей*, **, А. А. Ефремов, Е. К. Матвейшина**, ***, В. В. Панова**, П. В. Вржещ*, **, #**

**ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, Международный учебно-научный биотехнологический центр, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1*

***ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1*

****ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биоинженерии, Россия, 119071 Москва, Ленинский просп., 33/2*

Поступила в редакцию 25.03.2021 г.
После доработки 31.03.2021 г.
Принята к публикации 02.04.2021 г.

Проведено моделирование влияния ингибиторов (нестероидные противовоспалительные препараты) на поток и уровень простагландинов в открытых системах, включающих постоянный приток фермента (простагландин-Н-синтаза, PGHS), инактивацию фермента в ходе катализируемой им реакции, деградацию фермента, превращение биологически активного продукта ферментативной реакции (простагландин, PG) в неактивные соединения, различные режимы подачи субстрата (арахидоновая кислота, AA) и ингибиторов. В качестве ингибиторов рассматривали медленный обратимый ингибитор (индометацин) и медленный необратимый ингибитор (аспирин). Получены аналитические выражения для потоков и концентраций в нестационарном режиме и стационарном состоянии. Показано, что в стационарных состояниях системы зависимость потока PG и уровня PG описывается уравнением Михаэлиса–Ментен. Максимальный поток, максимальный уровень и величина наблюдаемой константы Михаэлиса зависят обратно пропорционально от константы скорости инактивации фермента в процессе реакции. Медленные ингибиторы PGHS в традиционных экспериментах в закрытых системах ведут себя как неконкурентные по отношению к AA, однако в стационарных потоках их поведение становится полностью конкурентным, поэтому присутствие ингибитора увеличивает амплитуду изменений уровня PG при изменении концентрации AA. Показано, что обратимый ингибитор (индометацин), в отличие от необратимого ингибитора (аспирин), в потоке проявляет себя как депо для активного фермента за счет образования фермент-ингибиторных комплексов. Возмущение системы при резком повышении концентрации индометацина приводит к двухфазному изменению уровня PG: после первоначального резкого снижения он постепенно повышается до нового стационарного состояния. Возмущение системы в присутствии индометацина при резком повышении концентрации AA приводит к высвобождению фермента из фермент-ингибиторных комплексов, и уровень PG на определенный период существенно увеличивается по сравнению с контролем в отсутствие ингибитора. Результаты моделирования регуляции уровня простагландинов в различных состояниях открытой системы, несомненно, необходимо использовать при исследовании действия нестероидных противовоспалительных препаратов *in vivo*.

Ключевые слова: НПВП, простагландины, открытая система, потоки, стационарные состояния, нестационарные состояния, PGHS, инактивация фермента

DOI: 10.31857/S0132342321050286

ВВЕДЕНИЕ

Простагландины – группа физиологически активных веществ липидной природы. Они регулируют важнейшие физиологические процессы в организме млекопитающих, в частности выступают медиаторами воспаления [1]. Ключевую роль в регуляции уровня простагландинов играет фермент простагландин-Н-синтаза (PGHS; К.Ф. 1.14.99.1), известный также как циклооксигеназа (COX). Фермент катализирует две последовательные реакции – циклооксигеназную (окисление арахидоновой кислоты (AA) кислородом до проста-

[1] Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0132342321050286 для авторизованных пользователей.
Сокращения: НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты; AA – арахидоновая кислота; COX – циклооксигеназа; DEDTC – диэтилдитиокарбамат натрия; PG – простагландин; PGHS – простагландин-Н-синтаза.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (967) 005-07-54; эл. почта: biocentr@list.ru).

гландина G_2 [2]) и пероксидазную (восстановление перекисной группы простагландина G_2 до спиртовой в присутствии донора электронов [3]). В результате образуется простагландин H_2 [4], который далее под действием специфических ферментов – конвертаз – превращается в другие физиологически активные соединения, такие как простагландины E_2, D_2, $F_{2\alpha}$, тромбоксан A_2 и простациклин [5–7]. PGHS характеризуется быстрой инактивацией в процессе катализируемых реакций [8–12]. Существуют различные изоформы фермента: PGHS-1 постоянно нарабатывается в клетках и способствует их нормальному функционированию [13], PGHS-2 синтезируется в ответ на определенные стимулы, такие как цитокины или факторы роста [14]. Действие нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП), широко используемых в медицине, направлено на ингибирование PGHS [15–17].

Традиционные эксперименты *in vitro* по исследованию свойств ферментов проводятся в закрытых системах, не предполагающих приток фермента, субстратов и других участников реакции. Однако организм представляет собой открытую систему, где происходят синтез и деградация фермента, а приток субстрата может регулироваться различными внешними по отношению к ферменту факторами. Кинетические характеристики закрытых систем могут совершенно не соответствовать кинетическому поведению открытых систем и, соответственно, систем *in vivo*. Тем не менее встречается очень мало исследований ферментов в открытых системах. В работе Gabrielsson et al. [18] рассматривается теоретическая модель, учитывающая факторы синтеза и деградации фермента, а также притока субстрата. В работе Westley et al. [19] исследовали различные типы ингибирования с учетом постоянного притока субстрата. Кинетическое поведение ферментов, подвергающихся инактивации в процессе реакции и действию медленных ингибиторов, до настоящего времени в открытых системах исследовано не было.

Цель настоящего исследования – моделирование кинетического поведения участка синтеза простагландинов в открытой системе при наличии ингибиторов индометацина и аспирина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние ингибиторов на поток образования и уровень простагландина в открытых системах, содержащих фермент PGHS, представляется целесообразным описать в рамках кинетического механизма, представленного на схеме 1.

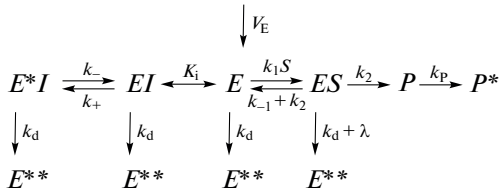


Схема 1. Общая схема преобразования фермента и продукта реакции в открытой системе. *E* – свободный фермент (PGHS); *ES* – комплекс фермента с субстратом (*S* – арахидоновая кислота, AA); *EI* и *E*I* – комплексы фермента с ингибитором (*I*); *E*** – инактивированная форма фермента; V_E – скорость синтеза (притока) фермента; k_1, k_{-1} – константы скорости образования и диссоциации комплекса *ES* соответственно; k_2 – константа скорости образования продукта реакции; K_i – константа ингибирования для быстрой обратимой стадии взаимодействия фермента с ингибитором; k_+ и k_- – константы скорости для медленной стадии ингибирования; k_P – константа преобразования физиологически активного продукта (*P*) в неактивные соединения (*P**); λ – константа скорости инактивации фермент-субстратного комплекса в процессе реакции; k_d – константа скорости деградации фермента (принимаем, что это значение одинаково для всех форм фермента).

Схема предполагает постоянный приток активного фермента и его деградацию, инактивацию фермента в процессе реакции, превращение физиологически активного продукта в неактивные соединения и присутствие ингибитора, работающего по двухстадийному механизму. Полагаем, что концентрация субстрата регулируется внешними по отношению к исследуемой системе факторами, и в первом приближении концентрации субстрата и ингибитора считаем постоянными за время наблюдения (за исключением оговоренных случаев резкого изменения концентрации субстрата или ингибитора).

В механизме реакции присутствуют как быстрые стадии (в ходе измерения или моделирования мы наблюдаем только конечный результат взаимодействия, а не динамику процесса во времени), так и медленные стадии (можно наблюдать динамику процесса во времени). К быстрым стадиям относятся взаимодействие фермента с субстратом и первая стадия взаимодействия с ингибитором, а к медленным стадиям – преобразование продукта, вторая стадия взаимодействия фермента с ингибитором, синтез (приток) фермента, деградация фермента и инактивация фермента в процессе реакции.

Основные характеристики и механизмы действия фермента и ингибиторов получены из традиционных кинетических экспериментов в закрытых системах.

Быстрая инактивация фермент-субстратного комплекса (*ES*) в процессе реакции приводит к тому, что ферментативное превращение арахидо-

новой кислоты (S) в продукты ферментативной реакции (P) в условиях малого расходования субстрата в стационарном режиме в закрытых системах описывается следующим уравнением (см. работу Vrzheshch et al. [8]):

$$[S]_0 - [S](t) = [P]_\infty(1 - \exp(-\Lambda t)), \quad (1)$$

где $[S]_0$ – начальная концентрация субстрата, t – время протекания реакции, $[S](t)$ – текущая концентрация субстрата в момент времени t, $[P]_\infty$ – предельный выход продукта реакции (сумма концентраций P и продуктов его дальнейших превращений после полной инактивации фермента), $\Lambda = k_d + \lambda[S]/(K_m + [S])$ – наблюдаемая константа скорости инактивации фермента в процессе реакции, k_d – константа скорости деградации фермента, K_m – константа Михаэлиса для реакции ферментативного превращения арахидоновой кислоты.

Линейная зависимость начальной скорости (V_0) ферментативной реакции и предельного выхода продукта реакции от общей концентрации фермента в закрытых системах позволяет получить число оборотов фермента до полной его инактивации – π_∞ (количество молекул продукта на одну молекулу фермента за время его работы до полной инактивации в процессе реакции, безразмерная величина):

$$\pi_\infty = \frac{[P]_\infty}{[E]_0}, \quad (2)$$

где $[E]_0$ – общая концентрация фермента, добавляемого в реакционную систему.

В нашем случае с учетом $[P]_\infty = V_0/\Lambda$ (см. работу Vrzheshch et al. [8]) и михаэлисовой зависимости V_0 от $[S]$ ($V_0 = k_2E_0[S]/(K_m + S)$) получим:

$$\pi_\infty = \frac{k_2}{\lambda + k_d\left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right)}. \quad (3)$$

Учитывая, что время наблюдения за реакцией в закрытой системе обычно лежит в пределах нескольких минут, и что эксперименты обычно проводятся при $[S] \sim K_m$, фактором деградации фермента можно пренебречь, и формула (3) упрощается:

$$\pi_\infty = \frac{k_2}{\lambda}, \quad (4)$$

что позволило нам определить из экспериментов в закрытых системах (см. “Эксперим. часть”) необходимые для моделирования в открытой системе значения K_m (6.35 мкМ), k_2 (60 с$^{-1}$), λ (0.084 с$^{-1}$) и π_∞ (714).

Наши кинетические эксперименты по ингибированию PGHS индометацином в закрытой системе (см. “Эксперим. часть”) подтвердили двухстадийную модель взаимодействия этого ингибитора с ферментом, в которой быстрая и медленная стадии полностью обратимы. Получены значения констант ингибирования для быстрой стадии (K_i = 27.7 мкМ) и констант скорости для медленной стадии (k_+ = 1.83 с$^{-1}$, k_- = 1.71 × 10^{-3} с$^{-1}$).

В настоящей работе также моделировали действие необратимого ингибитора аспирина. Его характеристики, определенные в закрытых системах, взяли из работы Liu et al. [20]: константу ингибирования для быстрой обратимой стадии (K_i = = 4200 мкМ) и константу скорости для медленной необратимой стадии (k_+ = 0.0135 с$^{-1}$) при 20°С.

Для моделирования также использовали значения констант скорости первого порядка для процессов деградации фермента (k_d = 6.95 × 10^{-5} с$^{-1}$) и распада физиологически активного продукта (k_P = 2.31 × 10^{-3} с$^{-1}$). Эти характеристики были оценены с учетом времени полужизни глутаматдекарбоксилазы *in vivo* (2.77 ч [21] – наиболее “короткоживущий” фермент из представленных в работах [21–27]) и времени полужизни простагландинов G_2 и H_2 (~5 мин, [28]).

Моделирование открытой системы (схема 1) осуществляли путем аналитического решения соответствующих систем дифференциальных уравнений (см. дополнительные материалы к публикации).

Указанная система всегда стремится к единственному устойчивому стационарному состоянию. Достигшая стационарного состояния система в результате возмущения (изменения концентрации субстрата или ингибитора) переходит в нестационарное (переходное) состояние, и со временем (при указанных характеристиках это часы – рис. 1–3) система всегда приближается к новому стационарному состоянию.

В стационарном состоянии поток продукта реакции (скорость накопления продукта реакции (V_{st})) оказался прямо пропорциональным потоку фермента (скорости синтеза фермента, V_E) с коэффициентом пропорциональности π_∞, который определен в формуле (2):

$$V_{st} = \pi_\infty V_E. \quad (5)$$

В присутствии медленного ингибитора, действующего по двухстадийному механизму (схема 1), π_∞ определяется следующим выражением:

$$\pi_\infty = \frac{k_2}{\lambda + k_d\left(1 + \frac{K_m}{[S]} + \frac{K_m}{[S]}\frac{[I]}{K_i}\right) + \frac{k_+k_d}{k_- + k_d}\frac{K_m}{[S]}\frac{[I]}{K_i}}. \quad (6)$$

Зависимость стационарного потока от концентрации субстрата принимает форму уравнения Михаэлиса–Ментен:

$$V_{st} = \frac{V^*_{max}[S]}{K^*_m\left(1+\frac{[I]}{K^*_i}\right)+[S]}, \quad V^*_{max} = \frac{k_2 V_E}{\lambda + k_d},$$
$$K^*_m = K_m \frac{k_d}{\lambda + k_d}, \quad K^*_i = K_i \frac{k_- + k_d}{k_+ + k_- + k_d}, \tag{7}$$

где V^*_{max} – наблюдаемое значение максимального потока продукта реакции, K^*_m – наблюдаемое значение константы Михаэлиса для потока продукта реакции, K^*_i – наблюдаемое значение константы ингибирования для потока продукта реакции.

Стационарный уровень продукта реакции (стационарная концентрация продукта реакции) прямо пропорционален его потоку:

$$[P]_{st} = \frac{V_{st}}{k_P}. \tag{8}$$

Поскольку $\lambda \gg k_d$, получаем, что наблюдаемые значения максимального потока (V^*_{max}) и константы Михаэлиса для потока продукта реакции (K^*_m) обратно пропорциональны значению константы скорости инактивации в процессе реакции. В частности, численное значение K^*_m для потока продукта реакции в случае открытой системы в рассматриваемом случае на 3 порядка меньше значения K_m, определяемого в закрытой системе. Это не означает, что в открытой системе для фермента поменялось значение K_m – оно осталось тем же, но кинетическое поведение продуцируемого ферментом потока продукта реакции определяется K^*_m, в выражение для которой, в свою очередь, входит значение K_m (7). Величины K_m и K^*_m имеют разный смысл, но их численные значения допустимо сравнивать во избежание недоразумений при интерпретации кинетического поведения фермента. Величина K^*_m (5.25×10^{-3} мкМ) говорит о том, что при концентрациях АА ~0.1 мкМ и выше поток простагландинов уже не зависит от концентрации АА (в обычных физиологических условиях концентрация АА *in vivo* составляет не более 0.1 мкМ, а возрастание концентрации до 1–10 мкМ и более – признак выраженного физиологического ответа организма [29]). Очевидно, использование численного значения K_m (6.35 мкМ) для интерпретации состояния фермента в организме будет приводить к недоразумениям.

В традиционных экспериментах по определению эффективности ингибиторов в закрытых системах медленные ингибиторы ведут себя как неконкурентные по отношению к АА [30]. Как видно из приведенных решений (7), в открытых системах подобных эффектов не наблюдается: ингибиторы медленного действия в потоке проявляют себя как полностью конкурентные, причем это верно и для обратимых, и для необратимых ($k_- = 0$) ингибиторов.

Анализ уравнений (7) показывает, что наличие ингибитора в открытой системе увеличивает амплитуду изменения стационарного потока продукта реакции (и, соответственно, уровня продукта реакции) в ответ на изменение концентрации АА (табл. 1). Это может играть важную роль в сложных регуляторных процессах в организме.

Нестационарные (переходные) состояния после возмущения открытой системы весьма интересны и могут отражать процессы, реально протекающие *in vivo* (рис. 1–3). Рассматривали варианты возмущения системы, находящейся в стационарном состоянии, при изменении концентрации ингибитора (рис. 1) или концентрации субстрата (рис. 2, 3). Момент возмущения системы во всех случаях соответствовал $t = 0$.

Концентрации АА для моделирования были подобраны таким образом, чтобы они соответствовали различным состояниям организма: обычным физиологическим условиям (0.01 мкМ [29]), выраженному физиологическому ответу (10 мкМ [29]), патологическому состоянию (500 мкМ [31]). Концентрации ингибиторов для моделирования были подобраны согласно данным фармакологических исследований. При максимальной разовой дозе индометацина (100 мг перорально) его пиковая концентрация в плазме составляла ~8 мкг/мл (~20 мкМ), а при минимальной дозе (25 мг перорально) – в ~10 раз меньше (~2 мкМ) [32]. При низкой разовой дозе аспирина (100 мг перорально) пиковая концентрация в плазме составляла 2.2 мкг/мл (~10 мкМ), а при высокой (1500 мг перорально) – 21.1 мкг/мл (~100 мкМ) [33].

Рис. 1*а* иллюстрирует влияние ингибиторов на открытую систему при физиологической концен-

Таблица 1. Влияние наличия ингибиторов на амплитуду изменения уровня продукта реакции в стационарных состояниях открытой системы

Ингибитор	Концентрация ингибитора, мкМ	$[P]_{AA = 10}/[P]_{AA = 0.01}$
Отсутствует	–	1.52
Индометацин	2	39
	20	282
Аспирин	10	1.77
	100	3.95

Примечание: $[P]_{AA = 0.01}$ и $[P]_{AA = 10}$ – уровни продукта реакции при концентрации арахидоновой кислоты (АА) 0.01 и 10 мкМ соответственно.

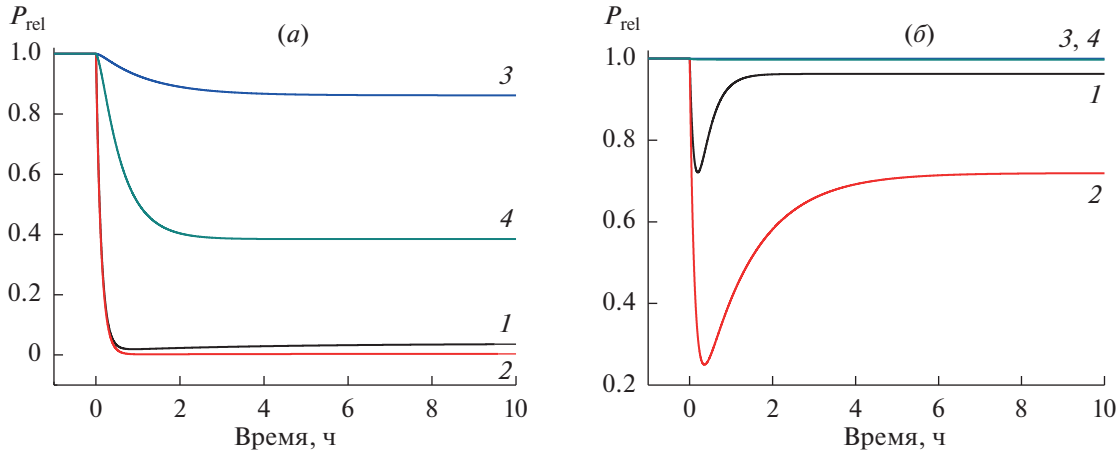


Рис. 1. Влияние изменения концентрации ингибитора на относительный уровень продукта реакции (P_{rel}) в открытой системе. Концентрация арахидоновой кислоты – 0.01 мкМ (*а*) и 10 мкМ (*б*). В момент времени $t = 0$ концентрация индометацина увеличилась с 0 до 2 мкМ (*1*), с 0 до 20 мкМ (*2*); концентрация аспирина увеличилась с 0 до 10 мкМ (*3*), с 0 до 100 мкМ (*4*). За единицу принят уровень продукта реакции до возмущения системы.

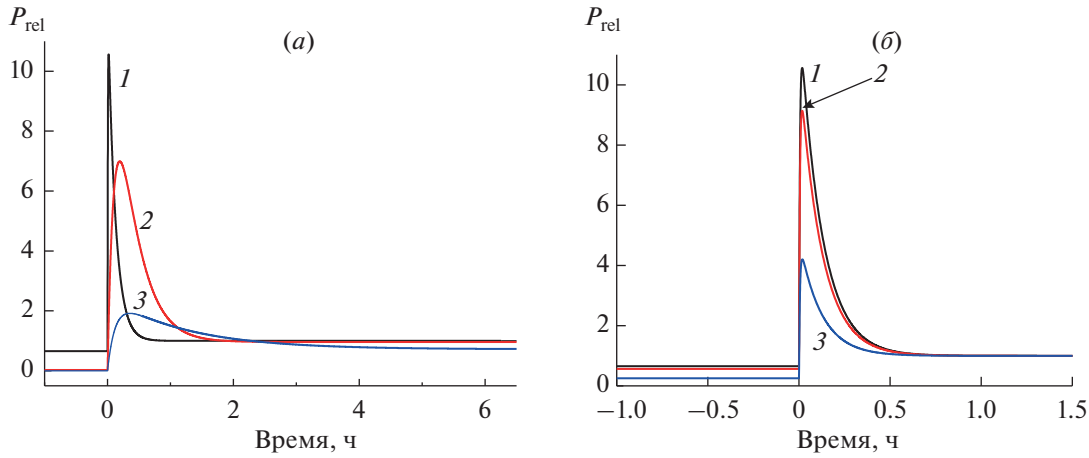


Рис. 2. Влияние изменения концентрации субстрата на относительный уровень продукта реакции (P_{rel}) в открытой системе – эффект индометацина (*а*) и аспирина (*б*). Начальная концентрация арахидоновой кислоты – 0.01 мкМ, а в момент времени $t = 0$ она увеличилась до 10 мкМ. Концентрация индометацина равна 0 мкМ (*1*), 2 мкМ (*2*), 20 мкМ (*3*); концентрация аспирина – 0 мкМ (*1*), 10 мкМ (*2*), 100 мкМ (*3*). За единицу принят максимальный стационарный уровень продукта реакции (формулы (7), (8)) (при $[S] \to \infty$ и в отсутствие ингибитора).

трации АА. Новое стационарное состояние в случае индометацина достигается значительно быстрее, чем в случае аспирина. Это обусловлено разными значениями k_+ (1.83 $с^{-1}$ для индометацина, 0.0135 $с^{-1}$ для аспирина). При 2 мкМ индометацина (кривая *1*) заметен двухфазный характер возмущения открытой системы под действием обратимого ингибитора: после достижения максимального ингибирования уровень продукта реакции повышается и достигает нового стационарного значения (соответствующее точное решение приведено в дополнительных материалах). Двухфазность обусловлена обратимостью медленной стадии ингибирования: возникающий после возмущения дополнительный поток расходования E, обусловленный формированием E^*I, исчезает после достижения стационарной концентрации E^*I.

Аспирин в выбранных концентрациях также уменьшает уровень продукта реакции, но в существенно меньшей степени. Это обусловлено различными значениями k_+, а также тем, что значение K_i для аспирина гораздо выше, чем для индометацина (4200 и 27.7 мкМ соответственно). В случае аспирина двухфазности не наблюдается. Это следствие необратимости данного ингибитора (см. табл. 2 в дополнительных материалах).

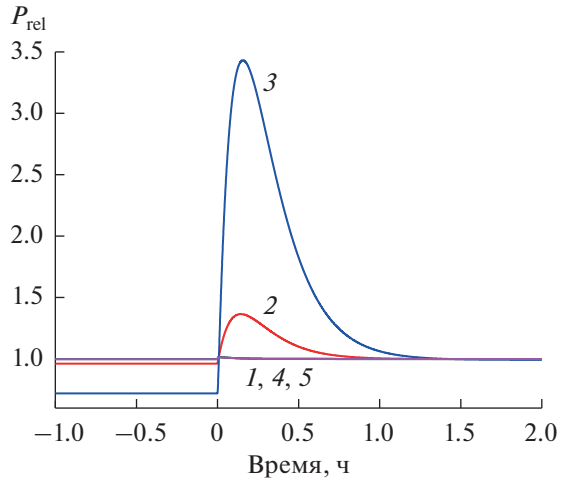


Рис. 3. Влияние изменения концентрации субстрата на относительный уровень продукта реакции (P_{rel}) в открытой системе. Начальная концентрация арахидоновой кислоты – 10 мкМ, в момент времени $t = 0$ она увеличилась до 500 мкМ. Концентрация индометацина – 0 мкМ (*1*), 2 мкМ (*2*), 20 мкМ (*3*); концентрация аспирина – 0 мкМ (*1*), 10 мкМ (*4*), 100 мкМ (*5*). За единицу принят максимальный стационарный уровень продукта реакции (формулы (7), (8)) (при $[S] \to \infty$ и в отсутствие ингибитора).

При повышении концентрации АА с 0.01 мкМ (рис. 1*а*) до 10 мкМ (рис. 1*б*) влияние ингибиторов на открытую систему существенно уменьшается – это следствие конкурентного характера ингибирования фермента в потоке (7). Для индометацина при 10 мкМ АА двухфазность выражена гораздо сильнее, чем при 0.01 мкМ АА, а для аспирина эффект ингибирования при повышенной концентрации субстрата практически отсутствует. При АА = 500 мкМ эффект ингибирования отсутствует и для индометацина, и для аспирина (данные не приведены).

Важная характеристика открытой системы – ее реакция на изменение концентрации субстрата. Уровень арахидоновой кислоты регулируется многими внешними по отношению к простагландиновому участку системами [34]. Повышение концентрации АА – своеобразный “маркер” протекания многих процессов, таких как воспаление [29].

При быстром повышении концентрации АА с физиологического уровня (0.01 мкМ) на 3 порядка (рис. 2) в отсутствие ингибитора наблюдается взрывной рост уровня продукта. Это обусловлено тем, что начальная концентрация АА сравнима с K_m^* (7), и существенная доля молекул активного фермента при этих концентрациях не связана с субстратом. При увеличении концентрации АА на 3 порядка практически весь активный фермент связывается с субстратом, что приводит к быстрому повышению концентрации *ES* и, соответственно, повышению уровня продукта. В дальнейшем вследствие инактивации фермента в процессе реакции концентрация *ES* и, соответственно, уровень продукта снижаются до нового стационарного состояния.

Если же в открытой системе присутствует обратимый ингибитор индометацин (рис. 2*а*), картина меняется. В начальной фазе не наблюдается взрывного роста уровня продукта. Это обусловлено тем, что в стационарном состоянии значительная часть фермента связана с ингибитором и не может мгновенно катализировать реакцию при повышении уровня субстрата. Однако через несколько минут после возмущения системы уровень продукта реакции в присутствии 2 мкМ индометацина становится выше, чем в отсутствие ингибитора, и этот эффект наблюдается в течение ~1.5 ч (для 20 мкМ индометацина он менее выражен). Этот на первый взгляд парадоксальный факт объясняется тем, что при инкубации фермента с обратимым ингибитором накапливаются фермент-ингибиторные комплексы, и при существенном повышении концентрации субстрата фермент постепенно высвобождается из них, связываясь с субстратом, тем самым увеличивая поток продукта реакции. Таким образом, обратимый ингибитор ведет себя как “депо” для активного фермента. Для необратимого и гораздо более слабого ингибитора аспирина (рис. 2*б*) подобных эффектов не наблюдается.

Если моделировать ситуацию стремительного развития острого патологического процесса (рис. 3), в которой концентрация АА может достигать значений ~500 мкМ [31] (на рис. 3 предусмотрено возмущение открытой системы путем увеличения концентрации АА с 10 до 500 мкМ), то можно наблюдать следующее. В отсутствие ингибитора (кривая *1*) уровень продукта реакции не изменяется в результате возмущения системы, потому что при 10 мкМ АА весь активный фермент уже связан с субстратом. Присутствие аспирина (кривые *4* и *5*) не меняет картину. Однако в присутствии индометацина после возмущения системы уровень продукта реакции временно существенно повышается (это продолжается около часа, кривые *2* и *3*), при этом эффект повышения более выражен при большей концентрации ингибитора, в отличие от рис. 2*а*. Это объясняется тем, что при таких высоких концентрациях субстрата индометацин практически не проявляет свои ингибирующие свойства из-за конкурентного характера ингибирования. Поэтому эффект “депо” для активного фермента здесь более выражен, чем при 10 мкМ АА (рис. 2*а*).

Особого внимания заслуживает зависимость константы Михаэлиса для стационарного потока (K_m^*) (7) от скорости инактивации фермента в процессе реакции. В отсутствие инактивации ($\lambda = 0$) K_m^* равна определяемой в закрытых системах константе Михаэлиса для стационарной ферментативной кинетики (K_m). Инактивация PGHS в процессе реакции обусловливает низкое потоковое значение K_m^*, вследствие чего поток PG в рассматриваемом случае перестает зависеть от AA уже при физиологических концентрациях ($10K_m^*$ соответствуют ~0.05 мкМ AA), и при патологическом возрастании концентрации AA увеличиваться не будет. Следует отметить, что для открытых систем наряду со стационарными значениями потоков и концентраций важно обращать внимание на нестационарные состояния – "всплески" уровня продукта реакции при изменении концентраций ингибитора и субстрата. Как видно из рис. 2*а* и 3, во время этих нестационарных состояний можно наблюдать кажущееся парадоксальным повышение уровня продукта реакции в присутствии обратимого ингибитора. Также может иметь значение отмеченное увеличение амплитуды изменения уровня продукта реакции в стационарных состояниях открытой системы в присутствии конкурентных ингибиторов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали Tween-20, Трис, EDTA, диэтилдитиокарбамат натрия (DEDTC) (MP Biomedicals, Германия); индометацин, арахидоновую кислоту, ферроцианид калия, хлорид гемина, гидроксид натрия (Sigma-Aldrich, США); дитионит натрия, гидроксид калия (Panreac, Испания); пиридин (Merck, Германия); DMSO (ICN, Канада); соляную кислоту, этиловый спирт (Химмед, Россия).

Препарат фермента PGHS-1 получали из везикулярных желез барана согласно методике, опубликованной ранее [35], и хранили в специальном буферном растворе (50 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 0.5 мМ EDTA, 0.1 мМ DEDTC, 2 мкМ гемина, 0.1% (*v*/*v*) Tween-20) при –70°C [30]. Концентрация белка в полученном препарате составляла 0.5 мг/мл (измеряли бицинхониновым методом [36]).

Кинетические эксперименты. Во всех экспериментах по измерению циклооксигеназной активности фермента использовали буферный раствор А (50 мМ Трис-HCl, pH 8.0) с добавлением 0.1% (*v*/*v*) Tween-20, 1 мМ ферроцианида калия и 2 мкМ гемина. Ферментативную реакцию проводили в закрытой термостатируемой стеклянной ячейке с постоянным перемешиванием при 25°C. Объем реакционной смеси составлял 1.5 мл, объем добавляемого раствора фермента – 5–30 мкл.

Раствор арахидоновой кислоты (150 мМ) готовили в этиловом спирте и затем разбавляли буферным раствором А, содержащим эквивалент гидроксида калия, до 3.75 мМ; раствор ферроцианида калия (0.1 М) готовили в дистиллированной воде; раствор индометацина (5 мМ) готовили в смеси буферного раствора А и 15%-ного этилового спирта и затем разбавляли буферным раствором А до 0.03 мМ; раствор гемина (10 мМ) готовили в DMSO и разбавляли до 2 мМ буферным раствором А. Точную концентрацию гемина определяли спектрофотометрическим методом с использованием известных коэффициентов поглощения для восстановленного комплекса гемина с пиридином [37].

Эксперименты по взаимодействию фермента и ингибитора проводили согласно следующей схеме: в реакционную ячейку, содержащую буферный раствор А, Tween-20, ферроцианид калия и гемин, последовательно добавляли индометацин, фермент, а через определенный промежуток времени после добавления препарата фермента (время преинкубации) инициировали ферментативную реакцию субстратом (арахидоновой кислотой). В экспериментах, соответствующих нулевому времени преинкубации, изменяли порядок добавления арахидоновой кислоты и фермента.

Измерение параметров ферментативной реакции. Циклооксигеназную реакцию детектировали амперометрическим методом по изменению концентрации растворенного кислорода согласно ранее опубликованной методике [30]. Интегральные кривые (зависимости продукта реакции от времени) получали из исходных зависимостей концентрации кислорода от времени с учетом неферментативной реакции. Скорость неферментативной реакции определяли по линейной аппроксимации участка экспериментальной кривой перед инициацией реакции.

Для расчетов скорости реакции использовали аппроксимацию начального участка интегральной кривой. Диапазон аппроксимации начинался с $t = 1$ с (из-за фактора "мертвого времени" измерительной системы [30]) и составлял 5–15 с. Начальная скорость соответствует тангенсу угла наклона касательной к интегральной кривой при $t = 0$, определяемому из параметров аппроксимации.

Для расчета константы скорости инактивации фермента в процессе реакции использовали аппроксимацию первых 20–30 с интегральной кривой при 100 мкМ AA и отсутствии ингибитора по формуле (1).

Математическая обработка данных. Анализ экспериментальных данных и графическое представление теоретических зависимостей проводили с использованием пакета Origin 7.5 (OriginLab Corporation, США).

Совместную аппроксимацию массива экспериментальных данных (зависимостей скорости от времени преинкубации и концентрации ингибитора при различных концентрациях субстрата) проводили с помощью пакета MatLab (MathWorks, США). Значения искомых величин определяли при минимальном значении суммы квадратов отклонений скоростей (*Sum*):

$$Sum = \sum_{j} (V_j^{theor} - V_j^{exp})^2, \quad (9)$$

где V_j^{exp} – экспериментально определенное значение относительной скорости (отношение скорости реакции к скорости в контрольной точке соответствующей экспериментальной серии, т.е. к скорости при 100 мкМ АА и при отсутствии ингибитора), V_j^{theor} – соответствующее теоретически рассчитанное значение относительной скорости, вычисляемое по формуле:

$$V_{rel} = \frac{[S](K_m + 100)}{\left(K_m\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]\right) \times 100} \times \left(1 - \frac{[I]}{K([I] + K_i) + [I]} \times \left(1 - \exp\left(-\left(k_- + k_+ \frac{[I]}{[I] + K_i}\right)\tau\right)\right)\right), \quad (10)$$

где $K = k_-/k_+$ – равновесная константа для медленной стадии ингибирования, τ – время преинкубации фермента с ингибитором до инициации реакции (также см. подпись к схеме 1).

Решение системы дифференциальных уравнений. Систему дифференциальных уравнений, соответствующую кинетической схеме 1, решали аналитически. Правильность полученных решений и графических иллюстраций подтверждали численными расчетами с использованием пакета MatLab (MathWorks, США).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что свойства потоков в открытых по ферменту системах синтеза простагландинов (при наличии медленных обратимых ингибиторов и с учетом необратимой инактивации фермента в процессе реакции) демонстрируют качественно иное кинетическое поведение по сравнению со свойствами стационарных процессов в соответствующих закрытых системах. Наиболее значимый параметр, связывающий такие открытые и закрытые системы, – число оборотов фермента до полной его инактивации. Показано, что обратимые медленные ингибиторы в открытых системах могут выступать в роли депо для активного фермента, повышая на длительные периоды уровень простагландинов по сравнению с контролем в отсутствие ингибитора, а также могут существенно увеличивать амплитуду изменения уровня простагландинов в ответ на изменение концентрации арахидоновой кислоты. Эти свойства открытых систем синтеза простагландинов могут быть использованы при разработке стратегии применения нестероидных противовоспалительных препаратов для регуляции уровня и амплитуды модуляции уровня простагландинов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития МГУ имени М.В. Ломоносова, и оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-04-01150а).

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. *Ricciotti E., FitzGerald G.A.* // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2011. V. 31. P. 986–1000. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207449
2. *Hamberg M., Svensson J., Wakabayashi T., Samuelsson B.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1974. V. 71. P. 345–349. https://doi.org/10.1073/pnas.71.2.345
3. *Wu G., Vuletich J.L., Kulmacz R.J., Osawa Y., Tsai A.L.* // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 19879–19888. https://doi.org/10.1074/jbc.M100628200
4. *Hamberg M., Samuelsson B.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1973. V. 70. P. 899–903. https://doi.org/10.1073/pnas.70.3.899

5. *Samuelsson B., Goldyne M., Granström E., Hamberg M., Hammarström S., Malmsten C.* // Annu. Rev. Biochem. 1978. V. 47. P. 997–1029. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.47.070178.005025

6. *Helliwell R.J., Adams L.F., Mitchell M.D.* // Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 2004. V. 70. P. 101–113. https://doi.org/10.1016/j.plefa.2003.04.002

7. *Watanabe K., Yoshida R., Shimizu T., Hayaishi O.* // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 7035–7041.

8. *Vrzheshch P.V., Batanova E.A., Mevkh A.T., Varfolomeev S.D., Gazaryan I.G., Thorneley R.N.* // Biochem. J. 2003. V. 372. P. 713–724. https://doi.org/10.1042/BJ20030043

9. *Smith W.L., Lands W.E.* // Biochemistry. 1972. V. 11. P. 3276–3285. https://doi.org/10.1021/bi00767a024

10. *Egan R.W., Paxton J., Kuehl F.A.* // J. Biol. Chem. 1976. V. 251. P. 7329–7335.

11. *Мевх А.Т., Вржещ П.В., Швядас В.Ю.-К., Варфоломеев С.Д., Мягкова Г.И., Якушева Л.А.* // Биоорг. химия. 1981. Т. 7. С. 695–702. [*Mevkh A.T., Vrzheshch P.V., Svedas V.Y.-K., Varfolomeev S.D., Myagkova G.I., Yakusheva L.A.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 1981. V. 7. P. 695–702.]

12. *Vrzheshch P.V., Tsaplina L.A., Sakharova I.S.* // Biochemistry (Mosc.). 2007. V. 72. P. 828–834. https://doi.org/10.1134/s0006297907080032

13. *Yokoyama C., Tanabe T.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1989. V. 165. P. 888–894. https://doi.org/10.1016/s0006-291x(89)80049-x

14. *Jones D.A., Carlton D.P., McIntyre T.M., Zimmerman G.A., Prescott S.M.* // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 9049–9054.

15. *Vane J.R.* // Nat. New Biol. 1971. V. 231. P. 232–235. https://doi.org/10.1038/newbio231232a0

16. *Smith W.L., Meade E.A., DeWitt D.L.* // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1994. V. 714. P. 136–142. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb12037.x

17. *Bacchi S., Palumbo P., Sponta A., Coppolino M.F.* // Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem. 2012. V. 11. P. 52–64. https://doi.org/10.2174/187152312803476255

18. *Gabrielsson J., Peletier L.A.* // AAPS J. 2018. V. 20. P. 102. https://doi.org/10.1208/s12248-018-0256-z

19. *Westley A.M., Westley J.* // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 5347–5352. https://doi.org/10.1074/jbc.271.10.5347

20. *Liu W., Poole E.M., Ulrich C.M., Kulmacz R.J.* // Pharmacogenet. Genomics. 2012. V. 22. P. 525–537. https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32835366f6

21. *Schlosser M., Walschus U., Klöting I., Walther R.* // Dis. Markers. 2008. V. 24. P. 191–198. https://doi.org/10.1155/2008/961421

22. *Pelkonen O., Turpeinen M., Hakkola J., Honkakoski P., Hukkanen J., Raunio H.* // Arch. Toxicol. 2008. V. 82. P. 667–715. https://doi.org/10.1007/s00204-008-0332-8

23. *Mathieson T., Franken H., Kosinski J., Kurzawa N., Zinn N., Sweetman G., Poeckel D., Ratnu V.S., Schramm M., Becher I., Steidel M., Noh K.-M., Bergamini G., Beck M., Bantscheff M., Savitski M.M.* // Nat. Commun. 2018. V. 9. P. 689. https://doi.org/10.1038/s41467-018-03106-1

24. *Cohen L.D., Zuchman R., Sorokina O., Müller A., Dieterich D.C., Armstrong J.D., Ziv T., Ziv N.E.* // PLoS One. 2013. V. 8. P. e63191. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063191

25. *Fowler J.S., Volkow N.D., Logan J., Wang G.J., MacGregor R.R., Schyler D., Wolf A.P., Pappas N., Alexoff D., Shea C.* // Synapse. 1994. V. 18. P. 86–93. https://doi.org/10.1002/syn.890180203

26. *Yang J., Liao M., Shou M., Jamei M., Yeo K.R., Tucker G.T., Rostami-Hodjegan A.* // Curr. Drug Metab. 2008. V. 9. P. 384–394. https://doi.org/10.2174/138920008784746382

27. *von Bahr C., Steiner E., Koike Y., Gabrielsson J.* // Clin. Pharmacol. Ther. 1998. V. 64. P. 18–26. https://doi.org/10.1016/S0009-9236(98)90018-2

28. *Flower R.J.* // Biochem. Soc. Trans. 1978. V. 6. P. 713–714. https://doi.org/10.1042/bst0060713a

29. *Brash A.R.* // J. Clin. Invest. 2001. V. 107. P. 1339–1345. https://doi.org/10.1172/JCI13210

30. *Filimonov I.S., Berzova A.P., Barkhatov V.I., Krivoshey A.V., Trushkin N.A., Vrzheshch P.V.* // Biochemistry (Mosc.). 2018. V. 83. P. 119–128. https://doi.org/10.1134/S0006297918020049

31. *Pompeia C., Lima T., Curi R.* // Cell Biochem. Funct. 2003. V. 21. P. 97–104. https://doi.org/10.1002/cbf.1012

32. *Alván G., Orme M., Bertilsson L., Ekstrand R., Palmér L.* // Clin. Pharmacol. Ther. 1975. V. 18. P. 364–373. https://doi.org/10.1002/cpt1975183364

33. *Rosenkranz B., Frölich J.C.* // Prostaglandins Leukot. Med. 1985. V. 19. P. 289–300. https://doi.org/10.1016/0262-1746(85)90142-8

34. *Murakami M., Nakatani Y., Atsumi G.-I., Inoue K., Kudo I.* // Crit. Rev. Immunol. 2017. V. 37. P. 127–195. https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v37.i2-6.20

35. *Ponomareva O.A., Trushkin N.A., Filimonov I.S., Krivoshey A.V., Barkhatov V.I., Mitrofanov S.I., Vrzheshch P.V.* // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1858. P. 2199–2207. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.06.013

36. *Stoscheck C.M.* // Methods Enzymol. 1990. V. 182. P. 50–68. https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82008-p

37. *Falk J.E.* // Porphyrins and Metalloporphyrins. Their General, Physical and Coordination Chemistry, and Laboratory Methods. Amsterdam – London – New York: Elsevier Publ. Comp., 1964. P. 181. https://doi.org/10.1002/jobm.19640040512

Simulation of the Level of Prostaglandins in Open Systems under the Action of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs

A. V. Krivoshey*, **, A. A. Efremov, E. K. Matveishina**, ***, V. V. Panova**, and P. V. Vrzheshch*, **, #**

#Phone: +7 (967) 005-07-54; e-mail: biocentr@list.ru

**Lomonosov Moscow State University, International Biotechnological Center, Leninskiye gory 1, Moscow, 119991 Russia*

***Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Leninskiye gory 1, Moscow, 119991 Russia*

****Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Leninskii prosp. 33/2, Moscow, 119071 Russia*

Modeling of flow and level of prostaglandins in open systems under the action of prostaglandin H synthase (PGHS) inhibitors nonsteroidal anti-inflammatory drugs was carried out. These open systems included a steady PGHS input, fast inactivation of PGHS during the reaction, degradation of all PGHS forms, conversion of prostaglandin (PG) to biologically inactive substances, and various types of delivery of inhibitors and substrate (arachidonic acid, AA). A slow reversible inhibitor of PGHS (indomethacin) and a slow irreversible inhibitor of PGHS (aspirin) were considered as inhibitors. The explicit analytical expressions for flows and concentrations in steady state and transient mode were obtained. It was shown that in steady state the dependences of flow and level of PG on the concentration of AA are described by the Michaelis–Menten type equation. The values of the maximum flows, maximum levels, and Michaelis constant in these equations are inversely proportional to the constant of the inactivation of the enzyme during the reaction. In the closed systems, slow PGHS inhibitors are manifested as non-competitive with respect to AA, but in open systems, their behavior is fully competitive with respect to AA, so the presence of inhibitor increases the range of changes of PG level under the change of AA concentration. It was shown that the reversible inhibitor (indomethacin), in contrast to the irreversible inhibitor (aspirin) in transient mode manifest itself as the repository for active enzyme because of formation enzyme-inhibitory complexes. The system disturbance under the rapid increase of indomethacin concentration leads to the biphasic change of PG level: after the initial rapid decrease it increases gradually up to the new steady state. In the presence of indomethacin, the system disturbance under the rapid increase of AA concentration leads to the release of enzyme from enzyme-inhibitory complexes and PG level for a certain period significantly increases compared with the absence of inhibitor. The results of modeling the regulation of the level of prostaglandins in different states of the open systems undoubtedly need to be used in the studying of nonsteroidal anti-inflammatory drugs *in vivo*.

Keywords: NSAIDs, prostaglandins, open system, flows, steady states, transient modes, PGHS, enzyme inactivation

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 5, с. 603–609

УДК 577.25

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ СЕНСОРОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО pH

© 2021 г. А. Н. Орса*, **, #, А. С. Горященко*, **, О. В. Серова*, **, А. А. Можаев*, **, В. И. Мартынов*, А. А. Пахомов*, Е. В. Свирщевская*, А. Г. Петренко*, И. Е. Деев*, **

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

***Научно-технологический университет "Сириус", Россия, 354340 Сочи, Олимпийский просп., 1*

Поступила в редакцию 29.09.2020 г.
После доработки 02.11.2020 г.
Принята к публикации 05.11.2020 г.

Флуоресцентные белки в последнее время стали неотъемлемым инструментом для прижизненной визуализации различных процессов, протекающих в живых системах, начиная от отдельных органелл и заканчивая целыми организмами. Они позволяют наблюдать экспрессию белков, их локализацию, а также осуществлять мониторинг биохимических процессов в клетках. Как правило, флуоресцентные белки имеют pH-зависимые спектральные свойства, что позволяет конструировать на их основе генетически кодируемые pH-сенсоры для решения различных биологических задач. В данной работе мы получили набор сенсоров внеклеточного pH на основе флуоресцентного белка SypHer3S, имеющего pH-чувствительность в диапазоне значений pH от 7.4 до 9.0. Для этого были созданы конструкции, кодирующие химерные белки SypHer3S с различными трансмембранными доменами мембранных рецепторов, позволяющих направлять данный белок на внешнюю сторону цитоплазматической мембраны. Охарактеризована локализация этих химерных белков внутри клетки и подобран наиболее подходящий вариант химерного pH-сенсора для измерения внеклеточного слабощелочного pH.

Ключевые слова: щелочной pH, pH-сенсор, внеклеточный сенсор, флуоресцентные белки

DOI: 10.31857/S0132342321040175

ВВЕДЕНИЕ

Поддержание гомеостаза (постоянства внутренней среды, в том числе значения pH) имеет жизненно важное значение для организма. Принято считать, что pH крови и внеклеточной среды организма должен быть близким к нейтральным величинам. Значение pH крови в организме должно поддерживаться в достаточно узком диапазоне, а отклонение pH в щелочную или кислую сторону влечет за собой сильные нарушения, что приводит к возникновению различных заболеваний [1, 2]. В то же время в рамках целостного организма выведение части кислот или оснований в малом объеме невозможно без экстремальных изменений pH выводимых экстракорпоральных жидкостей, в частности почечного фильтрата.

Ранее мы показали, что существует несколько рецепторных тирозинкиназ, которые могут активироваться внеклеточной слабощелочной средой. Это рецептор, подобный рецептору инсулина (IRR) [3], рецепторы ERBB2 [4] и c-Met [5]. Наиболее изученный нами рецептор IRR экспрессируется в отдельных клеточных популяциях почек, желудка и поджелудочной железы, где может контактировать с внеклеточными жидкостями со щелочным pH [3, 6]. Также показано, что нокаутные по рецептору IRR мыши имеют отклонения в социальном поведении, а при экспериментальном алкалозе у таких мышей наблюдаются дефекты почечной функции [7, 8].

Поскольку на сегодняшний день нет достоверной информации о распределении внеклеточного pH в различных органах (почки, поджелудочная железа и др.), актуальна разработка генетически кодируемых pH-сенсоров для определения вне-

Сокращения: CIRL2 – латрофилин 2 (latrophilin 2); c-Met – рецептор фактора роста гепатоцитов (hepatocyte growth factor receptor); ErbB2 – рецептор эпидермального фактора роста 2 (epidermal growth factor receptor); IR – рецептор инсулина (insulin receptor); IRR – рецептор, подобный рецептору инсулина (insulin receptor-related receptor); PDGFR – рецептор фактора роста тромбоцитов (platelet-derived growth factor receptor); SypHer3S – желтый флуоресцентный GFP-подобный белок; TrkA – тропомиозин-рецепторная киназа A (tropomyosin receptor kinase A).

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

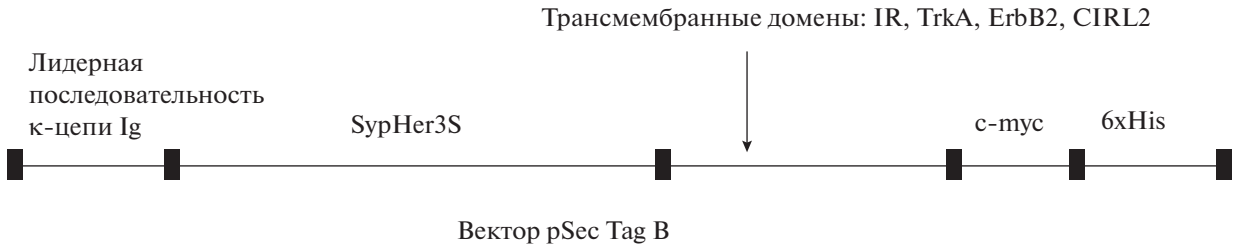


Рис. 1. Схема конструкций, кодирующих химерные белки на основе флуоресцентного белка SypHer3s с лидерным пептидом к-цепи Ig и трансмембранными доменами различных мембранных рецепторов.

клеточного pH, которые в дальнейшем могут применяться в животных моделях.

Цель настоящей работы – получение сенсора внеклеточного слабощелочного pH на основе флуоресцентного белка SypHer3S [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Флуоресцентный белок SypHer3S – версия белка SypHer, представляющего собой сенсор перекиси водорода HyPer с мутацией C199S, которая делает белок нечувствительным к перекиси водорода, но сохраняет pH-чувствительность хромофора [9]. Данный белок имеет два максимума возбуждения при 410 и 495 нм и один пик эмиссии при 525 нм [10]. В нашей работе использовались максимально близкие (к оптимальным) параметры измерений из доступных, а именно длины волн возбуждения 408 и 488 нм и регистрация флуоресценции на 515 нм.

Для получения сенсора внеклеточного pH мы разработали пять химерных конструкций, которые кодируют флуоресцентный белок SypHer3S с лидерным пептидом и трансмембранным участком от мембранного рецептора (рис. 1).

Сначала были созданы четыре конструкции, кодирующие трансмембранные домены от различных рецепторов: рецептора инсулина (IR) [11, 12], тропомиозин-рецепторной киназы A (TrkA) [13], рецептора фактора роста эпидермиса 2 (ErbB2) [14] и латрофилина 2 (CIRL2) [15]. Полученные конструкции экспрессировали в клетках HEK293. С помощью конфокальной микроскопии было показано, что большая часть сенсора локализована в примембранной области (т.е. внутри клетки), а не на внешней стороне клеточной мембраны (рис. 2*а*–2*г*). Таким образом, эти химерные белки не могут быть использованы в качестве сенсора внеклеточного pH.

Далее мы получили химерную конструкцию на основе коммерчески доступного вектора pDisplay для эукариотической экспрессии, предназначенного для локализации целевых белков на внеклеточной поверхности цитоплазматической мембраны. Данный вектор имеет в своем составе гены лидерной последовательности и трансмембранного домена рецептора фактора роста тромбоцитов (PDGFR), обеспечивающие необходимую локализацию белка [16]. Кодирующая последовательность белка SypHer3S была клонирована в данный вектор; полученной конструкцией, названной pDisplay-SpH3, трансфицировали клетки линии HEK293. При помощи конфокальной микроскопии было показано, что химерный белок, представляющий собой SypHer3S с трансмембранным доменом рецептора PDGFR, локализован на клеточной мембране (рис. 2*д*).

Для проверки pH-чувствительности полученного химерного белка клетки, трансфицированные вектором pDisplay-SpH3, фиксировали с помощью среды Mounting media с добавлением до конечной концентрации 100 мМ Tris-HCl с pH 7.4, 8.2 и 8.8 (рис. 3*а*). Сначала анализировали флуоресценцию химерного белка при возбуждении лазером 408 нм. Затем получали изображение при возбуждении лазером 488 нм. Полученные данные обрабатывали в программе ImageJ и из каждой картинки высчитывали средний уровень фона, который принимали за минимальное значение. Далее рассчитывали отношение интенсивностей при возбуждении 488 нм к 408 нм вдоль отмеченных линий при указанных pH с последующей нормализацией в программе Origin. Полученный график (рис. 3*б*) показал изменение соотношения флуоресценции на мембране с возрастанием pH от 7.4 до 8.8. Таким образом, химерный белок, представляющий собой SypHer3S с трансмембранным доменом рецептора фактора роста тромбоцитов (PDGFR), выступает пригодным для использования в качестве флуоресцентного сенсора внеклеточного слабощелочного pH.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение плазмидных конструкций, кодирующих флуоресцентные pH-сенсоры. Для получения плазмид, кодирующих флуоресцентные pH-сенсоры, использовали вектор pSecTag B (Invitrogen, США), в который клонировали ген белка SypHer3S [9], используя праймеры Sh3_Bam_fw и RI_Sh2_rev, представленные в табл. 1. Клониро-

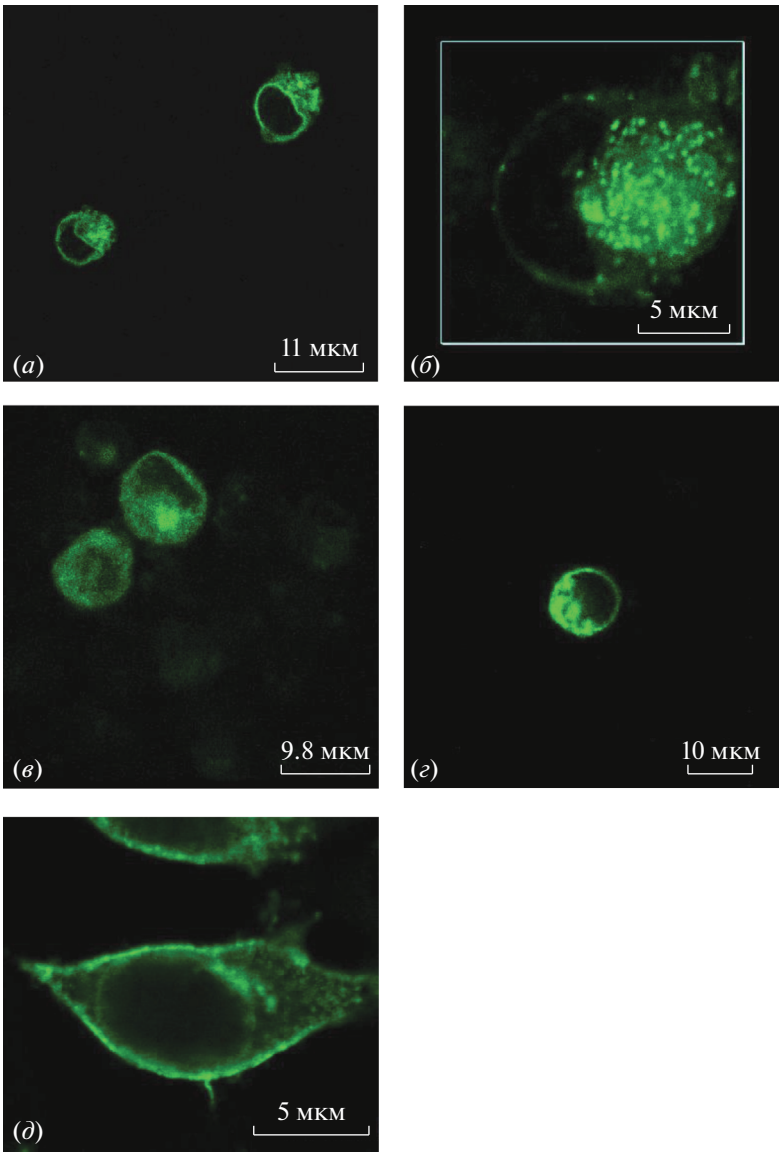


Рис. 2. Флуоресцентные изображения клеток линии HEK293, экспрессирующих следующие химерные белки: (*а*) – SypHer3s с трансмембранным доменом рецептора инсулина (IR); (*б*) – SypHer3s с трансмембранным доменом тропомиозин-рецепторной киназы A (TrkA); (*в*) – SypHer3s с трансмембранным доменом рецептора фактора роста эпидермиса 2 (ErbB2); (*г*) – SypHer3s с трансмембранным доменом рецептора латрофилина (CIRL2); (*д*) – SypHer3s с трансмембранным доменом рецептора фактора роста тромбоцитов (PDGFR).

вание проводили по сайтам рестрикции BamHI и EcoRI. Далее в эту конструкцию клонировали нуклеотидную последовательность трансмембранного домена с кДНК рецептора инсулина с помощью ПЦР и праймеров из табл. 1 по сайтам рестрикции EcoRI и XhoI. Полученная конструкция была названа pST-SpH3-TM-IR. Аналогичным образом были получены конструкции с нуклеотидными последовательностями трансмембранных доменов тропомиозин-рецепторной киназы A (TrkA), рецептора фактора роста эпидермиса 2 (HER2) и латрофилина 2 (CIRL2). Для этого использовали праймеры Trk_TM_fw_RI и Trk_TM_rev_Xho, Her2_TM_fw_RI и Her2_TM_rev_ Xho, Cl2_TM_fw и Cl2_TM_rev соответственно. Для получения конструкции на основе вектора pDisplay проводили ПЦР с вектора pcDNA-SypHer3s (вектор предоставлен В.В. Белоусовым, ИБХ РАН) с использованием праймеров SH3_Bgl_fw и SH3_Sal_rev, затем полученный ПЦР-фрагмент клонировали в вектор pDisplay (Invitrogen, США) по сайтам рестрикции BglII и SalI.

Иммуноцитохимия и конфокальная микроскопия. Клетки линии HEK293 выращивали в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Hyclone, США), 1% пенициллин/стрептомицина и 2 мМ

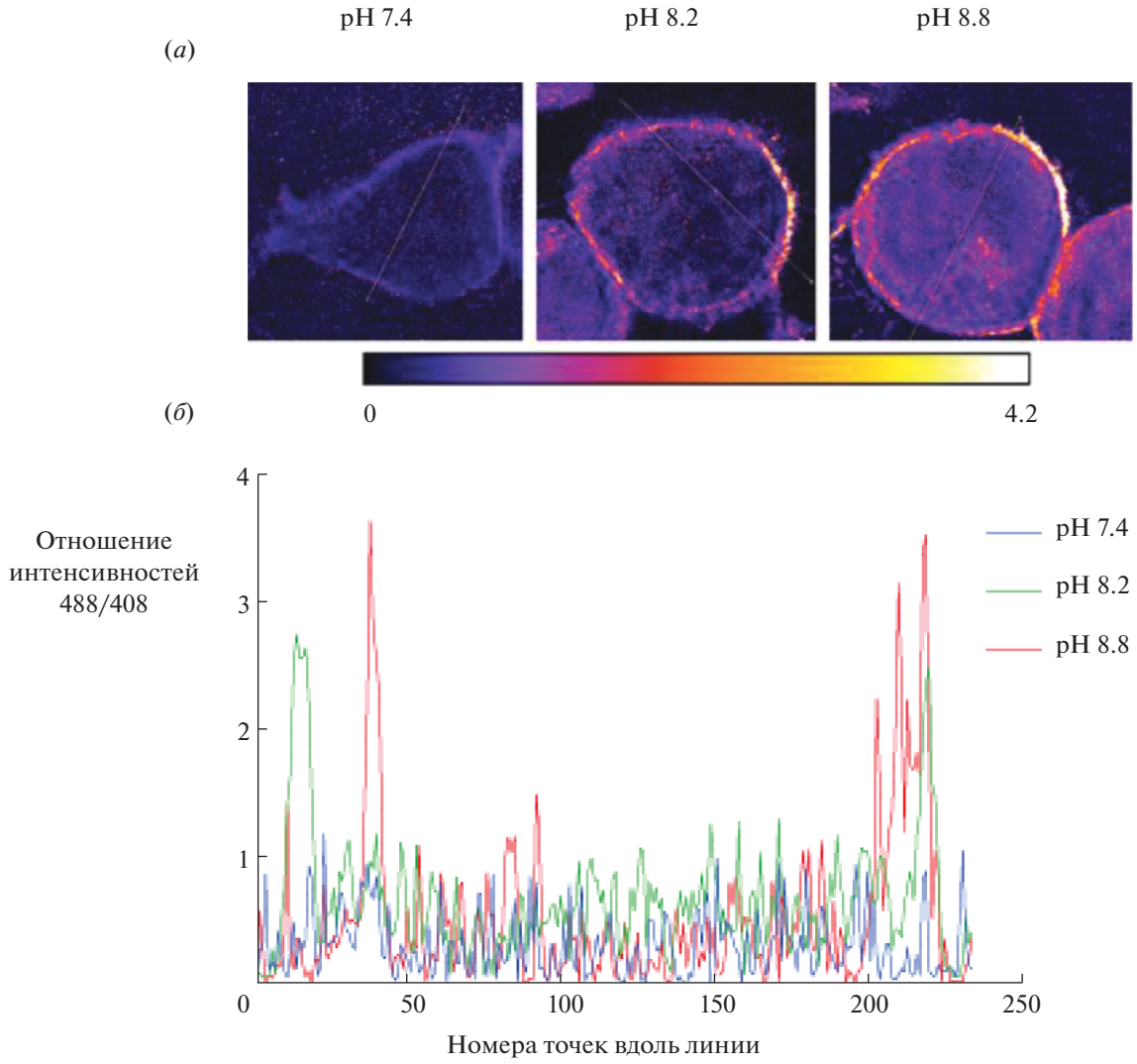


Рис. 3. (*а*) – Псевдоцветные изображения клеток линии HEK293, экспрессирующих SypHer3s с трансмембранным доменом рецептора PDGFR. Цвет характеризует величину отношения интенсивностей 488/408 нм для различных pH; (*б*) – профили распределения отношения интенсивностей 488/408 нм вдоль указанных на рис. 3*а* линий при различных внеклеточных pH.

L-глутамина. Трансфекцию клеток HEK293 полученными конструкциями проводили согласно протоколу [17].

Для анализа субклеточного распределения экспрессированных белков использовали иммунофлуоресценцию. Клетки HEK293 перед трансфекцией рассевали на покровные стекла, помещенные в планшет и обработанные поли-L-лизином (Sigma, США). Через два дня после трансфекции среду DMEM отбирали, клетки дважды промывали раствором PBS и фиксировали раствором (50% ацетона, 50% метанола) при –20°C в течение 20 мин. Затем клетки окрашивали первичными антителами. В качестве антител к белку SypHer3S использовали антитела Anti-tRFP (Евроген, Россия), в качестве вторичных антител – антитела Anti Rabbit IgG, конъюгированные с Cy3 (Merck, США).

Также в качестве дополнительного контроля использовали мембранный трекер Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor™ 594 Conjugate (Thermo Fisher, США). Мембранный трекер добавляли к трансфицированным клеткам в концентрации 25 мкг/мл и инкубировали в течение 10 мин в питательной среде DMEM, содержащей 10% FBS, затем клетки фиксировали. Покровные стекла помещали на предметное стекло и фиксировали средой Mounting Media (Dako, Дания) с добавлением 100 мМ буфера с заданным pH.

Для получения флуоресцентных изображений клеток линии HEK293, экспрессирующих химерный белок SypHer3s с трансмембранным доме-

Таблица 1. Праймеры, используемые для получения конструкций, кодирующих химерные белки на основе флуоресцентного белка SypHer3S

Название конструкции	Трансмембранный домен	Праймеры	Последовательность
pST-SpH3	–	Sh3_Bam_fw RI_Sh2_rev	5'-AAAGGATCCATGTCCGGACCGCT-GCACATT-3' 5'-TTTGAATTCCGCTAACCGCCTGT-TTTAAAACTTTATC-3'
pST-SpH3-TM-IR	Рецептор инсулина	tm_RI_fw Xho_tm_rev	5'-AAAGAATTCAAGACTATTTAGACGT-CCCGTCAAATA-3' 5'-AAACTCGAGCTTTCTCAGGAATAG-ATAAATAC-3'
pST-SpH3-TM-TrkA	Тропомиозин-рецепторная киназа A	Trk_TM_fw_RI Trk_TM_rev_Xho	5'-AAAGAATTCAAATGGACAACCCTT-TCGAGTTC-3' 5'-AAACTCGAGGATCCCAAACTTGTT-TCTCCGT-3'
pST-SpH3-TM-ERBB2	Рецептор эпидермального фактора роста 2	Her2_TM_fw_RI Her2_TM_rev_Xho	5'-AAAGAATTCAACTCTCCTACATGC-CCATCTG-3' 5'-AAACTCGAGCTTCCGGATCTTCT-GCTGCCG-3'
pST-SpH3-TM-CIRL2	Латрофилин 2	Cl2_TM_fw Cl2_TM_rev	5'-AAAGAATTCAAGGCGGCTTGCTG-CTGACAGTCATCACC-3' 5'-TTTCTCGAGTTTCCGTACTTTCTT-TTGAAGAGC-3'
pDisplay-SpH3	Рецептор фактора роста тромбоцитов	SH3_Bgl_fw SH3_Sal_rev	5'-AAAAGATCTATGTCCGGACCGCTG-CACATT-3' 5'-AAAGTCGACAACCGCCTGTTTTAA-AACTTTATC-3'

ном рецептора инсулина (IR), тропомиозин-рецепторной киназы A (TrkA), рецептора фактора роста эпидермиса 2 (ErbB2), латрофилина 2 (CIRL2) и рецептора фактора роста тромбоцитов (PDGFR), клетки высаживали на флуоресцентные чашки FluoroDish Cell Culture Dish (35 мм) (Thermo Fisher, США) с 3 мл питательной среды DMEM, содержащей 10% FBS, после чего проводили трансфекцию векторами, кодирующими данные конструкции, согласно протоколу [3, 10]. После трансфекции питательную среду отбирали, клетки промывали раствором PBS, затем добавляли питательную среду F-12 (ПанЭко, Россия) без сыворотки FBS, содержащую 50 мМ Tris-HCl-буфера (pH 8.0).

Флуоресцентные изображения клеток получали на конфокальном микроскопе Eclipse TE2000-E (Nikon, Япония) с использованием 60× объектива с масляной иммерсией. Для проверки трансмембранной локализации конструкций в качестве источника возбуждения флуоресценции использовали лазер 488 нм, фильтр эмиссии 515/10 нм. Были получены флуоресцентные изображения клеток с разрешением 512 × 512 пикселей. Для исследования pH-чувствительности данного сенсора клетки фиксировали средой Mounting Media, содержащей 100 мМ буфера с заданным pH, и получали снимки при возбуждении лазером 408 нм и фильтром 515/10 нм в канале детекции. Затем получали изображение при возбуждении лазером 488 нм и фильтром 515/10 нм в канале детекции.

Обработку микрофотографий проводили в программе ImageJ (imagej.nih.gov/ij/). Изображения экспортировали в текстовый документ, где каждому пикселю соответствовала интенсивность флуоресценции. Для каждой картинки рассчитывали средний уровень фоновой флуоресценции, который принимали за минимальное значение интенсивности сигнала. Далее рассчитывали отношение интенсивностей сигнала при возбуждении 488 и 408 нм. Получали текстовый файл (где интенсивности сигнала для каждого пикселя соответствовало рассчитанное отношение), который затем обратно в программе преобразовывали в изображение. Для оценки изменения аналитического сигнала сенсора (отношение флуоресценции при возбуждении на 488 и 408 нм) при варьировании pH через клетку проводили ли-

нию и строили профиль изменения сигнала вдоль этой линии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получен набор сенсоров внеклеточного pH на основе флуоресцентного белка SypHer3S с различными трансмембранными доменами мембранных белков, позволяющих направлять данный белок на внешнюю сторону цитоплазматической мембраны. Была охарактеризована их локализация при экспрессии в эукариотических клетках и подобран наиболее успешный вариант химерного pH-сенсора для измерения внеклеточного слабощелочного pH.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность В.В. Белоусову за предоставленную кДНК SypHer3S.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований: проекты № 19-34-90177, 20-04-00880, 19-04-01042, 20-04-00959, 17-00-00486, 17-00-00489, 19-04-00815, 19-34-51034, 18-04-01369, 18-29-09166, 20-34-90019.

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. *Chesler M.* // Physiol Rev. 2003. V. 83. P. 1183–1221. https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2003
2. *Серова О.В., Ганцова Е.А., Деев И.Е., Петренко А.Г.* // Биоорг. химия. 2020. Т. 46. С. 369–384. [*Serova O.V., Gantsova E.A., Deyev I.E., Petrenko A.G.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 506–519.] https://doi.org/10.1134/S1068162020040196
3. *Deyev I.E., Sohet F., Vassilenko K.P., Serova O.V., Popova N.V., Zozulya S.A., Burova E.B., Houillier P., Rzhevsky D.I., Berchatova A.A., Murashev A.N., Chugunov A.O., Efremov R.G., Nikol'sky N.N., Bertelli E., Eladari D., Petrenko A.G.* // Cell Metab. 2011. V. 13. P. 679–689. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.022
4. *Serova O.V., Chachina N.A., Gantsova E.A., Popova N.V., Petrenko A.G., Deyev I.E.* // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 1515. https://doi.org/10.3390/ijms20061515
5. *Serova O.V., Orsa A.N., Chachina N.A., Petrenko A.G., Deyev I.E.* // J. Rec. Sign. Trans. Res. 2019. V. 39. P. 67–72. https://doi.org/10.1080/10799893.2019.1620775
6. *Petrenko A.G., Zozulya S.A., Deyev I.E., Eladari D.* // Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1834. P. 2170–2175. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.11.011
7. *Зубков Е.А., Морозова А.Ю., Чачина Н.А., Шаяхметова Д.М., Можаев А.А., Деев И.Е., Чехонин В.П., Петренко А.Г.* // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2017. Т. 67. С. 106–112.
8. *Шаяхметова Д.М., Жевленев Е.С., Можаев А.А., Деев И.Е., Петренко А.Г.* // Биоорг. химия. 2016. Т. 42. С. 496–500. [*Shayahmetova D.M., Zhevlenev E.S., Mozhaev A.A., Deyev I.E., Petrenko A.G.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2016. V. 42. P. 449–452.] https://doi.org/10.1134/S1068162016040166
9. *Ermakova Y.G., Pak V.V., Bogdanova Y.A., Kotlobay A.A., Yampolsky I.V., Shokhina A.G., Panova A.S., Marygin R.A., Staroverov D.B., Bilan D.S., Sies H., Belousov V.V.* // Chem. Comm. (Camb). 2018. V. 54. P. 2898–2901. https://doi.org/10.1039/c7cc08740c
10. *Martynov V.I., Pakhomov A.A., Deyev I.E., Petrenko A.G.* // Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj. 2018. V. 1862. P. 2924–2939. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.09.013
11. *Menting J.G., Whittaker J., Margetts M.B., Whittaker L.J., Kong G.K.W., Smith B.J., Watson C.J., Zakova L., Kletvikova E., Jiracek J., Chan S.J., Steiner D.F., Dodson G.G., Brzozowski A.M., Weiss M.A., Ward C.W., Lawrence M.C.* // Nature. 2013. V. 493. P. 241–245. https://doi.org/10.1038/nature11781
12. *Belfiore A., Frasca F., Pandini G., Sciacca L., Vigneri R.* // Endocr. Rev. 2009. V. 30. P. 586–623. https://doi.org/10.1210/er.2008-0047
13. *Benito-Gutierrez E., Garcia-Fernandez J., Comella J.X.* // Mol. Cell Neurosci. 2006. V. 31. P. 179–192. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.09.007
14. *Olayioye M.A.* // Breast Cancer Res. 2001. V. 3. P. 385–389. https://doi.org/10.1186/bcr327
15. *Sudhof T.C.* // Ann. Rev. Neurosci. 2001. V. 24. P. 933–962. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.933
16. *Ali M.M., Kang D.K., Tsang K., Fu M., Karp J.M., Zhao W.* // Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol. 2012. V. 4. P. 547–561. https://doi.org/10.1002/wnan.1179
17. *Deyev I.E., Mitrofanova A.V., Zhevlenev E.S., Radionov N., Berchatova A.A., Popova N.V., Serova O.V., Petrenko A.G.* // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. P. 33884–33893. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.483172

Generation and Characteristics of Genetically Coded Fluorescent Sensors of Extracellular pH

A. N. Orsa*, **, #, A. S. Goryashchenko*, **, O. V. Serova*, **, A. A. Mozhaev*, **, V. I. Martynov*, A. A. Pakhomov*, E. V. Svirshchevskaya*, A. G. Petrenko*, and I. E. Deyev*, **

#E-mail: Saniaorsa@gmail.com

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

***Science and Technology University "Sirius", Olimpiyskiy prosp. 1, Sochi, 354340 Russia*

Recently, fluorescent proteins have become an indispensable tool for *in vivo* visualization of various processes occurring in living systems, from individual organelles to whole organisms. They allow observing the expression of proteins, their localization, and are also suitable for monitoring biochemical processes in cells. As a rule, fluorescent proteins have pH-dependent spectral properties, which make it possible to design genetically encoded pH sensors on their basis for solving various biological problems. In this work, we have obtained a set of extracellular pH sensors based on the SypHer3S protein, which has pH sensitivity in the pH range from 7.4 to 9.0. For this purpose, chimeric SypHer3S constructs with various transmembrane domains of membrane receptors were created, allowing the targeting of this protein to the outer side of the cytoplasmic membrane. Their subcellular localization was characterized and the most successful version of a chimeric pH sensor for measuring the extracellular pH value was selected.

Keywords: alkaline pH, pH sensor, extracellular sensor, fluorescent proteins

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 5, с. 610–621

УДК 577.151

ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫЙ СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ГИСПИДИН-3-ГИДРОКСИЛАЗЫ – КЛЮЧЕВОГО ФЕРМЕНТА БИОСИНТЕЗА ЛЮЦИФЕРИНА ГРИБОВ

© 2021 г. А. С. Герасимов*, **, #, С. О. Рогожкин, Е. С. Шахова*, Т. В. Чепурных*, А. Ю. Гороховатский*, Н. М. Мышкина*, А. В. Балакирева*, И. В. Ямпольский***

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

***Вятский государственный университет, Россия, 610000 Киров, ул. Московская, 36*

Поступила в редакцию 28.10.2020 г.
После доработки 11.11.2020 г.
Принята к публикации 16.11.2020 г.

Биолюминесценция – это способность живых организмов испускать свет. В ее основе лежит биохимическая реакция окисления субстрата – люциферина, катализируемая ферментом люциферазой. Гриб *Neonothopanus nambi* – первый эукариотический организм, для которого была расшифрована биолюминесцентная система: были установлены структура люциферина, ген люциферазы, а также описаны интермедиаты и ферменты биосинтеза люциферина. Гиспидин-3-гидроксилаза (nnH3H) представляет собой один из ключевых ферментов данного каскада, катализирующий превращение гиспидина (предшественника люциферина) в 3-гидроксигиспидин – люциферин грибов. Для полного понимания механизма и субстратной специфичности nnH3H необходимо провести структурные исследования молекулы белка. Для этого требуется разработать протокол получения высокоочищенного препарата функционально активной nnH3H в достаточных количествах. Мы показали, что коэкспрессия гена гибридного белка SUMO-nnH3H с геном шаперонина GroEL/ES в клетках бактерии *Escherichia coli* позволяет получить фермент в растворимой и активной форме с выходом 20 мг со 100 мл бактериальной культуры. Также мы впервые продемонстрировали, что FAD – кофактор гиспидин-3-гидроксилазы грибов.

Ключевые слова: биолюминесценция, гиспидин-3-гидроксилаза, гетерологичная экспрессия, гибридный белок, дот-иммуноблоттинг, активность фермента

DOI: 10.31857/S0132342321040096

ВВЕДЕНИЕ

Биолюминесценция – это способность живых организмов испускать свет. В основе биолюминесценции лежит биохимическая реакция окисления субстрата – люциферина, катализируемая ферментом люциферазой. На сегодняшний день известны более сорока различных биолюминесцентных систем, однако только для некоторых из них были установлены структуры люцифераз и люциферинов [1, 2]. Для еще меньшего числа были охарактеризованы пути их биосинтеза и участвующие в них гены. Гриб *Neonothopanus nambi* – первый эукариотический организм с полностью расшифрованной биолюминесцентной системой [3]. Были установлены основные интермедиаты пути биосинтеза люциферина, а также участвующие в нем ферменты. Основной компонент системы – люциферин – образуется в ходе ключевой реакции гидроксилирования гиспидина, катализируемой ферментом гиспидин-3-гидроксилазой (nnH3H) (рис. 1).

На данный момент гиспидин-3-гидроксилазы высших грибов практически не охарактеризованы как на биохимическом, так и на структурном уровне. Гиспидин-3-гидроксилаза из *N. nambi* состоит из 422 а.о. и обладает молекулярной массой ~46 кДа. С помощью биоинформатических методов нами было предсказано, что nnH3H имеет домен с укладкой Россмана, который содержит β-складчатые структуры [4]. Это позволило предположить, что nnH3H относится к семейству растворимых NAD(P)H/FAD-зависимых монооксигеназ. В литературе нет данных о разрешении пространственной структуры гиспидин-3-гидроксилаз высших грибов. К ближайшим гомологам данного белка (60–67% аминокислотной

Сокращения: nnH3H – гиспидин-3-гидроксилаза; K_d – константа диссоциации.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (912) 724-15-43; эл. почта: asgerasimoff@mail.ru).

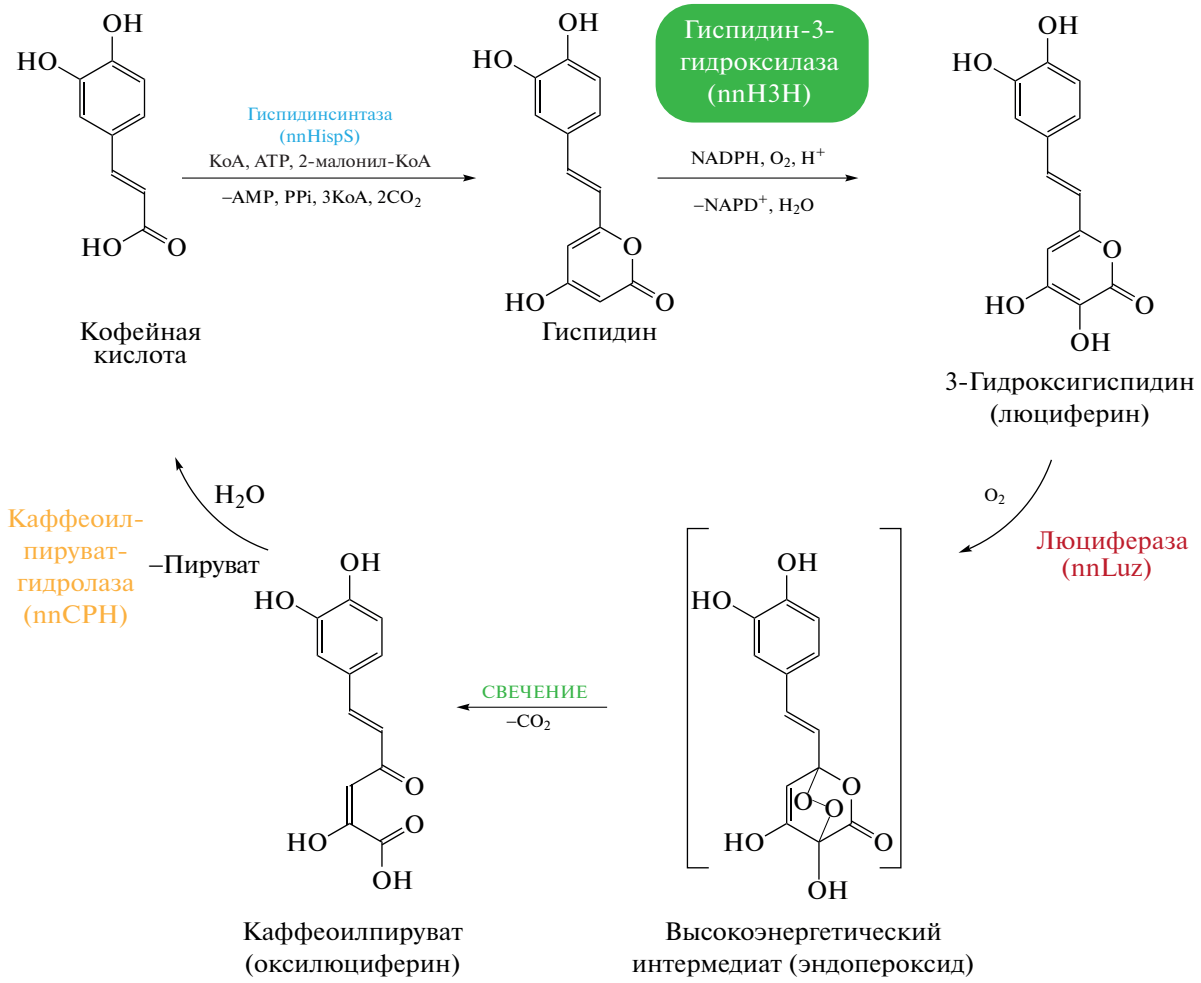


Рис. 1. Путь биосинтеза и утилизации люциферина грибов *Neonothopanus nambi*. Гиспидинсинтаза (nnHispS) катализирует превращение кофейной кислоты в гиспидин, затем гиспидин-3-гидроксилаза (nnH3H) катализирует гидроксилирование гиспидина с образованием люциферина грибов. В присутствии молекулярного кислорода люциферин окисляется люциферазой (nnLuz) до высокоэнергетического промежуточного соединения – эндопероксида, который испускает свет, распадаясь до оксилюциферина (каффеоилпирувата). В итоге оксилюциферин разлагается до кофейной кислоты в присутствии каффеоилпируватгидролазы (nnCPH).

идентичности) можно отнести гидроксилазы других биолюминесцентных грибов, в частности родов *Armillaria* и *Mycena* [3], однако их структура также не изучена. Ближайшие гомологи с известной пространственной структурой обладают сходством с nnH3H по аминокислотной последовательности не более чем на 28%, что исключает возможность проведения на их основе структурного моделирования и предсказания эффектов аминокислотных замен. Также мало изучены биохимические особенности гидроксилаз данного семейства, включая их субстратную специфичность.

На сегодняшний день существует недостаточно экспериментальных исследований, посвященных изучению гиспидин-3-гидроксилаз грибов. Для понимания механизма действия и субстратной специфичности nnH3H следует провести структурные исследования молекулы белка. Для этого необходимо разработать протокол получения высокоочищенного препарата функционально активной nnH3H в достаточных для проведения анализа количествах. Поэтому целью данной работы стало получение рекомбинантной, высокоочищенной и ферментативно активной гиспидин-3-гидроксилазы из гриба *N. nambi* путем гетерологичной экспрессии в клетках бактерии *Escherichia coli*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия гена гибридного белка SUMO-nnH3H в клетках *E. coli*. Для наработки nnH3H мы выбрали бактериальную экспрессионную систему. Бактерии *E. coli* способны производить рекомбинантные белки с выходом >1 г/л. Более того, способность роста этих бактерий на минеральных

Таблица 1. Характеристика белков-партнеров, использованных для получения гиспидин-3-гидроксилазы гриба *Neonothopanus nambi*

Название белка-партнера	Суммарный размер белка-партнера, кДа	Назначение белка-партнера	Ссылка
His_6-TrxA	13.67	Способен накапливаться в больших количествах в цитоплазме и в растворимой форме. Как *N*-, так и *C*-конец белка находятся на поверхности молекулы и достаточно подвижны, что делает его “удобным” партнером	[6]
DsbA-His_6	4.08	Лидерный пептид периплазматического белка *E. coli* DsbA, необходимый для транслокации целевого белка в периплазму	[7]
NSP4-His_6	4.07	Синтетическая лидерная последовательность для транслокации целевого белка в периплазму, полученная путем комбинации лидерного пептида периплазматического белка *E. coli* DsbA и пектиназы PelB *E. carovotora*	[7]
His_6-SUMO	12.07	При синтезе целевого белка, слитого с SUMO, наблюдается заметное увеличение экспрессии целевого полипептида и его растворимости. Внешняя гидрофильная оболочка и внутренний гидрофобный кор могут оказывать тот же эффект, что и детергенты при солюбилизации	[8]

средах делает *E. coli* подходящим организмом для продукции меченых белков для изучения при помощи ЯМР-спектроскопии. Однако известно, что клетки *E. coli* не способны проводить ряд посттрансляционных модификаций, в частности образование S–S-связей. Это приводит к формированию так называемых телец включения. Для получения функционально активного фермента требуется проведение ренатурации *in vitro*, разработка и осуществление которой зачастую трудоемки и малоэффективны.

Также активно применяются технологии гибридной экспрессии генов: целевой продукт получают в виде гибрида с белком-партнером, который улучшает физико-химические показатели молекулы белка, такие как растворимость, и его биологические свойства, например, активность, а также снижает токсическое воздействие на клетку. Использование соответствующих белков-партнеров, а также подбор оптимальных экспрессионных векторов, условий культивирования и индукции, коэкспрессия целевых генов с генами шаперонов – все это сделало возможным применение *E. coli* для получения сложных белков с правильной структурой [5].

Сначала мы использовали стратегию прямой экспрессии гена, используя систему на основе промотора РНК-полимеразы фага T7. Уровень биосинтеза nnH3H согласно результатам дот-иммуноблоттинга составил ~100 мг/л. Подбор условий культивирования показал, что снижение температуры культивирования вплоть до 15°C, а также варьирование состава среды и концентрации индуктора не оказали влияния на растворимость целевого продукта. Таким образом, было принято решение перейти к использованию гибридной экспрессии гена. В качестве белков-партнеров были выбраны варианты, представленные в табл. 1. Согласно данным литературы, перечисленные белки-партнеры были успешно применены для повышения выхода и растворимости многих рекомбинантных белков [6–8].

Для экспрессии генов гибридных белков в клетках бактерий были созданы генетические конструкции на основе экспрессионного вектора pET39b(+), который имеет в своем составе ген репрессора *lac*-оперона *laci*, предназначенного для дополнительного контроля транскрипции целевого гена. Мы установили, что гибридная экспрессия целевого гена значительно повышает выход продуцируемого белка (рис. 2). В случае использования конструкций, в которых целевой белок синтезируется в виде гибрида с SUMO или TrxA, выход составил >1 г/л, но только в виде телец включения. Изменение концентрации индуктора и температуры культивирования с 37 до 15°C не привели к увеличению растворимости целевого белка. При использовании лидерных последовательностей DsbA и NSP4 белок также накапливался в виде телец включения и отсутствовал во фракции периплазматических белков.

Максимальный уровень биосинтеза целевого продукта был достигнут при 30°C при использовании белка-партнера SUMO и составил ~2 г/л. С целью получения nnH3H в растворимой форме были созданы генетические конструкции, кодирующие гиспидин-3-гидроксилазу с различными партнерами, на основе экспрессионного вектора

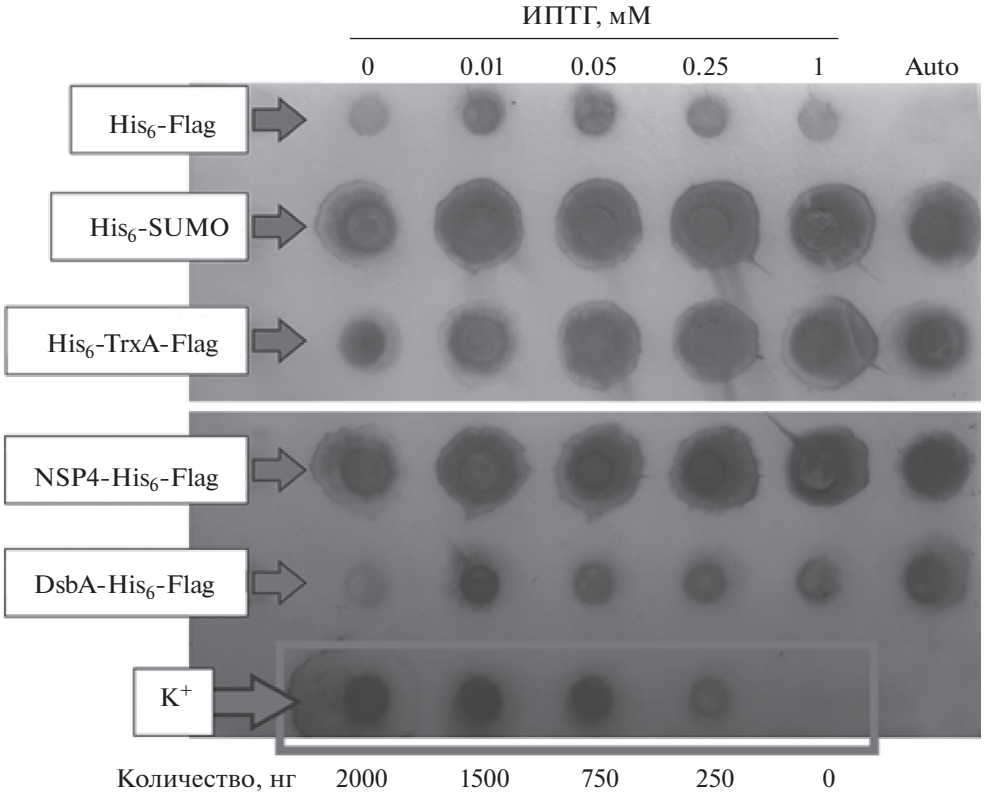


Рис. 2. Анализ уровня экспрессии гена *nnh3h* и его вариантов в клетках *E. coli* BL21(DE3) при помощи дот-иммуноблоттинга. Указаны названия белков-партнеров и концентрация индуктора ИПТГ. K^+ – положительный контроль – препарат белка, содержащего гистидиновую метку, с известной концентрацией; Auto – культивирование клеток на автоиндукционной среде TBP-5052 [12].

pCOLDIII [9]. При использовании вектора pCOLDIII происходит селективная индукция синтеза целевого белка при низкой температуре (15–20°C), что подавляет экспрессию других клеточных белков и снижает активность протеаз. С целью получения белка в растворимой форме нами были исследованы следующие условия: температура культивирования (20, 15, 13, 10°C), концентрация индуктора экспрессии – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ), концентрация посевного материала и специальных шоковых добавок, таких как этанол (1–3%, *V*/*V*), сорбитол (0.1–0.5 M), аргинин (0.1–0.3 M), KCl (0.05–0.2 M). Однако данные модификации условий культивирования не оказали положительное влияние на растворимость целевого белка.

На рис. 3*а* представлен общий уровень экспрессии *nnh3h* при оптимальных условиях культивирования и индукции с использованием разных конструкций в клетках *E. coli* BL21(DE3). Оптимальная концентрация ИПТГ составила 0.05 мМ для гибридной конструкции SUMO-nnH3H. По экспериментальным данным, выход целевого фермента составил ~1 г/л. В дальнейшем результаты фракционирования внутриклеточного белка показали, что в случае SUMO-nnH3H наблюдалось появление полосы с заданной молекулярной массой в области, соответствующей размеру целевого продукта, во фракции растворимых белков (рис. 3*б*). Как и ожидалось, растворимость целевого продукта была выше при меньшей концентрации ИПТГ. Также в ходе экспериментов по подбору оптимальных условий культивирования продуцента SUMO-nnH3H мы выяснили, что добавление в среду 60–180 мМ KCl значительно повышало растворимость рекомбинантного фермента. Лизаты демонстрировали специфическую активность nnH3H – способность конвертировать гиспидин в люциферин, однако в нерастворимой форме содержание фермента было значительно больше.

Мы заключили, что SUMO-nnH3H может быть наработан в клетках *E. coli* в функционально активном состоянии. При оптимизации условий культивирования (температура 15°C, время – 48 ч, среда TBP + 60 мМ KCl + 0.05 мМ ИПТГ) удалось значительно увеличить долю растворимого белка. Однако большая доля целевого фермента (~90%) агрегировала в тельца включения. Стоит также отметить то, что SUMO-nnH3H растворимой фракции склонен к выпадению в осадок. Агрегация белка может происходить из-за того, что во

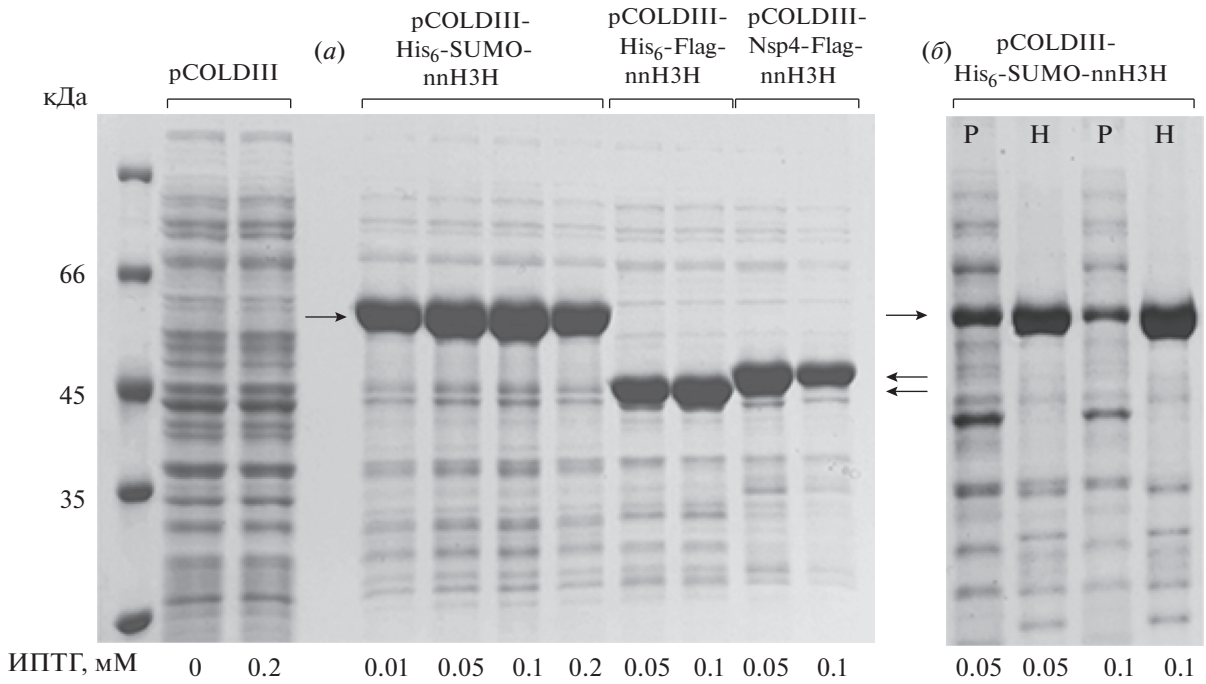


Рис. 3. (*а*) – Общий уровень экспрессии гена *nnh3h* в составе разных конструкций в *E. coli* BL21(DE3) при подборе среды для индукции; (*б*) – фракционирование белков в клетках *E. coli* BL21(DE3), продуцирующих SUMO-nnH3H. P – фракция растворимого клеточного белка, H – фракция нерастворимого белка. Стрелками отмечено положение целевого белка.

время синтеза он не успевает приобрести правильную пространственную структуру, поэтому было решено коэкспрессировать целевой ген в присутствии шаперонина GroEL/ES.

GroEL/ES представляет собой сложную гетеромерную молекулу цилиндрической формы размером 145 Å в высоту и 135 Å в диаметре. Неправильно свернутый белок попадает в пространство цилиндра GroEL/ES – центральный канал диаметром ~45 Å, в котором создаются оптимальные условия для сворачивания белковой молекулы. Для экспериментов по коэкспрессии был использован экспрессионный вектор pACYC-TF-GroEL/ES [10]. Уровень биосинтеза SUMO-nnH3H в условиях коэкспрессии снизился до 1 г/л, однако ~30% целевого продукта находилось в растворимой форме.

Выделение SUMO-nnH3H из клеток *E. coli*. Для предотвращения агрегации целевого белка клеточную биомассу лизировали в буферном растворе, содержащем 300 мМ аргинина или 2 М мочевины или 1 М гидрохлорида гуанидина. Как видно из электрофореграммы (рис. 4*а*), добавление хаотропных агентов по-разному влияло на эффективность выделения и очистки. Показано значительное различие в поведении молекулы белка при адсорбции на сорбенте Ni-sepharose HP. Использование аргинина не только способствовало повышению динамической емкости сорбента, но также препятствовало неспецифическому связыванию. Для предотвращения неспецифического связывания с сорбентом хроматографию проводили в условиях перегрузки колонки. В результате за одну стадию хроматографической очистки удалось получить препарат целевого фермента с чистотой >95%, которая удовлетворяет требованиям к чистоте препаратов для структурных исследований. Стоит отметить, что лизаты, полученные на буферных растворах с добавлением гидрохлорида гуанидина или мочевины, имели активность, соответственно, в 20 и 10 раз меньше по сравнению с лизатом, содержащим аргинин.

Следующим шагом стало отщепление SUMO от nnH3H при помощи протеазы Ulp1 [11]. В ходе экспериментов по подбору условий гидролиза SUMO были проанализированы различные соотношения фермента и субстрата (от 1 : 1 до 1 : 10000), разное время реакции (0.5–48 ч), температура (4–37°C) и pH (7.0–8.5). Также было проанализировано влияние различных компонентов на эффективность расщепления: аргинина (0.05–1 М), мочевины (0.1–2 М), тритона X100 (0.01–0.5%), CHAPS (5–50 мМ), дитиотреитола (0.1–5 мМ), триметиламиноксида (0.1–0.5 М), KCl (50–200 мМ) и гиспидина (0.5–10 мкМ). Тем не менее получить гиспидин-3-гидроксилазу грибов без белка-партнера SUMO не удалось. Объяснений данно-

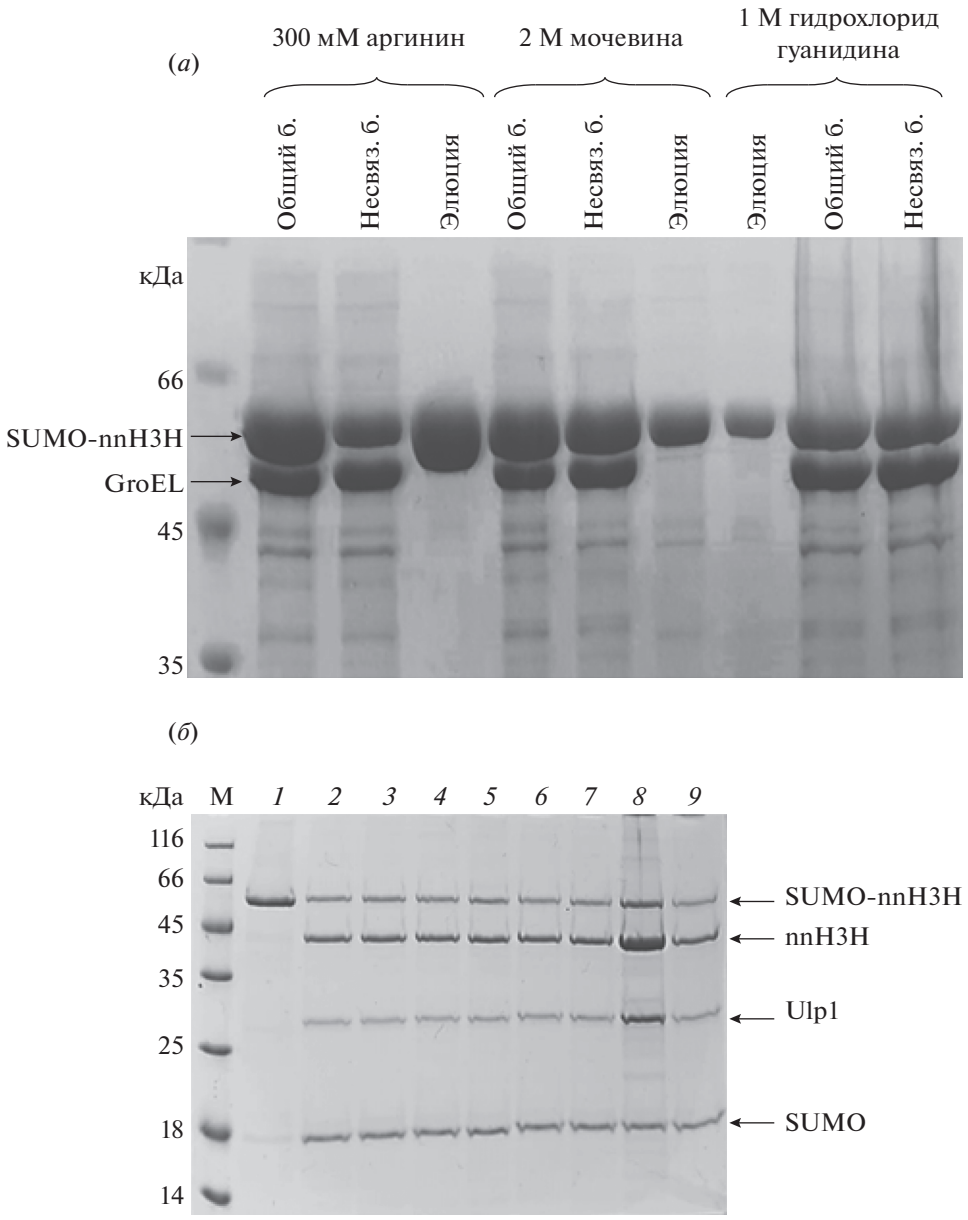


Рис. 4. (*а*) – Выделение SUMO-nnH3H из клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных векторами pCOLDIII-His$_6$-SUMO-nnH3H и pACYC-TF-GroEL/ES, в присутствии 300 мМ аргинина, 2 М мочевины и 1 М гидрохлорида гуанидина. Общий б. – общий растворимый белок; Несвяз. б. – фракция белков, не связавшихся с сорбентом; Элюция — элюированный белок; (*б*) – расщепление очищенного SUMO-nnH3H (в 50 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 150 мМ NaCl, 50 мМ аргинин, 20 мМ имидазол). M – маркер; *1* – очищенный SUMO-nnH3H; *2–9* – образцы после расщепления (1 ч, комнатная температура) в условиях добавления 0.5 мМ DTT (*2*), 2 мМ DTT (*3*), 0.2% IGEPAL (*4*), 0.4% IGEPAL (*5*), 0.5 М аргинина (*6*), 1 М аргинина (*7*), 5% глицерина (*8*) и 10% глицерина (*9*).

му явлению может быть несколько. Во-первых, nnH3H оказался склонным к агрегации, и после добавления протеазы Ulp1 часть фермента выпадала в осадок (данные не представлены). Также отщепление SUMO от гибридного белка может быть затруднено стерической недоступностью сайта. Чтобы проверить эту гипотезу, была создана генетическая конструкция, в которой между белком-партнером и ферментом был вставлен гибкий линкер GSG_4SG_4. Также ген *nnh3h* в этой конструкции был укорочен с *N*- и *C*-концов, т.к. по данным молекулярного моделирования структуры гиспидин-3-гидроксилазы первые и последние 5 а.о. не влияют на структурные особенности целевой молекулы. Введение дополнительного линкера не повлияло на схему наработки, выделения и очистки фермента. Негативного влияния на активность не наблюдалось, однако эффектив-

ность расщепления также не изменилась. Расщепление очищенного SUMO-nnH3H было возможно лишь при значительном разведении целевого белка до концентрации 0.1–0.2 мг/мл и использовании относительно высокого количества протеазы Ulp1 (1 : 5 – 1 : 10). Расщепление протекало в течение 1 ч. Любая попытка масштабировать протокол заканчивались выпадением весомой части целевого белка в осадок (рис. 4*б*). Активность протеазы Ulp1 была подтверждена расщеплением модельного гибрида SUMO-DTX (данные не представлены).

Полученный рекомбинантный фермент nnH3H в виде гибрида с белком-партнером SUMO – функционально активный и пригодный для проведения структурных исследований. Имеющиеся в литературе данные позволяют предположить, что разница в молекулярных массах и наличие SUMO не будут препятствовать проведению таких исследований [8]. В результате выделения и очистки, которая включала в себя металло-хелатную аффинную хроматографию, мы получили очищенный фермент с выходом ~20 мг со 100 мл бактериальной культуры.

Оценка функциональной активности очищенного рекомбинантного фермента SUMO-nnH3H. Помимо гетерологичной экспрессии гена *nnh3h*, важной задачей стала оценка функциональной активности полученного фермента. Нами был разработан протокол, основанный на люциферин-люциферазной реакции грибов. При добавлении фермента к раствору гиспидина (предшественника люциферина, рис. 1) и NAD(P)H протекает реакция гидроксилирования субстрата с образованием люциферина. Последний, в свою очередь, можно идентифицировать при помощи люциферазы *N. nambi* по эмиссии квантов света. Разработанный биолюминесцентный метод – чувствительный и позволяет быстро осуществить оценку активности фермента nnH3H.

Оказалось, что при выделении и очистке гибридного белка SUMO-nnH3H активность фермента существенно снижается. Мы предположили, что это происходит из-за диссоциации определенных кофакторов из молекулы активного фермента. Данными кофакторами, вероятнее всего, не выступают катионы двухвалентных металлов, т.к. фермент сохраняет аналогичную активность в буферном растворе, содержащем 10 мМ ЭДТА. При сравнении аминокислотных последовательностей с гомологами можно отметить, что nnH3H с большей долей вероятности имеет сайты связывания с FAD. Сам фермент относится к семейству NAD(P)H-зависимых монооксигеназ, катализирующих реакцию: NAD(P)H + + R-H + O_2 → $NAD(P)^+$ + R-OH + H_2O, а также он, вероятнее всего, относится к семейству PHBH-подобных гидроксилаз, таких как *p*-гидроксибензоатгидроксилаза *Pseudomonas fluorescens* (UniProt: P00438), монооксигеназа *Pseudomonas aeruginosa* (UniProt: Q9HWG9) и дигидропиридингидроксилаза *Paenarthrobacter nicotinovorans* (UniProt: Q93NG3). С помощью биоинформатического анализа последовательности nnH3H были предсказаны предположительные сайты связывания FAD, помимо сайтов связывания с NAD(P)H. Действительно, оказалось, что добавление FAD на несколько порядков повышает активность фермента, в отличие от его флавиновых предшественников (рис. 5).

Чтобы оценить специфичность взаимодействия FAD и SUMO-nnH3H, мы определили константу диссоциации (K_d) этого комплекса. Исследование проводили по методу, предложенному Loomans et al. (табл. 2) [12]. По нашим оценкам, K_d для FAD составляет ~0.78 мкМ. Таким образом, мы впервые показали, что молекула FAD не только связывается с молекулой фермента, но и важна для его активности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы *E. coli*. Для создания генетических конструкций использовали штамм *E. coli* XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lacI*^{q}*Z*Δ*M15* Tn*10* (Tet^r)] (Stratagene, США), для бактериальной экспрессии гена *nnh3h* – штамм BL21(DE3) [F$^-$ *ompT hsdS*$_B$(rB$^-$ mB$^-$) *gal dcm* (DE3)] (Novagen, США).

Конструирование экспрессионных векторов для получения белка nnH3H. Приготовление компетентных клеток и трансформацию *E. coli*, выделение плазмидной ДНК, гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции, лигирование и другие генноинженерные манипуляции проводили согласно стандартным методикам [13]. Химический синтез небольших фрагментов дцДНК, олигонуклеотидов, а также контрольное секвенирование полученных конструкций проведены ЗАО “Евроген” (Россия). Создание генетической конструкции с последовательностью гена *nnh3h* было описано в предыдущей работе [4]. Для получения экспрессионных векторов с целью продукции целевого фермента в бактериях использовали плазмиды pET39b(+) (Novagen, США) и pCOLDIII (Takara Bio, Япония). Для создания генетических конструкций His_6-Flag-nnH3H, HELIX-His_6-Flag-nnH3H, DsbA-His_6-Flag-nnH3H и NSP4-His_6-Flag-nnH3H амплификацию гена *nnh3h* производили с использованием 3–4 олигонуклеотидов (табл. 3) методом step-out ПЦР. Для создания конструкции His_6-Flag-nnH3H были использованы олигонуклеотиды, последовательности которых приведены в табл. 3.

Полученные фрагменты ДНК клонировали в вектор pET39b(+), pCOLDIII по двум сайтам ре-

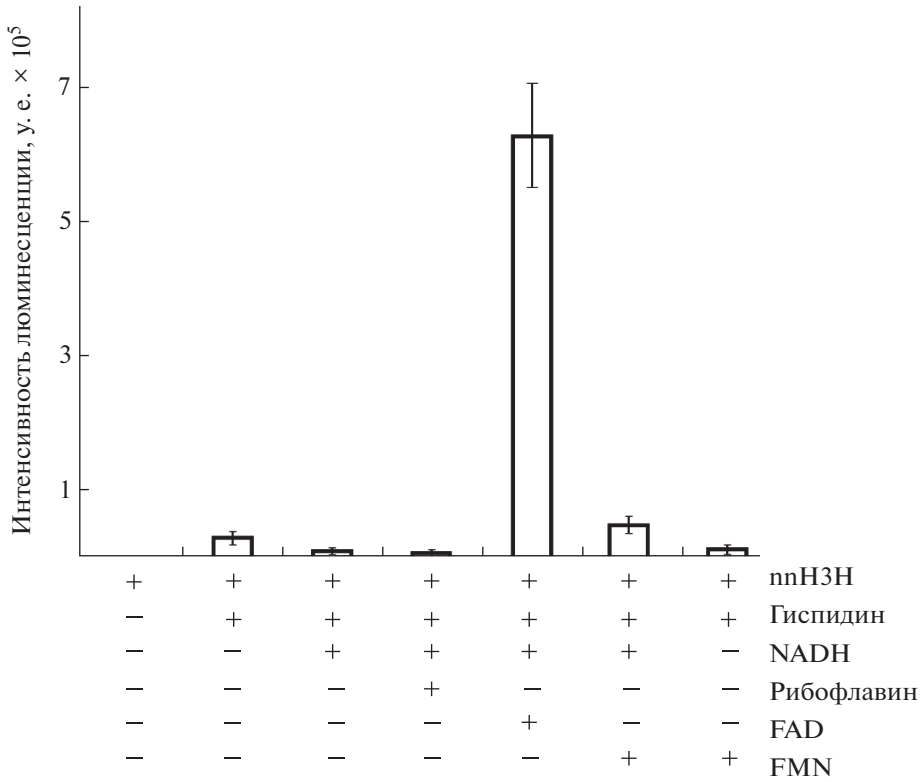


Рис. 5. Определение влияния кофактора FAD и его флавиновых предшественников на активность гиспидин-3-гидроксилазы *N. nambi* путем измерения биолюминесценции сопряженной реакции в присутствии люциферазы *N. nambi*, гиспидина и NADH.

стрикции (XbaI и HindIII). Для создания конструкций His_6-SUMO-nnH3H и His_6-TrxA-Flag-nnH3H проводили отжиг частично комплементарных ПЦР-продуктов, их амплификацию и вставку в вектор по двум сайтам рестрикции (XbaI и HindIII). Для создания конструкций His_6-SUMO-nnH3H использовали олигонуклеотиды His-Sumo XbaI, Sumo-partH3H rev, H3H-partSumo dir, для конструкции His_6-TrxA-Flag-nnH3H – His-Trx XbaI dir, Trx-flag rev, flag-H3H dir (табл. 3). Для создания всех конструкций использовали олигонуклеотид H3H HindIII rev (табл. 3).

Оценка уровня экспрессии гена *nnh3h* в клетках *E. coli*. Трансформацию бактериальных клеток *E. coli* для синтеза белка проводили согласно стандартному протоколу [14], затем добавляли

Таблица 2. Результаты измерения интенсивности биолюминесценции, использованные для расчета константы диссоциации комплекса FAD–SUMO-nnH3H

Интенсивность свечения, ед.	Концентрация FAD, мкМ						
	0	0.0333	0.3333	3.333	16.667	33.333	83.333
Без разведения SUMO-nnH3H (n = 1 для оценки K_d)	101	2954	13212	38494	118121	129877	133289
	118	3120	12876	41198	115736	132816	134783
	143	3016	13561	40182	115967	129765	134536
	121 ± 21	3030 ± 84	13216.3 ± 343	39958 ± 1366	116608 ± 1315	130819 ± 1730	134203 ± 801
При 4-кратном разведении (n = 4 для оценки K_d)	123	1923	6441	14573	68820	76465	78746
	129	1753	6262	15001	67121	75983	77391
	156	1801	6495	14323	68191	76010	78425
	136 ± 18	1826 ± 88	6399 ± 122	14632 ± 343	68044 ± 859	76153 ± 271	78187 ± 708

Примечание: представлены данные трех независимых экспериментов и средние значения ± s.d.

Таблица 3. Последовательности олигонуклеотидов, используемых при создании экспрессионных векторов для получения гиспидин-3-гидроксилазы

Название конструкции	Название олигонуклеотида	Последовательность олигонуклеотида (5'–3')
pCOLDIII_His$_6$-Flag-nnH3H, pET39b_His$_6$-Flag-nnH3H	His-Flag-H3H dir1	GGTTCCGACTACAAAGACGATGACGATAAAGCATCGTTTGAGAATTCTCTAAG
	His-Flag-H3H XbaI dir2	ATGCTCTAGAGAAGGAGATATACATATGGGCCACCATCATCACCACCATGGTTCCGACTACAAAGACGAT
pCOLDIII_DsbA-His$_6$-Flag-nnH3H, pET39b_DsbA-His$_6$-Flag-nnH3H	His-flag-H3H dir1	CACCACCATGGTTCCGACTACAAAGACGATGACGATAAAGCATCGTTTGAGAATTCTCTAAG
	DsbA-His-flag-H3H dir2	TGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTAGCGCATCGGCGGCGGGCCACCATCATCACCACCATGGTTCCGACTA
	DsbA-His-flag-H3H XbaI dir3	ATGCTCTAGAGAAGGAGATATACATATGAAAAAGATTTGGCTGGCGCTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTT
pCOLDIII_NSP4-His$_6$-Flag-nnH3H, pET39b_NSP4-His$_6$-Flag-nnH3H	His-flag-H3H dir1	CACCACCATGGTTCCGACTACAAAGACGATGACGATAAAGCATCGTTTGAGAATTCTCTAAG
	Nsp4-His-flag-H3H dir2	GTCTGCTGCTCCTCGCTGCCCAGCCGGCGATGGCGGCGGGCCACCATCATCACCACCATGGTTCCGACTA
	Nsp4-His-flag-H3H XbaI dir3	ATGCTCTAGAGAAGGAGATATACATATGAAAAAGATTACCGCTGCGGCGGGTCTGCTGCTCCTCGCTGC
pCOLDIII_His$_6$-SUMO-nnH3H, pET39b_His$_6$-SUMO-nnH3H	His-Sumo XbaI dir	ATGCTCTAGAGAAGGAGATATACATATGGGCCACCATCATCACCACCATGGTTCCGATTCTGAAGTGAACCAG
	Sumo-partH3H rev	ACGATGCGCCACCAATCTGCTCACGG
	H3H-partSumo dir	ATTGGTGGCGCATCGTTTGAGAATTCTCTAAG
pCOLDIII_His$_6$-TrxA-Flag-nnH3H, pET39b_His$_6$-TrxA-Flag-nnH3H	His-Trx XbaI dir	ATGCTCTAGAGAAGGAGATATACATATGGGTCACCATCACCATCACCACGGTAGCGATAAAATTATTCACCTGACT
	Trx-flag rev	TCATCGTCTTTGTAGTCGGAACCGGCCAGGTTAGCGTCGAGG
	flag-H3H dir	CGACTACAAAGACGATGACGATAAAGCATCGTTTGAGAATTCTCTAAG
Для всех конструкций	H3H HindIII rev	GCATAAGCTTATTAGGCAGAATTAGAGCTTCTTAGGAGCGTCTCGAGAAC

раствор ИПТГ до конечных концентраций 0, 0.01, 0.05, 0.25 и 1 мМ. Клетки выращивали при температуре 10–37°C в течение 1–3 сут. Содержание целевого белка анализировали методами электрофореза по Лэммли [15] и дот-иммуноблоттинга [16], используя моноклональные антитела мыши против полигистидинового тэга, конъюгированные с пероксидазой хрена (A7058, Sigma, США). Анализируемые образцы наносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C (Cytiva, Швеция). Мембрану высушивали на воздухе и блокировали 5%-ным раствором сухого обезжиренного молока

в TBS-Tween 80 в течение 1 ч. Мембрану инкубировали с моноклональными антителами к гистидиновому тэгу, конъюгированными с пероксидазой хрена, в разведении 1 : 1000 (A7058, Sigma, США). Визуализацию проводили с помощью готового хромогенного субстрата для мембран (T0565, Sigma, США). Денситометрический анализ мембраны осуществляли при помощи программы ImageJ (www.imagej.net).

Фракционирование белков из клеток *E. coli*. Биомассу *E. coli*, собранную с 1 мл культуры, размораживали и суспендировали в 500 мкл лизирующего буфера (50 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 250 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0.5% Тритона X-100). Суспензию переносили в пробирки (2 мл), добавляли 5 мкл раствора лизоцима (10 мг/мл) и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем добавляли PMSF до концентрации 0.5 мМ. Образец трижды обрабатывали ультразвуком в течение 3–5 с, перерыв между циклами 2–3 мин. Во время всего процесса пробирки находились во льду. Обработанный образец затем центрифугировали в течение 10 мин при 12000 *g* и 4°C. Супернатант (растворимый белок) отбирали в отдельную пробирку. Для получения раствора белка из телец включения осадок растворяли в 500 мкл TES-буфера (100 мМ Трис-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 10 мМ ЭДТА). Фракцию периплазматических белков получали согласно методике Goffin et al. [17]. Локализацию целевого белка оценивали методом денатурирующего гель-электрофореза по методу Лэммли (12%-ный разделяющий и 8%-ный формирующий гели) [15].

Выделение целевого фермента из клеток *E. coli*. Среду TBP объемом 100 мл, содержащую ампициллин (200 мкг/мл) и хлорамфеникол (140 мкг/мл), инокулировали 50 колониями штамма *E. coli* BL21(DE3), трансформированного векторами pCOLDIII-His_6-SUMO-nnH3H и pACYC-TF-GroEL/ES. Культуру выращивали при 37°C, 300 об/мин в течение 2–4 ч до достижения OD_{550} 1.0–1.5. Затем добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0.05 мМ и снижали температуру культивирования до 15°C. Индукцию проводили в течение 24 ч. Биомассу отделяли с помощью центрифугирования при 8000 *g* в течение 5 мин, после чего осадок суспендировали в 25 мл лизирующего буфера (100 мМ KP_i, pH 7.5, 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, 300 мМ аргинин, 0.5 мМ 2-меркаптоэтанол) и разрушали при помощи ультразвука (5 циклов по 30 с, перерывы по 2 мин). После разрушения в полученный лизат добавляли 0.1% (*V*/*V*) полиэтиленимина для удаления ДНК и центрифугировали в течение 25 мин при 12000 *g*. Супернатант разводили в 2 раза водой Milli-Q, пропускали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм и наносили на колонку HiTrap Ni-sepharose HP (Cytiva, Швеция) объемом 5 мл, предварительно уравновешенную буфером A (50 мМ KP_i, pH 7.5, 200 мМ NaCl, 10 мМ имидазол, 150 мМ аргинин). Затем осуществляли промывку сначала буфером A (не менее трех объемов сорбента), а затем буфером B: 50 мМ KP_i, pH 7.5, 200 мМ NaCl, 40 мМ имидазол (не менее трех объемов сорбента). Элюцию проводили буфером C (50 мМ KP_i, pH 7.5, 200 мМ NaCl, 200 мМ имидазол). Элюат переводили в буферный раствор (50 мМ KP_i, pH 7.5, 200 мМ NaCl) на колонке PD10 (Cytiva, Швеция), содержащей сорбент Сефадекс G25 (Cytiva, Швеция), и использовали для проведения тестов на активность.

Определение активности nnH3H. Все стоковые растворы компонентов для измерения активности были приготовлены непосредственно перед экспериментом и находились во льду: 0.2 мМ гиспидин, 0.5 мМ FAD и 10 мМ NADPH в 10 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7.5), 2%-ный раствор додецилмальтозида (DDM). Раствор nnH3H стандартизировали по концентрации белка методом Бредфорда до концентрации 0.1 мг/мл. Реакционная смесь для гидроксилирования гиспидина содержала 1 мкл раствора фермента, 10 мкМ гиспидин, 500 мкМ NADPH, 25 мкМ FAD. Объем реакции доводили до 10 мкл при помощи 10 мМ калий-фосфатного буфера, pH 7.5. Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 10 мин. Концентрацию образовавшегося 3-гидроксигиспидина оценивали по интенсивности свечения, используя рекомбинантную люциферазу *N. nambi*. Для данных целей 10 мкл мембранной фракции, содержащей люциферазу, солюбилизировали в 10 мкл 2% DDM и добавляли 80 мкл 10 мМ калий-фосфатного буфера, pH 7.0. Затем 20 мкл раствора люциферазы добавляли к 10 мкл реакционной смеси для гидроксилирования гиспидина и сразу же проводили измерение интенсивности биолюминесценции на планшетном ридере CLARIOstar (BMG Labtech, Германия) в спектральном диапазоне 500 ± 50 нм. В качестве положительного контроля использовали очищенный препарат 3-гидроксигиспидина (люциферин грибов – субстрат люциферазы) в эквивалентной концентрации [18]. В качестве отрицательного контроля вместо раствора nnH3H использовали раствор бычьего сывороточного альбумина с концентрацией 0.1 мг/мл. K_d для FAD определяли по методу Loomans et al. [11]. Все эксперименты по определению активности проводили в 3–5 независимых повторах.

Методика расчета константы диссоциации SUMO-nnH3H и FAD. Специфичность взаимодействия FAD и SUMO-nnH3H определяли путем оценки K_d комплекса. Исследование проводили в 96-луночных планшетах по методу, предложенному Loomans et al. [12]. Равновесие в системе FAD–SUMO-nnH3H в случае нековалентного бимоле-

кулярного взаимодействия можно описать с помощью закона действующих масс:

$$K_a = \frac{[ES]}{[E][S]}; \quad \begin{cases} [E] = [E]_0 - [ES] \\ [S] = [S]_0 - [ES], \end{cases}$$

где E – исследуемый фермент; S – кофактор; ES – их комплекс; $[E]$, $[S]$ – равновесные концентрации фермента и кофактора в системе; $[E]_0$, $[S]_0$ – начальные концентрации фермента и кофактора.

При условии, что с SUMO-nnH3H связалось количество FAD, равное половине максимального, и подставляя все найденные значения, приходим к выражению для константы аффинности (K_a):

$$\begin{cases} [S] = \frac{[S]_{max}}{2} \\ [ES] = \frac{[E]_0}{2} \Rightarrow K_a = \frac{2}{2[S] - [E]_0} \\ K_a = \frac{[ES]}{([E]_0 - [ES])([S]_0 - [ES])}. \end{cases}$$

При этом зависимость активности фермента, прямо пропорциональная количеству образовавшегося гиспидина, а значит, и интенсивности биолюминесценции, от концентрации кофактора будет иметь характерную сигмовидную форму. При заданных сериях разведений фермента E, E_1, E_2, ..., E_n константа реакции не будет зависеть от его концентрации и легко выражается в следующее тождество:

$$\begin{cases} K_a = \frac{2}{2[S] - [E]_0} \\ K_a = \frac{2}{2[S_n] - n[E]_0} \end{cases} \Rightarrow$$

$$\Rightarrow [R]_0 = \frac{2n([S] - [S_n])}{n-1} \Rightarrow$$

$$\Rightarrow K_a = \frac{n-1}{n[S_n] - [S]}.$$

С учетом того, что K_d – обратная величина K_a, получаем:

$$K_d = \frac{n[S_n] - [S]}{n-1},$$

где n – заданное разведение фермента; $[S]$ и $[S_n]$ – концентрации связанного лиганда при интенсивности биолюминесценции, равной половине максимальной, мкМ.

В ходе выполнения данной работы были подобраны оптимальное разведение, которое составило 4, и концентрация FAD – 0–80 мкМ (табл. 2). Далее зависимость связывания анализировали при помощи программы SigmaPlot (http://www.sigmaplot.co.uk/) и определяли концентрации FAD при интенсивности биолюминесценции, равной половине максимальной. Для образца без разведения концентрация FAD составила 12.18 мкМ, а для разведения в 4 раза – 3.63 мкМ. Таким образом, оценочное значение K_d составляет (4 × 3.63 – 12.18)/3 = 0.78 мкМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что гиспидин-3-гидроксилаза тропического гриба *Neonothopanus nambi* может эффективно нарабатываться в клетках *E. coli* в виде гибрида с белком-партнером SUMO в функционально активном состоянии. При оптимизации условий культивирования и коэкспрессии с геном шаперона GroEL/ES удалось достичь уровня биосинтеза ~1 г/л, причем ~30% целевого продукта находились в растворимой форме. Очищенный гибридный белок проявляет свою специфическую активность в отношении гиспидина. Оказалось, что добавление FAD на несколько порядков увеличивает активность фермента, в отличие от его флавиновых предшественников. По нашим оценкам, K_d для FAD составляет ~0.78 мкМ. Более того, мы впервые показали, что молекула FAD не только связывается с молекулой фермента в качестве кофактора, но и выступает субстратом.

Полученные результаты – важный шаг на пути изучения биохимических и структурных особенностей гидроксилаз данного семейства, а также механизмов биолюминесценции.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование проведено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-34-20134) и гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации № НШ-2605.2020.4.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

И.В. Ямпольский – учредитель ООО “Планта”. Компания “Планта” подала заявки на патенты, связанные с использованием компонентов биолюминесцентной системы грибов.

А.С. Герасимов, С.О. Рогожкин, Е.С. Шахова, Т.В. Чепурных, А.Ю. Гороховатский, Н.М. Мышкина и А.В. Балакирева заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kaskova Z.M., Tsarkova A.S., Yampolsky I.V.* // Chem. Soc. Rev. 2016. V. 45. P. 6048–6077. https://doi.org/10.1039/C6CS00296J
2. *Oba Y., Stevani C.V., Oliveira A.G., Tsarkova A.S., Chepurnykh T.V., Yampolsky I.V.* // Photochem. Photobiol. 2017. V. 93. P. 405–415. https://doi.org/10.1111/php.12704
3. *Kotlobay A.A., Sarkisyan K.S., Mokrushina Y.A., Marcet-Houben M., Serebrovskaya E.O., Markina N.M., Somermeyer L.G., Gorokhovatsky A.Y., Vvedensky A., Purtov K.V., Petushkov V.N., Rodionova N.S., Chepurnyh T.V., Fakhranurova L.I., Guglya E.B., Ziganshin R., Tsarkova A.S., Kaskova Z.M., Shender V., Abakumov M., Abakumova T.O., Povolotskaya I.S., Eroshkin F.M., Zaraisky A.G., Mishin A.S., Dolgov S.V., Mitiouchkina T.Y., Kopantzev E.P., Waldenmaier H.E., Oliveira A.G., Oba Y., Barsova E., Bogdanova E.A., Gabaldón T., Stevani C.V., Lukyanov S., Smirnov I.V., Gitelson J.I., Kondrashov F.A., Yampolsky I.V.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2018. V. 115. P. 12728–12732. https://doi.org/10.1073/pnas.1803615115
4. *Medvedev K.E., Kinch L.N., Schaeffer R.D., Grishin N.V.* // PLoS Comput. Biol. 2019. V. 15. P. e1007569. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007569
5. *Rosano G.L., Ceccarelli E.A.* // Front. Microbiol. 2014. V. 5. P. 172. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172
6. *McCoy J., Lavallie E.* // Curr. Protoc. Mol. Biol. 2001. Chapter 16. Unit 16.8. https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1608s28
7. *Zhang W., Lu J., Zhang S., Liu L., Pang X., Lv J.* // Microb. Cell Fact. 2018. V. 17. P. 50. https://doi.org/10.1186/s12934-018-0894-y
8. *Butt T.R., Edavettal S.C., Hall J.P., Mattern M.R.* // Protein Expr. Purif. 2005. V. 43. P. 1–9. https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.03.016
9. *Kobayashi H., Yoshida T., Inouye M.* // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. P. 5356–5362. https://doi.org/10.1128/AEM.00691-09
10. *Lamppa J.W., Tanyos S.A., Griswold K.E.* // J. Biotechnol. 2013. V. 164. P. 1–8. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.11.007
11. *Mossessova E., Lima C.D.* // Mol. Cell. 2000. V. 5. P. 865–876. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80326-3
12. *Loomans E.E., Roelen A.J., Van Damme H.S., Bloemers H.P., Gribnau T.C., Schielen W.J.* // J. Immunol. Methods. 1995. V. 184. P. 207–217. https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00089-s
13. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* // Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 4th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
14. *Kurien B.T., Scofield R.H.* // Biotechniques. 1995. V. 18. P. 1023–1026.
15. *Laemmli U.K.* // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685. https://doi.org/10.1038/227680a0
16. *Zeder-Lutz G., Cherouati N., Reinhart C., Pattus F., Wagner R.* // Protein Expr. Purif. 2006. V. 50. P. 118–127. https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.05.017
17. *Goffin P., Dewerchin M., De Rop P., Blais N., Dehottay P.* // Biotechnol. J. 2017. V. 12. https://doi.org/10.1002/biot.201700168
18. *Bubyrev A.I., Tsarkova A.S., Kaskova Z.M.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 183–185. https://doi.org/10.1134/S106816201902002X

Recombinant Production of Hispidin-3-Hydroxylase – the Key Enzyme in Fungal Luciferin Biosynthesis

A. S. Gerasimov*, **, #, S. O. Rogozhkin, E. S. Shakhova*, T. V. Chepurnykh*, A. Y. Gorokhovatsky*, N. M. Myshkina*, A. V. Balakireva*, and I. V. Yampolsky***

#Phone: +7 (912) 724-15-43; e-mail: asgerasimoff@mail.ru

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

***Vyatka State University, ul. Moskovskaya 36, Kirov, 610000 Russia*

Bioluminescence is a phenomenon of light emission resulting from oxidation of a substrate, luciferin, catalyzed by an enzyme – luciferase. The fungus *Neonothopanus nambi* is the first eukaryotic organism with the fully deciphered bioluminescent system: the structure of luciferin was established, luciferase gene was described, and intermediates and enzymes involved in the luciferin biosynthesis pathway were identified. One of the crucial reactions in this pathway is the formation of luciferin by hydroxylation of hispidin catalyzed by hispidin-3-hydroxylase (nnH3H). To fully understand the mechanism of action and substrate specificity of the enzyme, it is necessary to carry out structural studies of the molecule. To do that, it is necessary to develop a protocol for obtaining a highly purified and functionally active nnH3H in the appropriate quantities. We describe a robust approach to produce a soluble and enzymatically active nnH3H fused with SUMO and co-expressed with GroEL/ES chaperonin at low temperature in *Escherichia coli*. The yield of recombinant nnH3H achieved was 20 mg per 100 mL of bacterial culture. Additionally, we show for the first time that FAD is a cofactor of fungal hispidin-3-hydroxylase.

Keywords: bioluminescence, hispidin-3-hydroxylase, heterologous gene expression, fusion protein, dot-blot, enzyme activity

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 5, с. 622–631

УДК 547.97:544.165

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ И МЕХАНИЗМЫ ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ДИМЕТИЛОВОГО ЭФИРА 13^1-[2-(ГУАНИДИНИЛ)ЭТИЛАМИНО]ХЛОРИНА e_6

© 2021 г. А. В. Ефременко*, **, Е. Д. Дьякова*, *, П. В. Островерхов***, Н. С. Кирин***, А. Ф. Миронов***, М. А. Грин***, А. В. Феофанов*, **, #**

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

***Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1/12*

****МИРЭА – Российский технологический университет, Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Россия, 119571 Москва, просп. Вернадского, 86*

Поступила в редакцию 08.11.2020 г.
После доработки 19.11.2020 г.
Принята к публикации 26.11.2020 г.

Установлено, что фотосенсибилизатор диметиловый эфир 13^1-[2-(гуанидинил)этиламино]хлорина e_6 накапливается преимущественно в лизосомах, частично в эндосомах и не накапливается в митохондриях клеток аденокарциномы легкого человека A549. Первичный фотоцитотоксический эффект данного фотосенсибилизатора связан с повреждением лизосом и его высвобождением в цитоплазму. В цитоплазме формируется однородное распределение фотосенсибилизатора в комплексах с мембранными структурами, которые служат вторичными мишенями его фотоиндуцированного действия. Обнаружены зависимые от времени морфологические признаки развития параптоза, которые указывают на фотодинамическое повреждение эндоплазматического ретикулума как на вторичный механизм фотоцитотоксического действия исследуемого фотосенсибилизатора. На этой стадии происходит еще одно изменение потенциальных клеточных мишеней фотосенсибилизатора: он концентрируется в цитоплазматической и ядерной мембранах, в мембранах многочисленных вакуолей, а также в лизосомах, которые, по-видимому, продолжают образовываться в процессе развития параптоза. Таким образом, исследуемое производное хлорина e_6, как представитель гидрофобных фотосенсибилизаторов с внутриклеточным нацеливанием на лизосомы, обладает двух- или трехстадийным механизмом фотодинамического действия с последовательным изменением клеточных мишеней.

Ключевые слова: фотосенсибилизатор, фотодинамическая терапия, внутриклеточная локализация, клеточные органеллы, флуорофор, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

DOI: 10.31857/S0132342321040084

ВВЕДЕНИЕ

Как показывают результаты клинических исследований, активно развивающаяся фотодинамическая терапия (ФДТ) эффективна при лечении многих типов рака и различных незлокачественных образований [1–8]. ФДТ основана на местном или системном применении фотосенсибилизатора (ФС) – соединения, которое накапливается в опухоли и при локальном облучении светом соответствующей длины волны продуцирует активные формы кислорода, приводящие к селективному разрушению опухолевых клеток [3, 9]. Преимущественное накопление ФС в опухоли дает возможность избирательно повреждать злокачественные новообразования с минимальным воздействием на окружающие здоровые ткани, а также позволяет сочетать лечение с диагностикой на основе флуоресценции ФС [4].

В качестве ФС могут выступать различные соединения: порфирины и их аналоги, ксантеновые, тиазиновые, ксазиновые, полициклохиноновые и триарилметановые красители, а также некоторые флуоресцирующие белки [6, 10]. Про-

Сокращения: ДМСО – диметисульфоксид; ДИПЭА – диизопропилэтиламин; ЛСКМ – лазерная сканирующая конфокальная микроскопия; ФС – фотосенсибилизатор; ФДТ – фотодинамическая терапия; ЭР – эндоплазматический ретикулум; CrEL – Кремофор EL; LTG – LysoTracker Green; Rh123 – родамин 123; TOG488 – конъюгат трансферрина с красителем Oregon Green 488.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (495) 336-64-55; эл. почта: avfeofanov@yandex.ru).

изводные порфиринов – наиболее многочисленная группа соединений, используемых для ФДТ. Производные природных порфиринов, хлорины и бактериохлорины, обладают интенсивным поглощением, соответственно, в дальней красной и ближней инфракрасной спектральных областях. Свет с этими длинами волн глубже проникает в биологические ткани, что обеспечивает более эффективное фотодинамическое воздействие на большие или глубоко расположенные злокачественные новообразования [11].

Совершенствование ФДТ требует разработки улучшенных по свойствам и эффективности ФС. При разработке новых ФС важное значение имеют их нацеленность на опухолевые клетки (так называемая таргетность), высокое внутриклеточное накопление и оптимальная внутриклеточная локализация [8]. Внутриклеточная локализация ФС сложным образом зависит от его структуры, гидрофобности/полярности, присутствия в составе молекулы заряженных групп и их количества, распределения и знака заряда, а также наличия заместителей, влияющих на сродство ФС к определенным клеточным органеллам. В зависимости от структуры ФС на основе порфиринов могут накапливаться в цитоплазме в липидных каплях, эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), аппарате Гольджи, лизосомах или митохондриях [12–17]. Поскольку фотоиндуцированные АФК обладают высокой реакционной способностью, а следовательно, и короткими временами жизни, то органеллы с преимущественным накоплением ФС выступают первичными мишенями фотодинамического воздействия, а их повреждение определяет механизмы развития фотоиндуцированной цитотоксичности.

Митохондрии считаются предпочтительной внутриклеточной мишенью для накопления ФС [14, 17]. ФС, нацеленные на митохондрии, могут снижать потенциал митохондриальной мембраны, ингибировать клеточное дыхание и окислительное фосфорилирование, высвобождать цитохром *c* и другие проапоптотические белки в цитоплазму, активируя апоптоз [18–20]. При накоплении ФС в лизосомах световое воздействие может разрушать лизосомы, вызывая диффузию ФС в цитоплазму [14]. В результате повреждения лизосом происходит утечка гидролитических ферментов [21–24]. В этом случае фотодинамическое воздействие приводит к клеточному апоптозу или некрозу, в зависимости от интенсивности светового воздействия и активности освобожденных из поврежденных лизосом протеолитических ферментов [19]. Установлено, что эффективность фотоцитотоксического действия ФС, локализованных в лизосомах, при сходных средних концентрациях в клетках заметно ниже, чем у ФС, накапливающихся в митохондриях и других органеллах [14, 18, 21].

Таким образом, определение внутриклеточной локализации ФС важно для понимания эффективности и механизмов его действия при ФДТ.

Недавно в работе Gao et al. [25] при изучении нового эффективного ФС, диметилового эфира 13^1-[2-(гуанидинил)этиламино]хлорина e_6 (соединение (**II**), рис. 1), был сделан вывод о том, что введение гуанидинового заместителя улучшает “нацеливание” соединения (**II**) в митохондрии. В то же время исследуемое нами аналогичное производное хлорина e6, но с 2-(гуанидинил)бутиламино-заместителем в положении 13^1 характеризуется преимущественным накоплением в лизосомах (данные не представлены). Возможность внутриклеточного перенацеливания за счет небольшого изменения структуры заместителя представляет интерес для направленного дизайна ФС с заданными характеристиками, но заявленные в работе Gao et al. [25] свойства соединения (**II**) вызвали у нас сомнения. Мы синтезировали соединение (**II**) для уточнения его свойств и изучили локализацию в клетках аденокарциномы легкого человека A549, как и в работе Gao et al. [25]. Установлено, что соединение (**II**) не обладает митохондриальной локализацией, а накапливается преимущественно в лизосомах клеток A549. Выявлено фотоиндуцированное разрушение лизосом с сопутствующим перераспределением соединения (**II**) в клетках, которое выступает первичным механизмом фотоцитотоксического действия соединения (**II**), а также источником ошибок при исследовании внутриклеточной локализации соединения (**II**) и подобных ему ФС. Обнаруженные морфологические признаки развития параптоза указывают на фотодинамическое повреждение ЭР как на вторичный механизм фотоцитотоксического действия соединения (**II**), развивающийся после его высвобождения из лизосом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез диметилового эфира 13^1-[2-(гуанидинил)этиламино]хлорина e_6 (соединение (II)). Для получения соединения (**II**) в качестве стартового соединения был использован аминоэтиламид метилового эфира феофорбида *a* (соединение (**I**)). Синтез соединения (**II**) осуществляли действием на исходное соединение (**I**) пиразол-1*H*-карбоксиамидина (рис. 1). Полученное соединение (**II**) было выделено с помощью препаративной ТСХ, а его структура доказана методами ЯМР-спектроскопии (^{1}H и ^{13}C) и масс-спектрометрии (MALDI).

Внутриклеточная локализация соединения (II). Исследуемое соединение (**II**) (рис. 1) – гидрофобное, поэтому в качестве его солюбилизатора была выбрана эмульсия полиэтоксилированного касторового масла – Кремофора EL (CrEL), кото-

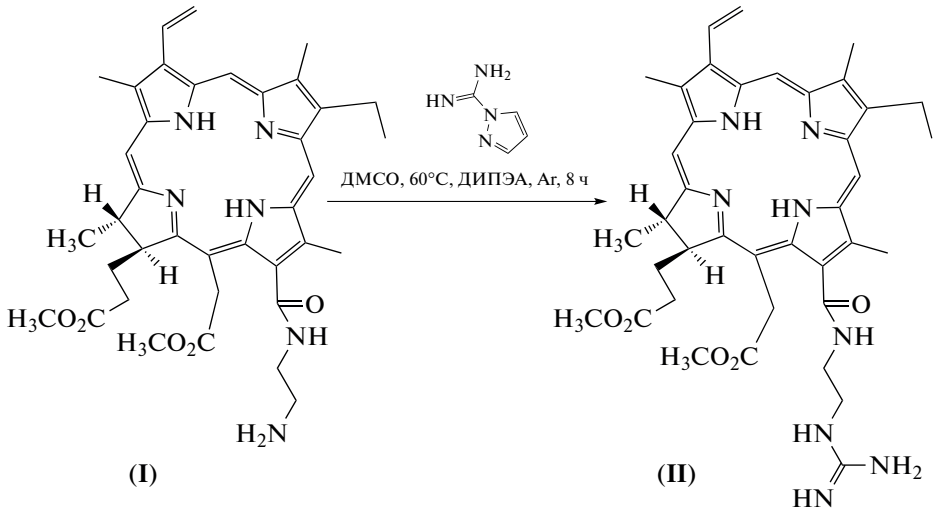


Рис. 1. Схема синтеза гуанидинового производного метилового эфира аминоэтиламида феофорбида *a* (соединение (**II**)).

рая стабилизирует мономерную форму тетрапиррольных соединений в водных растворах, и ее использование разрешено в клинической практике [15, 16, 24, 26, 27]. Методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (ЛСКМ) установлено, что соединение (**II**) проникает в клетки аденокарциномы легкого человека A549 и накапливается в цитоплазматической области с преимущественным гранулярным распределением (рис. 2, колонка 1). Соединение (**II**) не накапливается в цитоплазматической мембране клетки и не проникает в ядро (рис. 2, колонка 1).

Для идентификации клеточных структур, накапливающих соединение (**II**), были проведены исследования с использованием флуоресцентных зондов клеточных органелл: LysoTracker Green (LTG), родамина 123 (Rh123) и конъюгата трансферрина с красителем Oregon Green 488 (TOG488), окрашивающих, соответственно, лизосомы, митохондрии и эндосомы, содержащие рецептор трансферрина.

Исследования, выполненные методом ЛСКМ, выявили, что наблюдаемое в клетках гранулярное распределение соединения (**II**) отражает его преимущественное накопление в лизосомах (рис. 2, ряд А) и менее выраженное – в эндосомах (рис. 2, ряд Б). Коэффициент солокализации соединения (**II**) с лизосомами составляет 0.7 ± 0.2, а с эндосомами – 0.4 ± 0.1. В митохондриях клеток A549 соединение (**II**) не накапливается (рис. 2, ряд В). Коэффициент солокализации соединения (**II**) с митохондриями не превышает 0.012 ± 0.002. Данная внутриклеточная локализация сохранялась в широком диапазоне концентраций соединения (**II**) (0.25–2 мкМ), с которыми инкубировали клетки, и ее характер не зависел от времени инкубации клеток с соединением (**II**) в диапазоне 1–4 ч.

В то же время при увеличении концентрации соединения (**II**) до 8–10 мкМ на изображениях, полученных методом ЛСКМ, наблюдали преимущественно диффузное внутриклеточное распределение этого соединения с незначительным количеством гранул, отличных от митохондрий (рис. 3). Наблюдавшееся концентрационно-зависимое изменение внутриклеточного распределения соединения (**II**), по-видимому, связано с фотоиндуцированным повреждением лизосом в процессе измерения изображений клеток методом ЛСКМ при высоких внутриклеточных концентрациях фотосенсибилизатора (**II**). Разрушение лизосом сопровождается вытеканием соединения (**II**) и его равномерным распределением по цитоплазме. При этом в областях расположения митохондрий не обнаружено увеличения флуоресценции соединения (**II**), которое могло бы указывать на усиленное связывание соединения (**II**) с митохондриями (рис. 3*б*, 3*в*). В то же время митохондрии в клетках меняют свою морфологию, приобретая округлую форму вместо вытянутой (рис. 3*а*, колонка 2), что подтверждает развитие фотоцитотоксического эффекта и косвенно указывает на деполяризацию мембраны митохондрий.

В условиях, когда соединение (**II**) почти равномерно распределено по цитоплазме клетки, делать заключение о его преимущественной локализации в каких-либо клеточных органеллах не представляется корректным.

Внутриклеточное распределение соединения (II) после фотодинамического воздействия на клетки. Для проверки гипотезы о светоиндуцированном перераспределении соединения (**II**) из лизосом в

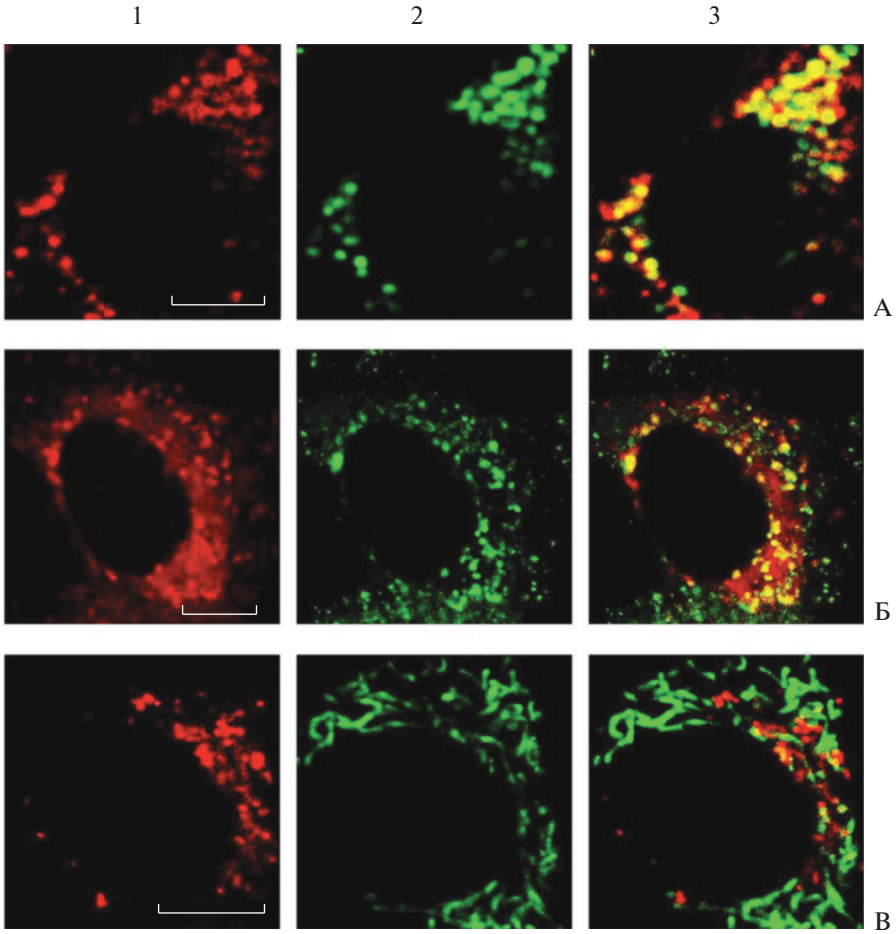


Рис. 2. Определение клеточных органелл, в которых происходит преимущественное накопление соединения (**II**), методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Клетки аденокарциномы легкого человека A549 инкубировали с 0.5 мкМ соединения (**II**) в течение 2 ч. Колонка 1 – внутриклеточное распределение соединения (**II**). Колонка 2 – внутриклеточное распределение селективных зондов клеточных органелл: LTG, окрашивающих лизосомы (панель 2А); TOG488, окрашивающих эндосомы (панель 2Б); Rh123, окрашивающих митохондрии (панель 2В). Колонка 3 – наложение изображений 1 и 2, желтый цвет указывает на солокализацию соединения (**II**) с селективным зондом. Масштабный отрезок – 5 мкм.

цитоплазму было исследовано внутриклеточное распределение соединения (**II**) после облучения светом клеток A549, прединкубированных с этим соединением в низкой концентрации (0.3 мкМ). Установлено, что световое облучение клеток, содержащих соединение (**II**), приводит к значительному уменьшению количества лизосом, в которых исходно накапливается соединение (**II**) (рис. 4), а цитоплазматическое распределение соединения (**II**) становится практически однородным (рис. 4, панель 1Б), как и в случае, представленном на рис. 3. Это указывает на фотоиндуцированное повреждение лизосом, содержащих соединение (**II**), и высвобождение соединения в цитоплазму. Отметим, что распределение флуоресцентного зонда лизосом LTG также становится диффузным, свидетельствуя об отсутствии интактных везикул с пониженным внутренним pH.

Учитывая гидрофобный характер соединения (**II**) и его агрегацию в полярном окружении с полным тушением флуоресценции, наблюдаемое диффузное распределение должно формироваться в результате связывания соединения (**II**) с мембранными структурами клетки, среди которых могут быть мембраны ЭР, аппарата Гольджи и митохондрий.

Полученный результат свидетельствует о том, что диффузное распределение соединения (**II**) в цитоплазме клеток следует рассматривать как результат фотодинамического воздействия на клетки, в которых исходно соединение (**II**) было локализовано преимущественно в лизосомах. Подчеркнем, что фотоиндуцированное диффузное распределение соединения (**II**) в клетках может возникать и в процессе сканирования клеток лазером при исследованиях методом ЛСКМ (рис. 3).

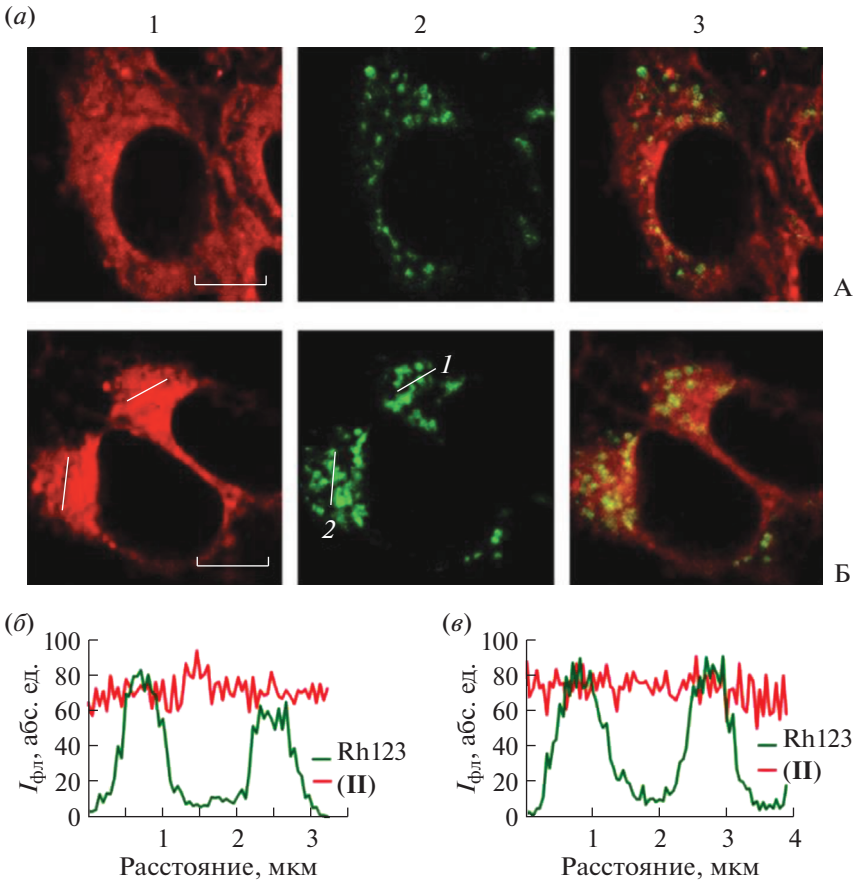


Рис. 3. (*а*) – Изображения клеток аденокарциномы легкого человека A549, полученные методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Клетки A549 инкубировали с 8 мкМ (ряд А) или 10 мкМ (ряд Б) соединения (**II**) в течение 2 ч. За 10 мин до окончания инкубации к клеткам добавляли Rh123 в концентрации 50 мкг/л. Показано внутриклеточное распределение соединения (**II**) (колонка 1) и Rh123, флуоресцентного маркера митохондрий (колонка 2). Колонка 3 – наложение изображений из колонок 1 и 2. Масштабный отрезок – 5 мкм. Диффузное распределение соединения (**II**) при высокой концентрации вызвано светоиндуцированным разрушением лизосом и высвобождением из них соединения (**II**) в процессе измерения изображений; (*б*, *в*) – профили распределения интенсивностей флуоресценции соединения (**II**) и Rh123 вдоль отмеченных на панели 2Б линий *1* (*б*) и *2* (*в*).

Однако оно не отражает исходной картины накопления соединения (**II**) в клетках и не указывает на первичные клеточные мишени, которые определяют механизм, лежащий в основе фотоцитотоксичности соединения (**II**).

Спустя несколько десятков минут после облучения клеток с соединением (**II**) в цитоплазме клеток было обнаружено образование многочисленных крупных вакуолей и перераспределение соединения (**II**). В этих условиях наблюдалось концентрирование соединения (**II**) в цитоплазматической и ядерной мембранах, в мембранах, ограничивающих образовавшиеся вакуоли, а также в лизосомах, которые, по-видимому, вновь начинали формироваться в поврежденных фотодинамическим воздействием, но еще живых клетках (рис. 4, ряд В).

Формирование большого числа крупных вакуолей в цитоплазме без образования пузырей на плазматической мембране, сжатия клеток и фрагментации ядра – характеристичный признак развития запрограммированной гибели клеток по механизму параптоза [28–30]. Опубликованные данные свидетельствуют о том, что при ФДТ параптоз активируется в результате интенсивного фотодинамического повреждения ЭР, что в свою очередь подразумевает связывание ФС с мембранами ЭР [29, 30]. Можно заключить, что вторичная мишень соединения (**II**), определяющая дальнейшее развитие фотоцитотоксического эффекта – мембраны ЭР, доступ к которым соединение (**II**) получает после фотоиндуцированного высвобождения из лизосом.

Соединение (II) нацелено в митохондрии или в лизосомы? Полученные нами данные о преимущественно лизосомальном накоплении соединения (**II**) в клетках A549 и отсутствии накопления в митохондриях противоречат выводам работы

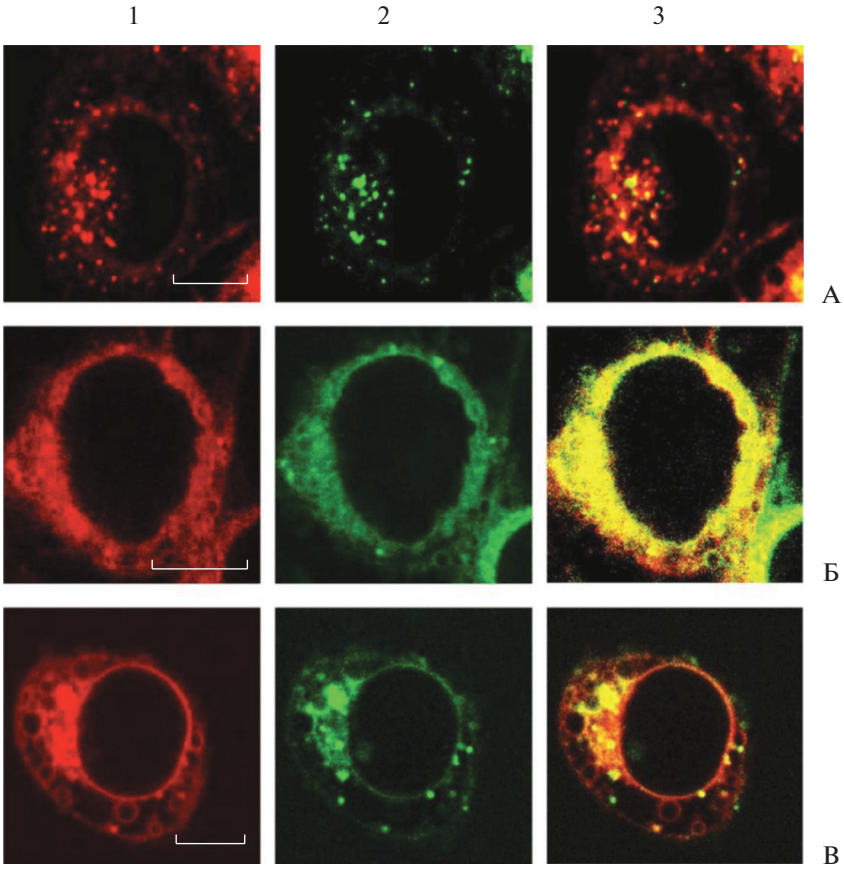


Рис. 4. Изображения клеток аденокарциномы легкого человека A549, полученные методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Клетки A549 инкубировали с 0.3 мкМ соединения (**II**) в течение 2 ч (ряд А), после чего облучали галогенной лампой (световая доза 20 Дж/см^2) (ряды Б, В). За 40 мин до окончания инкубации клеток с соединением (**II**) (ряды А, Б) или после облучения клеток (ряд В) к клеткам добавляли LTG в концентрации 50 нМ. Показано внутриклеточное распределение соединения (**II**) (колонка 1) и LTG, флуоресцентного маркера лизосом (колонка 2), без облучения (ряд А), сразу после облучения (ряд Б) и через 40 мин после облучения (ряд В). Колонка 3 – наложение изображений из колонок 1 и 2. Масштабный отрезок – 5 мкм.

Gao et al. [25] о нацеливании соединения (**II**) в митохондрии за счет введения гуанидинового заместителя. Причина этого противоречия, по-видимому, – ошибка авторов работы Gao et al. [25], допущенная при анализе внутриклеточной локализации соединения (**II**). Внутриклеточное распределение соединения (**II**) на изображениях, представленных в статье Gao et al. [25], имеет диффузный характер, очень схожий с тем, что наблюдается после облучения клеток (рис. 4, панель 1В), а также при очень высоких концентрациях соединения (**II**), когда происходит его фотоиндуцированное перераспределение в процессе сканирования лазерным лучом под микроскопом (рис. 3). При этом выводы о солокализации соединения (**II**) с клеточными органеллами сделаны в статье Gao et al. [25] на основе нетипичных диффузных внутриклеточных распределений флуоресцентных зондов клеточных органелл MitoTracker Green и LysoTracker Blue. Очевидно, что некорректно делать выводы о солокализации с клеточными органеллами в отсутствие характеристичной картины их окрашивания: гранулярной для лизосом, нитевидной или гранулярной, соответственно, для активных или деполяризованных митохондрий.

Существует мнение, что введение положительно заряженного заместителя в гидрофобный ФС способствует его накоплению в митохондриях [18]. Однако результаты, представленные в настоящей работе, и данные опубликованных исследований свидетельствуют о том, что такого рода модификация ФС во многих случаях не приводит к нацеливанию катионных ФС на митохондрии, и они накапливаются в лизосомах и других органеллах клетки, отличных от митохондрий [16, 21, 31–33].

Механизмы фотодинамического действия соединения (II). Хотя одинаковая концентрация ФС при накоплении в лизосомах дает заметно меньшую фотоцитотоксичность, чем при накоплении

ФС в ЭР, липидных каплях, аппарате Гольджи или в митохондриях [11, 17, 21], соединение (**II**), согласно работе Gao et al. [25], обладает высокой фотоиндуцированной цитотоксичностью, вызывая *in vitro* 50%-ную гибель клеток A549 при концентрации 0.545 мкМ (световая доза 2 Дж/см^2). Соединение (**II**) вызывает эффективное торможение роста перевиваемой опухоли A549 у мышей при дозе 0.15 мг/кг и полное прекращение ее роста при 0.4 мг/кг (световая доза 120 Дж/см^2) [25].

Наши исследования показали, что при первичном накоплении соединения (**II**) в лизосомах и эндосомах механизм фотоиндуцированной цитотоксичности – как минимум двухстадийный. На первой стадии облучение клеток светом вызывает фотодинамическое повреждение лизосом с выходом соединения (**II**) из лизосом в цитоплазму. Вместе с соединением (**II**) из поврежденных лизосом, очевидно, высвобождаются гидролитические ферменты, которые могут способствовать развитию апоптоза, расщепляя в цитоплазме белок Bid до проапоптозного продукта tBit [34, 35]. Признаки развития апоптоза после ФДТ с соединением (**II**) были обнаружены в срезах опухоли [25]. Разрушение лизосом, как полагают, затрудняет развитие аутофагии, которая может помогать клеткам бороться с повреждениями, вызванными ФДТ [30, 36].

На второй стадии соединение (**II**), получившее после выхода из лизосом доступ к новым мишеням в цитоплазме, вызывает каскад фотоиндуцированных повреждений, которые по морфологическим признакам приводят к развитию параптоза. Как отмечалось выше, мишенями гидрофобного соединения (**II**) в цитоплазме могут быть различные мембранные структуры, включая ЭР. Именно фотоиндуцированное повреждение ЭР, как полагают, запускает параптоз при ФДТ, способствуя гибели опухолевых клеток даже с блокированным развитием апоптоза [30].

Изменения, обнаруженные нами во внутриклеточной локализации соединения (**II**) при развитии пароптоза, выявили дополнительные потенциальные мишени его действия – плазматическую и ядерную мембраны, а также мембраны вакуолей. Эти мишени могут быть задействованы на третьей стадии фотоиндуцированного воздействия в случае быстрого развития параптоза в процессе облучения или при повторном сеансе облучения, проводимом с задержкой, для полноценного развития параптоза и соответствующих изменений в локализации соединения (**II**).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез метилового эфира аминоэтиламида феофорбида *a*. Соединение (**I**) получали по методике Gao et al. [25], действуя на исходный метиловый эфир феофорбида *a* избытком 1,2-диаминоэтана при добавлении основания диизопропилэтиламина (ДИПЭА).

Синтез диметилового эфира 13^1-[2-(гуанидинил)этиламино]хлорина e$_6$. К 70 мг аминоэтиламида метилового эфира феофорбида *a*, растворенного в 3 мл диметилсульфоксида (ДМСО), добавляли 130 мг пиразол-1*H*-карбоксиамидина и 15 мкл ДИПЭА для придания основности среде. Реакцию проводили в течение 8 ч при интенсивном перемешивании при 60°C в инертной среде аргона с обратным холодильником. Ход реакции контролировали спектрофотометрически и хроматографически. Из реакционной смеси целевой продукт выделяли при помощи жидкостной экстракции в системе дистиллированная вода/хлороформ. Экстракт сушили над безводным сульфатом натрия, а затем растворитель удаляли при пониженном давлении на роторном испарителе. Целевой продукт очищали от родственных примесей методом колоночной хроматографии, используя в качестве элюента смесь хлороформа и метилового спирта. Соединение было получено в количестве 54 мг. Выход составил 77%. Хроматографию в тонком слое осуществляли на пластинках Kieselgel 60 F254 (Merck, Германия) 20 × 20 мм с толщиной слоя сорбента 1 мм.

Масс-спектры получены на времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex (Bruker, Германия) методом матрично-активированной лазерной десорбции и ионизации (MALDI) с использованием в качестве матрицы дигидроксибензола. ЯМР регистрировали в дейтерохлороформе на спектрометре DPX-300 (Bruker, Германия) с рабочей частотой 300 МГц.

ЯМР-спектроскопия соединения (I). ^{1}H-ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$, δ, м.д., *J*, Гц): 9.67 (H, с, 10-H), 9.62 (H, с, 5-H), 8.82 (1H, с, 20-H), 8.04 (H, дд, *J* 17.8, 11.5, 3^1-H), 6.93 (H, т, *J* 5.2, 13^2 -NH), 6.30 (H, дд, *J* 17.8, 1.4, E-3^2-H), 6.08 (H, дд, *J* 11.5, 1.4, Z-3^2-H), 5.53 (H, д, *J* 18.9, 15-CH_2^a), 5.26 (H, д, *J* 18.9, 15-CH_2^b), 4.48 (H, м, 18-H), 4.36 (H, м, 17-H), 3.82 (2H, м, 8^1-CH_2), 3.77 (3H, с, 15^2-$COOCH_3$), 3.63 (3H, с, 12^1-CH_3), 3.49 (3H, с, 17^3-$COOCH_3$), 3.47 (3H, с, 2^1-CH_3), 3.48 (2H, м, 13^3-CH_2), 3.29 (3H, с, 7^1-CH_3), 2.71 (2H, м, 13^4-CH_2), 2.55 (H, м, 17^2-CH_2^a), 2.24 (H, м, 17^1-CH_2^a), 2.19 (H, м, 17^2-CH_2^b), 1.8 (H, м, 17^1-CH_2^b), 1.72 (3H, д, *J* 7.1, 18^1-CH_3), 1.69 (3H, т, *J* 7.6, 8^2-CH_3), –1.63 (H, шир.с, I-NH), –1.86 (H, шир.с, III-NH).

^{13}C-ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$, δ, м.д.): 174 (C, с, 15^2-C), 173.7 (C, с, 17^3-C), 169 (C, с, 13^1-C), 168.8 (C, с, 19-C), 166.7 (C, с, 16-C), 154 (C, с, 6-C), 149 (C, с, 9-C), 144.8 (C, с, 8-C), 138.8 (C, с, 2-C), 136 (C, с, 7-C), 135.2 (C, с, 4-C), 134.8 (C, с, 12-C), 134.6 (C, с, 14-C), 134,4 (C, с, 3-C), 130.1 (C, с, 11-C),

129.9 (C, c, 1-C), 129.2 (C, c, 3^1-C), 128.3 (C, c,13-C), 121.5 (C, c, 3^2-C), 102.3 (C, c, 15-C), 101.3 (C, c, 10-C), 98.8 (C, c, 5-C), 93.7 (C, c, 20-C), 53.2 (C, c, 17-C), 52.2 (C, c, 17^4-C), 49.3 (C, c, 18-C), 39.7 (C, c, 13^4-C), 37.7 (C, c, 15^1-C), 31.7 (C, c, 17^2-C), 31.3 (C, c, 17^1-C), 29.7 (C, c, 13^3-C), 23.1 (C, c, 18^1-C), 19.7 (C, c, 8^1-C), 17.9 (C, c, 8^2-C), 12.4 (C, c, 2^1-C), 11.9 (C, c, 12^1-C), 11.3 (C, c, 7^1-C)

ЯМР-спектроскопия соединения (II). ^{1}H-ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$, δ, м.д., *J*, Гц): 9.68 (H, c, 10-H), 9.63 (H, c, 5-H), 9.41 (3H, шир.c, 13^7-NH_2, 13^8-NH), 8.81 (H, c, 20-H), 8.07 (H, дд, *J* 17.8, 11.5, 3^1-H), 7.40 (H, м, 13^5-NH), 6.98 (H, т, *J* 5.2, 13^2-NH), 6.33 (H, дд, *J* 17.8,1.4, E-3^2-H), 6.11 (H, дд, *J* 11.5, 1.4, Z-3^2-H), 5.55 (H, д, *J* 18.9, 15-CH_2^a), 5.25 (H, д, *J* 18.9, 15-CH_2^b), 4.47 (H, м, 18-H), 4.35 (H, м, 17-H), 3.80 (2H, м, 8^1-CH_2), 3.79 (3H, c, 15^2-$COOCH_3$), 3.61 (3H, c, 12^1-CH_3), 3.54 (3H, c, 17^3-$COOCH_3$), 3.49 (3H, c, 2^1-CH_3), 3.48 (2H, м, 13^3-CH_2), 3.30 (3H, c, 7^1-CH_3), 2.78 (2H, м, 13^4-CH_2), 2.53 (H, м, 17^2-CH_2^a), 2.23 (H, м, 17^1-CH_2^a), 2.17 (H, м, 17^2-CH_2^b), 1.81 (H, м, 17^1-CH_2^b), 1.70 (3H, д, *J* 7.1, 18-CH_3), 1.62 (3H, т, *J* 7.6, 8^2-CH_3), −1.63 (H, шир.c, I-NH), −1.85 (H, шир.c, III-NH).

^{13}C-ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$, δ, м.д.): 173.8 (C, c, 15^2-C), 173.6 (C, c, 17^3-C), 168.9 (C, c, 13^1-C), 168.3 (C, c, 19-C), 167.1 (C, c, 16-C), 156.8 (C, c, 13^6-C), 153.7 (C, c, 6-C), 148.9 (C, c, 9-C), 144.6 (C, c, 8-C), 138.7 (C, c, 2-C), 135.9 (C, c, 7-C), 135.1 (C, c, 4-C), 134.3 (C, c, 12-C), 134.2 (C, c, 3-C), 129.9 (C, c, 11-C), 129.7 (C, c, 1-C), 128.5 (C, c, 31-C), 127.5 (C, c,13-C), 121.2 (C, c, 32-C), 102.1 (C, c, 15-C), 101.4 (C, c, 10-C), 98.6 (C, c, 5-C), 93.8 (C, c, 20-C), 53.1 (C, c, 17-C), 51.9 (C, c, 17^4-C), 49,3 (C, c, 18-C), 38.9 (C, c, 13^4-C), 37.4 (C, c, 15^1-C), 32.1 (C, c, 17^2-C), 31.3 (C, c, 17^1-C), 29.6 (C, c, 13^3-C), 23.8 (C, c, 18^1-C), 19.4 (C, c, 8^1-C), 17.8 (C, c, 8^2-C), 11.9 (C, c, 2^1-C), 11.3 (C, c, 12^1-C), 10.9 (C, c, 7^1-C).

Масс-спектрометрия соединения (II). MALDI, *m/z*: 709.0 (M^+).

Реагенты. В экспериментах использовали фосфатно-солевой буфер (pH 7.4), глутамин и среду DMEM/F12 (ПанЭко, Россия); эмбриональную телячью сыворотку HyClone defined (GE Healthcare Life Sciences, США); CrEL и Rh123 (Sigma, США); LTG и TOG488 (Invitrogen, США).

Стоковый раствор соединения (**II**) с концентрацией 1 мМ готовили втиранием сухой навески в CrEL с дальнейшим доведением фосфатным буфером (pH 7.4) до конечного объема. Концентрация CrEL в стоковом растворе составила 5%.

Эксперименты на культуре клеток A549. Клетки аденокарциномы легкого человека A549 (получены из коллекции клеток Института вирусологии им. Д.И. Ивановского) выращивали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 2 мМ глутамина. Пересевы клеток проводили 2 раза в неделю. Клетки на логарифмической фазе роста отсевали на покровные стекла в 24-луночные планшеты в концентрации 5×10^5 клеток на лунку и выращивали сутки при 37°C, 5% CO_2.

В экспериментах по изучению внутриклеточной локализации соединения (**II**) клетки инкубировали с исследуемым соединением (0.25–10 мкМ) в течение 1–4 ч с внесением в среду в конце инкубации одного из флуоресцентных зондов: LTG (50 нМ, 40 мин), TOG488 (50 мкг/мл, 30 мин) или Rh123 (50 мкг/л, 10 мин).

При исследовании внутриклеточного распределения соединения (**II**) после фотодинамического воздействия клетки A549 инкубировали с 0.3 мкМ соединения (**II**) в течение 2 ч. Далее клетки облучали 15 мин с помощью галогеновой лампы (500 Вт) через водный фильтр толщиной 5 см и широкополосный фильтр КС-13 с пропусканием 660–1000 нм. Плотность мощности света составляла 10–12 мВт/см^2 (световая доза 20 Дж/см^2). Флуоресцентный маркер лизосом LTG добавляли к клеткам в концентрации 50 нМ либо за 40 мин до облучения клеток, либо сразу после облучения. Внутриклеточное распределение соединения (**II**) анализировали методом ЛСКМ сразу после облучения клеток и через 40 мин.

Внутриклеточное распределение соединения (**II**) и его солокализацию с клеточными органеллами изучали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leica-SP2 (Leica, Германия). Конфокальные флуоресцентные изображения были получены с использованием водно-иммерсионного объектива 63×/1.2 HCX PL APO с латеральным и аксиальным разрешением 0.25 и 0.7 мкм соответственно. Флуоресценцию соединения (**II**) возбуждали лазером с длиной волны 633 нм и регистрировали в диапазоне 650–800 нм. Флуоресценцию красителей LTG, TOG488 и Rh123 возбуждали лазером с длиной волны 488 нм и регистрировали в диапазоне 500–600 нм. В контрольных экспериментах подтверждено, что при используемых параметрах измерений сигнал флуоресценции красителей LTG, TOG488 и Rh123 в спектральной области 650–800 нм (диапазон измерения флуоресценции соединения (**II**)) не регистрируется. Для оценки солокализации соединения (**II**) с органеллами полученные изображения распределения соединения (**II**) и флуоресцентного зонда органелл совмещали в программе ImageJ (National Institute of Health, США), а также рассчитывали коэффициенты солокализации, используя встроенную функцию этой программы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что высокая фотоиндуцированная цитотоксичность соединения (**II**) для раковых клеток *in vitro* и *in vivo* [25] определяется воздействием на несколько внутриклеточных мишеней, доступ к которым меняется в процессе облучения клеток светом. Преимущественное накопление соединения (**II**) в лизосомах и частично в эндосомах создает основу для повреждения этих везикул на начальном этапе фотодинамического воздействия, которое сопровождается неизбирательным внутриклеточным перераспределением соединения (**II**) в различные мембранные структуры. Эти структуры становятся следующими мишенями для фотосенсибилизатора (**II**), а их повреждение (в первую очередь, по-видимому, повреждение мембран ЭР) по выявленным признакам вызывает развитие параптоза. При этом наблюдается усиленное накопление соединения (**II**) в мембранах образующихся вакуолей, в ядерной и цитоплазматической мембранах и в лизосомах, которые в свою очередь становятся предпочтительными мишенями усиленного фотодинамического воздействия.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-04-00854).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания проведенных кем-либо из авторов данной статьи экспериментов с привлечением людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Allison R.R.* // Future Oncol. 2014. V. 10. P. 123–124. https://doi.org/10.2217/fon.13.176
2. *Rkein A.M., Ozog D.M.* // Dermatol. Clin. 2014. V. 32. P. 415–425. https://doi.org/10.1016/j.det.2014.03.009
3. *Abrahamse H., Hamblin M.R.* // Biochem. J. 2016. V. 473. P. 347–364. https://doi.org/10.1042/BJ20150942
4. *Rumyantseva V.D., Shchelkunova A.E., Gorshkova A.S., Alekseev Yu.V., Shilov I.P., Ivano A.V., Davydov E.V., Mironov A.F.* // Fine Chem. Technol. 2017. V. 12. P. 72–80. https://doi.org/10.32362/2410-6593-2017-12-2-72-80
5. *Allison R.R., Downie G.H., Cuenca R., Hu X.-H., Childs C.J.H., Sibata C.H.* // Photodiagn. Photodynam. Ther. 2004. V. 1. P. 27–42. https://doi.org/10.1016/S1572-1000(04)00007-9
6. *Chilakamarthi U., Giribabu L.*// Chem. Rec. 2017. V. 17. P. 775–802. https://doi.org/10.1002/tcr.201600121
7. *Truchuelo M.T., Perez B., Fernandez-Guarino M., Moreno C., Jaén-Olasolo P.* // J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2014. V. 28. P. 86–93. https://doi.org/10.1111/jdv.12064
8. *Gao M., Yu F., Lv C., Choo J., Chen L.* // Chem. Soc. Rev. 2017. V. 46. P. 2237–2271. https://doi.org/10.1039/c6cs00908e
9. *Shlapakova T.I., Kostin R.K., Tyagunova E.E.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 657–674. https://doi.org/10.1134/S1068162020050222
10. *Kwiatkowski S., Knap B., Przystupski D., Saczko J., Kędzierska E., Knap-Czop K., Kotlińska J., Michel O., Kotowski K., Kulbaska J.* // Biomed. Pharmacother. 2018. V. 106. P. 1098–1107. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049
11. *Nyman E.S., Hynninen P.H.* // Photochem. Photobiol. 2004. V. 73. P. 1–28. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2003.10.002
12. *Feofanov A., Sharonov G., Grichine A., Karmakova T., Pljutinskaya A., Lebedeva V., Ruziyev R., Yakubovskaya R., Mironov A., Refregier M., Maurizot J.-C., Vigny P.* // Photochem. Photobiol. 2004. V. 79. P. 172–188. https://doi.org/10.1562/0031-8655(2004)079<0172:csoppo>2.0.co;2
13. *Назарова А.И., Феофанов А.В., Кармакова Т.А., Шаронов Г.В., Плютинская А.Д., Якубовская Р.И., Лебедева В.С., Миронов А.Ф., Моризо Ж.-К., Вини П.* // Биоорг. химия. 2005. Т. 31. С. 535–548. [*Nazarova A.I., Feofanov A.V., Karmakova T.A., Sharonov G.V., Plyutinskaya A.D., Yakubovskaya R.I., Lebedeva V.S., Mironov A.F., Maurizot J.C., Vigny P.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2005. V. 31. P. 482–494.] https://doi.org/10.1007/s11171-005-0066-9
14. *Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R.* // Photodiagn. Photodynam. Ther. 2004. V. 1. P. 279–293. https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4
15. *Feofanov A., Grichine A., Karmakova T., Pljutinskaya A., Lebedeva V., Filyasova A., Yakubovskaya R., Mironov A., Egret-Charlier M., Vigny P.* // Photochem. Photobiol. 2002. V. 75. P. 633–643. https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)075<0633:nipboa>2.0.co;2
16. *Sharonov G.V., Karmakova T.A., Kassies R., Pljutinskaya A.D., Grin M.A., Refregiers M., Yakubovskaya R.I., Mironov A.F., Maurizot J.-C., Vigny P., Otto C., Feofanov A.V.* // Free Radic. Biol. Med. 2006. V. 40. P. 407–419. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.028
17. *Chiaviello A., Postiglione I., Palumbo G.* // Cancers. 2011. V. 3. P. 1014–1041. https://doi.org/10.3390/cancers3011014
18. *Dabrowski J.M., Arnaut L.G.* // Photochem. Photobiol. Sci. 2015. V. 14. P. 1765–1780. https://doi.org/10.1039/c5pp00132c
19. *Узденский А.Б.* // Биофизика. 2016. Т. 61. № 3. С. 547–557.
20. *Kessel D.* // J. Porphyr. Phthalocyan. 2004. V. 8. P. 1009–1014. https://doi.org/10.1142/S1088424604000374
21. *Nazarova A., Ignatova A., Feofanov A., Karmakova T., Pljutinskaya A., Mass O., Grin M., Yakubovskaya R., Mironov A., Maurizot J.-C.* // Photochem. Photobiol.

Sci. 2007. V. 6. P. 1184–1196.
https://doi.org/10.1039/b706921a

22. *Moan J., Berg K., Kvam E., Western A., Malik Z., Ruck A., Schneckenburger H.* // Ciba Found Symp. 1989. V. 146. P. 95–111.
https://doi.org/10.1002/9780470513842.ch7

23. *Гельфонд М.Л.* // Практическая онкология. 2007. Т. 8. № 4. С. 204–210.

24. *Efremenko A.V., Ignatova A.A., Grin M.A., Sivaev I.B., Mironov A.F., Bregadze V.I., Feofanov A.V.* // Photochem. Photobiol. Sci. 2014. V. 13. P. 92–102.
https://doi.org/10.1039/c3pp50226k

25. *Gao Y.-H., Lovreković V., Kussayeva A., Chen D.-Y., Margetić D., Chen Z.-L.* // Eur. J. Med. Chem. 2019. V. 177. P. 144–152.
https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.05.050

26. *Efremenko A.V., Ignatova A.A., Borsheva A.A., Grin M.A., Bregadze V.I., Sivaev I.B., Mironov A.F., Feofanov A.V.* // Photochem. Photobiol. Sci. 2012. V. 11. P. 645–652.
https://doi.org/10.1039/c2pp05237g

27. *Grin M.A., Reshetnikov R.I., Yakubovskay R.I., Plotnikova E.A., Morozova N.B., Tsigankov A.A., Efremenko A.V., Ermakova D.E., Feofanov A.V., Mironov A.F.* // J. Porphyr. Phthalocyan. 2014. V. 18. P. 129–138.
https://doi.org/10.1142/S1088424613501265

28. *Fontana F., Raimondi M., Marzagalli M., Di Domizio A., Limonta P.* // Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer. 2020. V. 1873. P. 188338.
https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188338

29. *Kessel D.* // Photochem. Photobiol. 2019. V. 95. P. 119–125.
https://doi.org/10.1111/php.12952

30. *Kessel D.* // Apoptosis. 2020. V. 25. P. 611–615.
https://doi.org/10.1007/s10495-020-01634-0

31. *Brilkina A.A., Dubasova L.V., Sergeeva E.A., Pospelov A.J., Shilyagina N.Y., Shakhova N.M., Balalaeva I.V.* // J. Photochem. Photobiol. B. 2019. V. 191. P. 128–134.
https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.12.020

32. *Kessel D., Luguya R., Vicente M.G.H.* // Photochem. Photobiol. 2003. V. 78. P. 431–435.
https://doi.org/10.1562/0031-8655(2003)078<0431:lapeot>2.0.co;2

33. *Carneiro J., Gonçalves A., Zhou Z., Griffin K.E., Kaufman N.E.M., Vicente M.G.H.* // Lasers Surg. Med. 2018. V. 50. P. 566–575.
https://doi.org/10.1002/lsm.22824

34. *Stoka V., Turk B., Schendel S.L., Kim T.H., Cirman T., Snipas S.J., Ellerby L.M., Bredesen D., Freeze H., Abrahamson M., Bromme D., Krajewski S., Reed J.C., Yin X.M., Turk V., Salvesen G.S.* // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 3149–3157.
https://doi.org/10.1074/jbc.M008944200

35. *Reiners J.J., Jr., Caruso J.A., Mathieu P., Chelladurai B., Yin X.M., Kessel D.* // Cell. Death Differ. 2002. V. 9. P. 934–944.
https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401048

36. *Kessel D., Vicente M.G., Reiners J.J., Jr.* // Lasers Surg. Med. 2006. V. 38. P. 482–488.
https://doi.org/10.1002/lsm.20334

Intracellular Localization and Mechanisms of Photodynamic Action of Dimethyl Ether of 13^1-[2-(Guanidinyl)Ethylamino]Chlorin e_6

A. V. Efremenko*, **, E. D. Dyakova*, ***, P. V. Ostroverkhov*, N. S. Kirin***, A. F. Mironov***, M. A. Grin***, and A. V. Feofanov*, **, #**

#Phone: +7 (495) 336-64-55; e-mail: avfeofanov@yandex.ru

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

***Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gori 1/20, Moscow, 119234 Russia*

****Institute of Fine Chemical Technology, Moscow Technological University (MIREA), prosp. Vernadskogo 86, Moscow, 119571 Russia*

It was found that the photosensitizer dimethyl ether of 13^1-[2-(guanidinyl)ethylamino]chlorin e_6 accumulates mainly in lysosomes, partially in endosomes, and does not accumulate in the mitochondria of human lung adenocarcinoma A549 cells. The primary photocytotoxic effect of the photosensitizer is associated with damage of lysosomes and its release in cytoplasm. In cytoplasm, a uniform distribution of the photosensitizer is formed in complexes with membrane structures that are secondary targets of its photoinduced action. Time-dependent morphological signs of paraptosis development were found, which indicate to photodynamic damage of endoplasmic reticulum as a secondary mechanism of photocytotoxic action of the photosensitizer. At this stage, there is another change in the potential cellular targets of the photosensitizer: it is concentrated in the cytoplasmic and nuclear membranes, in the membranes of numerous vacuoles, as well as in lysosomes, which, apparently, continue to form during the development of paroptosis. Thus, the studied derivative of chlorin e_6, as a representative of hydrophobic photosensitizers with intracellular targeting of lysosomes, has a two- or three-stage mechanism of photodynamic action with a sequential change in the cellular targets.

Keywords: photosensitizer, photodynamic therapy, intracellular localization, cell organelles, fluorophore, laser scanning confocal microscopy

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 5, с. 632–641

УДК 619:612.017+636.91

ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ КОНЪЮГАТОВ АНТИГЕНОВ БЦЖ И ДЕРИВАТОВ БЕТУЛИНА НА ИММУННЫЕ РЕАКЦИИ У МОРСКИХ СВИНОК

© 2021 г. И. Н. Кошкин*, В. С. Власенко,#, И. В. Кулаков*****

**Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, Россия, 644008 Омск, Институтская пл., 2*

***Омский аграрный научный центр, Россия, 644012 Омск, просп. Королева, 26*

****Институт химии, Тюменский государственный университет, Россия, 625003 Тюмень, ул. Перекопская, 15а*

Поступила в редакцию 14.10.2020 г.
После доработки 26.10.2020 г.
Принята к публикации 28.10.2020 г.

Представлены результаты оценки иммуностимулирующих свойств конъюгатов на основе антигенов вакцинного штамма БЦЖ с производными бетулина. Эксперименты проводили на морских свинках линии агути (n = 20). Животных опытных групп (n = 5) иммунизировали противотуберкулезными препаратами: 1-я группа – антигенами вакцинного штамма БЦЖ, конъюгированными с бетулиновой кислотой; 2-я группа – антигенами БЦЖ, конъюгированными с бетулоновой кислотой; 3-я группа – вакциной БЦЖ. Животным контрольной группы (n = 5) вводили физиологический раствор. На 30-е сут после введения противотуберкулезных препаратов всех животных инфицировали вирулентной культурой *Mycobacterium bovis* (штамм 8). Отбор проб крови для оценки иммунного статуса проводили на 30-е сут после введения препаратов и 30-е сут после инфицирования *M. bovis*. Установлено, что сконструированные конъюгаты оказывали иммуностимулирующее действие, которое характеризовалось увеличением в 1.7–3.8 раза числа иммунокомпетентных клеток, а также усилением функциональной активности нейтрофилов, наиболее выраженное у морских свинок 2-й группы. После инфицирования *M. bovis* такие ключевые параметры иммунной системы, как содержание Т-лимфоцитов и активность ферментной (миелопероксидаза) и неферментной (катионные белки) бактерицидных систем нейтрофильных гранулоцитов, были в значительной степени увеличены у морских свинок 2-й и 3-й групп, что свидетельствовало о наиболее высокой противотуберкулезной активности препаратов, введенных этим животным. Через 45 сут после инфицирования *M. bovis* морские свинки были подвергнуты эвтаназии. Последующие патологоанатомические исследования подтвердили, что конъюгат на основе вакцинного штамма с бетулоновой кислотой и вакцина БЦЖ индуцируют выраженную устойчивость к патогенным микобактериям. Создаваемый этими препаратами индекс защиты находился приблизительно на одном уровне и составил 66 и 71% соответственно.

Ключевые слова: бетулиновая кислота, бетулоновая кислота, вакцина БЦЖ, конъюгаты, туберкулез, морские свинки

DOI: 10.31857/S013234232104014X

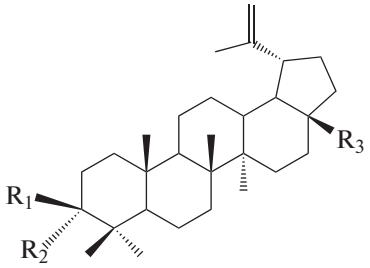
ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия все большее внимание исследователей привлекают природные биоактивные соединения. Одну из лидирующих позиций в ряду таких соединений занимает пентациклический тритерпеновый спирт бетулин (**I**) и его дериваты: бетулоновая (**II**) и бетулиновая (**III**) кислоты (схема 1), а также их производные [1]. Многочисленными зарубежными и российскими исследованиями доказана высокая биологическая активность бетулина, которая реализуется через ферментативные механизмы (воздействие на активность ферментов) и управляет количеством ферментов в клетке организма (путем их синтеза и распада). При выраженной биологической активности бетулин характеризуется полным отсутствием токсичности. К основным его свойствам относятся: гепатопротекторное, желчегонное, антилитогенное, антиоксидантное, противовоспалительное, противоопухолевое, проти-

Сокращения: БЦЖ – бацилла Кальметта–Герена (БЦЖ, BCG); НСТ-тест – тест с нитросиним тетразолием; СЦК МПО – средний цитохимический коэффициент активности миелопероксидазы; СЦК ЛКБ – средний цитохимический коэффициент содержания лизосомальных катионных белков.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (951) 408-34-21; эл. почта: vvs-76@list.ru).

вовирусное, иммуномодуляторное, гиполипидемическое, гастропротекторное, антисептическое, антимутагенное [2–4]. Помимо наличия разнообразной биологической активности, бетулин, так же как и другие лупановые тритерпеноиды, не обладает аллергенным, канцерогенным, кожнораздражающим, кумулятивным, мутагенным, сенсибилизирующим и эмбриотоксическим действием, имеет очень низкую токсичность (бетулин относится к IV классу опасности веществ, LD_{50} = = 9000 мг/кг) [1].



(**I**) R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = CH_2OH
(**II**) $R_1 + R_2$ = O, R_3 = COOH
(**III**) R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = COOH

Схема 1. Структурные формулы бетулина (**I**) и его дериватов: бетулоновой (**II**) и бетулиновой (**III**) кислот.

Бетулоновая кислота (**II**) – продукт окисления бетулина и важное соединение в синтезе высокоактивных тритерпенов лупанового ряда (в том числе бетулиновой кислоты) и их тритерпеноидов (например, аллобетулона).

Бетулиновая кислота (3β-гидрокси-луп-20(29)-ен-28-овая кислота) (**III**) привлекает в последнее десятилетие внимание многих исследователей в связи с обнаружением у нее ряда полезных биологических свойств. Так, бетулиновая кислота (**III**) обладает выраженной противоопухолевой активностью [2, 5] и противовоспалительными свойствами [6]. В 1994 г. была обнаружена анти-ВИЧ-активность бетулиновой кислоты [7, 8], что послужило мощным стимулом для синтеза ее производных.

Несмотря на множество публикаций по исследованиям активности бетулина и его дериватов (**II**), (**III**), сведения о каких-либо положительных результатах их применения в тестах *in vivo* практически отсутствуют.

Ранее в исследованиях на животных было показано положительное влияние бетулина на обмен веществ у собак [9], иммуностимулирующее воздействие на организм телят [10] и иммунную систему птиц [11]. Разработаны и испытаны в экспериментальных исследованиях различные схемы применения бетулина для повышения специфической и неспецифической резистентности цыплят-бройлеров при вакцинациях, изучено его влияние на обмен веществ и продуктивность [12]. В испытаниях авторы применяли в основном экстракт, содержащий ~70% бетулина.

Туберкулез крупного рогатого скота, несмотря на существенное снижение распространения, попрежнему – серьезная проблема. Для некоторых регионов разных стран мира инфекция все еще остается эндемичной [13–16], поэтому важность разработки эффективных и безопасных специфических препаратов для борьбы с этим заболеванием неоспорима.

К настоящему времени разработан ряд противотуберкулезных препаратов для крупного рогатого скота с новыми аттенуированными штаммами микобактерий, а также субъединичные вакцины [17, 18]. Развитие этого направления в основном сосредоточено на создании новых препаратов, способных заменить бациллу Кальметта–Герена (БЦЖ), а также бустерных вакцин, необходимых для усиления или пролонгации защитных эффектов БЦЖ и улучшения ее иммуногенности [19].

Из целого ряда концепций конструирования безопасных вакцин заслуживает внимание конъюгация иммуногенной фракции, выделенной из вакцинных бактерий, с матрицей, формирующей в организме животного депо специфического иммуногена. В системе иммунитета данный комплекс предположительно имитирует живую вакцину, а именно способствует накоплению значительного количества клеток иммунной памяти, которые в дальнейшем и обеспечивают защиту животного от возбудителя [20]. На основе такого принципа создания иммуногенов были сконструированы препараты из отдельных фракций разрушенной ультразвуком культуры БЦЖ, конъюгированной с целлюлозной матрицей, а также с синтетическими полиэлектролитами [21, 22].

Дальнейшее совершенствование изготовления специфических препаратов по этому принципу возможно с помощью поиска новых эффективных средств с адъювантными свойствами, способных повысить иммуногенность вакцин, а также снизить их токсичность. Из такого рода веществ особое внимание привлекает бетулин, содержащийся в экстракте бересты (внешней части коры березы). Некоторыми исследователями показана перспективность применения бетулина в качестве адъюванта вакцинных препаратов [23, 24].

Цель данной работы – изучение иммуностимулирующих свойств препаратов, изготовленных на основе антигенов вакцинного штамма БЦЖ и дериватов бетулина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Задачи исследования – выделение из бересты основного компонента – тритерпенового спирта

бетулина (**I**) и осуществление химической модификации до бетулоновой (**II**) и бетулиновой (**III**) кислот по описанным литературным методикам. На основе полученных бетулоновой (**II**) и бетулиновой (**III**) кислот в качестве корпускулярных адъювантов и антигенов вакцинного штамма БЦЖ мы получили соответствующие конъюгаты для последующего исследования, а также провели оценку реакций клеточного иммунитета на введение морским свинкам вновь сконструированных конъюгатов до и после экспериментального инфицирования животных вирулентной культурой *Mycobacterium bovis* (возбудитель туберкулеза у крупного рогатого скота).

Экстракция бетулина и синтез его дериватов. Способы извлечения бетулина из коры березы, растворители для экстракции, зависимость скорости извлечения бетулина от степени измельчения и других параметров широко обсуждены в литературе [1, 25].

Для выделения бетулина (**I**) применяли экстрагирование этанолом измельченной бересты в аппарате Сокслета (подробности приведены в “Эксперим. части”).

Необходимые для дальнейших испытаний дериваты бетулина – бетулоновая (**II**) и бетулиновая (**III**) кислоты – были получены из выделенного неочищенного бетулина по известным методикам [26–29]. Литературный поиск показал, что лучше всего идет окисление бетулина (схема 2) с применением в качестве окислителя реактива Джонса (раствор оксида хрома в серной кислоте) [28]. Температура плавления и спектральные характеристики полученной бетулоновой кислоты (**II**) совпали с литературными данными [28].

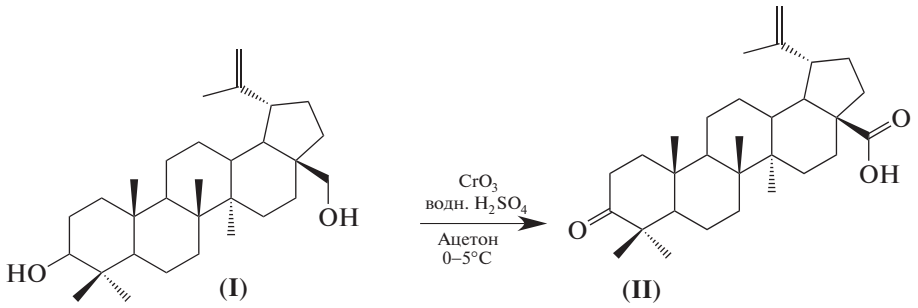


Схема 2. Окисление бетулина (**I**) до бетулоновой кислоты (**II**).

Имеющаяся в составе экстракта бетулина природная бетулиновая кислота (**III**) находится в примесных концентрациях (не более 1%), что создает огромные трудности в ее выделении и полноценном использовании. Более эффективный подход – получение кислоты (**III**) синтетическим способом из бетулина и далее бетулоновой кислоты (**II**). При этом значительно повышается суммарный выход бетулиновой кислоты с сохранением 3β-эпимера, характерного для биологически активного природного изомера бетулиновой кислоты.

Выходы при восстановлении бетулоновой кислоты (**II**) боргидридом натрия (схема 3) варьируются до 90%. При проведении восстановления в 2-пропаноле образуется небольшое количество 3α-эпимера (до 5%), который легко удаляется с помощью перекристаллизации [28].

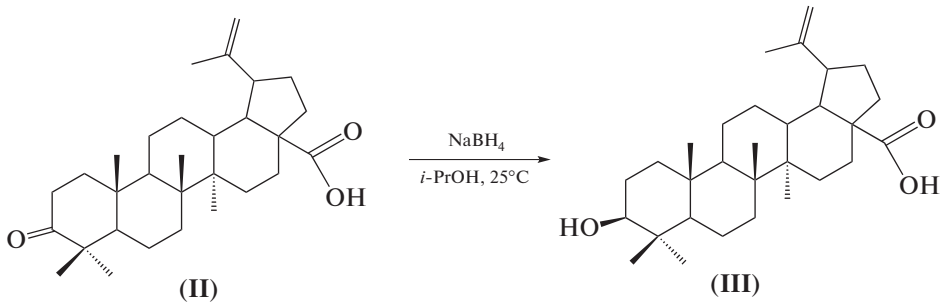


Схема 3. Восстановление бетулоновой кислоты (**II**) до бетулиновой кислоты (**III**).

Температура плавления и спектральные характеристики полученной бетулиновой кислоты (**III**) совпали с литературными данными [28].

Получение экспериментальных конъюгатов. Из вакцинного штамма БЦЖ получали антигенные комплексы, доводили в них концентрацию белка

Таблица 1. Иммунологические параметры крови морских свинок на 30-е сут после введения противотуберкулезных препаратов

Показатель	Контроль	Опытные группы		
		1-я группа (конъюгат антигенов БЦЖ с бетулиновой кислотой (**III**))	2-я группа (конъюгат антигенов БЦЖ с бетулоновой кислотой (**II**))	3-я группа (вакцина БЦЖ)
Лейкоциты, $\times 10^9$/л	6.60 ± 0.34	9.32 ± 1.05*	8.46 ± 0.62*	11.90 ± 0.94**
Лимфоциты, $\times 10^9$/л	4.14 ± 0.27	6.06 ± 0.71*	6.45 ± 0.46**	6.87 ± 0.72**
Нейтрофилы, $\times 10^9$/л	2.06 ± 0.15	3.03 ± 0.29*	1.71 ± 0.21	4.24 ± 0.49**
Т-лимфоциты, $\times 10^9$/л	0.68 ± 0.07	1.16 ± 0.17*	2.14 ± 0.26**	1.30 ± 0.22*
В-лимфоциты, $\times 10^9$/л	1.13 ± 0.15	2.26 ± 0.26**	1.92 ± 0.09**	1.45 ± 0.14
Цитотоксические Т-лимфоциты, $\times 10^9$/л	0.56 ± 0.13	1.54 ± 0.23**	2.14 ± 0.30**	1.67 ± 0.16**
НСТ-тест, спонт., ед. опт. пл.	0.73 ± 0.03	0.90 ± 0.07	0.59 ± 0.05*	0.78 ± 0.03
НСТ-тест, стимулир., ед. опт. пл.	0.95 ± 0.02	0.94 ± 0.05	1.11 ± 0.03**	1.00 ± 0.06
Функциональный резерв нейтрофилов, у.е.	1.31 ± 0.08	1.05 ± 0.03*	1.95 ± 0.24*	1.28 ± 0.10
СЦК ЛКБ, у.е.	1.08 ± 0.07	1.42 ± 0.12*	1.53 ± 0.04***	0.97 ± 0.03
СЦК МПО, у.е.	0.72 ± 0.07	0.90 ± 0.09	0.97 ± 0.08	0.79 ± 0.09

* $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. Обозначения: НСТ-тест – тест с нитросиним тетразолием; СЦК ЛКБ – средний цитохимический коэффициент содержания лизосомальных катионных белков, СЦК МПО – средний цитохимический коэффициент активности миелопероксидазы. Данные приведены в виде средних значений ± s.d.

до 1000 мкг/мл, затем добавляли бетулоновую кислоту (**II**) из расчета 500 мкг/мл и размешивали смесь до полного растворения при комнатной температуре. По аналогичной схеме получали конъюгат антигенов БЦЖ с бетулиновой кислотой (**III**).

Иммунные реакции на введение экспериментальных конъюгатов морским свинкам. Оценку иммуностимулирующих свойств конъюгатов антигенов вакцинного штамма БЦЖ с производными бетулина проводили на морских свинках линии агути ($n = 20$). Животных опытных групп ($n = 5$) иммунизировали противотуберкулезными препаратами: 1-я группа – антигенами вакцинного штамма БЦЖ, конъюгированными с бетулиновой кислотой (**III**); 2-я группа – антигенами БЦЖ, конъюгированными с бетулоновой кислотой (**II**); 3-я группа – вакциной БЦЖ. Животным контрольной группы ($n = 5$) вводили физиологический раствор.

На 29-е сут после иммунизации противотуберкулезными препаратами животным внутрикожно вводили туберкулин. Аллергическая реакция развивалась только у морских свинок, иммунизированных вакциной БЦЖ; диаметр припухлости кожи составил 8.8 ± 1.2 мм.

Через 30 сут после введения противотуберкулезных препаратов проводили отбор проб крови для оценки иммунных реакций: определения числа иммунокомпетентных клеток в абсолютном содержании ($\times 10^9$/л) и функциональной активности нейтрофилов, включающей оценку кислород-зависимых (тест с нитросиним тетразолием, определение миелопероксидазы) и кислород-независимых (содержание лизосомально-катионных белков) механизмов бактерицидной системы. Описание иммунного статуса животных опытных групп проводили в сравнении с особями контрольной группы.

Анализ параметров иммунной системы на 30-е сут после введения противотуберкулезных препаратов (табл. 1) показал, что у морских свинок всех опытных групп наблюдалось достоверное увеличение числа лейкоцитов. Так, относительно контрольной группы концентрация белых клеток крови у животных, вакцинированных БЦЖ, возросла на 80%, а после обработки комплексом антигенов БЦЖ с кислотами (**II**) и (**III**) – на 28.2 и 41.2% соответственно.

Идентичные изменения показателей отмечены в абсолютном содержании лимфоцитов. Средние значения этого параметра у животных опытных групп были увеличены относительно контрольной группы на 46–56% ($p < 0.05$). Кроме того, наблюдалось достоверное повышение концентрации нейтрофилов у морских свинок, иммунизированных БЦЖ и конъюгатом антигенов БЦЖ с кислотой (**III**) – в 2.1 раза ($p < 0.01$) и

1.5 раза ($p < 0.05$) соответственно. Следует отметить, что после введения конъюгата антигенов БЦЖ с кислотой (**II**), напротив, прослеживалась тенденция к некоторому снижению количества нейтрофилов.

Рост числа лимфоидных клеток происходил за счет всех популяций. Так, по сравнению с контролем в группе животных, иммунизированных конъюгатами антигенов БЦЖ с кислотами (**II**) и (**III**), концентрация Т-лимфоцитов возросла с высокой степенью достоверности в 3.1 и 1.7 раза, В-лимфоцитов – в 1.7 и 2 раза, цитотоксических Т-лимфоцитов – в 3.8 и 2.8 раза соответственно. Вакцинация БЦЖ также способствовала пролиферации иммунокомпетентных клеток, особенно это касалось Т-лимфоцитов и цитотоксических Т-лимфоцитов.

Действие противотуберкулезных препаратов на генерацию активных форм кислорода, в том числе перекиси водорода, носило преимущественно стимулирующий характер, хотя оно не оказывало статистически значимого влияния на показатели тетразолиевой (НСТ-тест) и пероксидазной активности (СЦК МПО). Исключения – особи, иммунизированные конъюгатом антигенов БЦЖ с кислотой (**II**), у которых отмечалось достоверное снижение спонтанной на 19.2% ($p < 0.05$) и повышение индуцированной НСТ-активности на 16.8% ($p < 0.01$) относительно контрольной группы. Вследствие таких изменений у животных 2-й группы также был существенно увеличен функциональный резерв нейтрофилов (на 48.9%), отражающий эффекторный потенциал системы фагоцитоза. В то же время у морских свинок, иммунизированных конъюгатом антигенов БЦЖ с кислотой (**III**), резервная активность нейтрофилов, напротив, была снижена на 19.8% ($p < 0.05$), а у животных, иммунизированных БЦЖ, находилась приблизительно на одном уровне с контрольной группой.

Неодинаковую тенденцию изменений наблюдали при исследовании другого важного компонента микробицидной системы лейкоцитов – катионных белков. В частности, с помощью цитохимического коэффициента выявлены следующие отличия: введение вакцины БЦЖ сопровождалось незначительным снижением активности катионных белков, тогда как иммунизация конъюгатами на основе антигенов БЦЖ с кислотами (**II**) и (**III**) – существенным увеличением относительно контроля: их уровень вырос, соответственно, в 1.4 и 1.3 раза относительно контрольной группы животных.

Таким образом, введение морским свинкам изучаемых противотуберкулезных препаратов – конъюгатов на основе антигенов БЦЖ с кислотами (**II**), (**III**) и вакцины БЦЖ – оказывало иммуностимулирующее действие, которое проявлялось в увеличении числа иммунокомпетентных клеток, а также усилении функциональной активности нейтрофилов разной степени выраженности.

Иммунные реакции на инфицирование *M. bovis* морских свинок, иммунизированных экспериментальными конъюгатами. На 30-е сут после иммунизации противотуберкулезными препаратами животных контрольной и опытных групп инфицировали вирулентной культурой *M. bovis* (штамм 8).

На 29-е сут после инфицирования животным внутрикожно вводили туберкулин. Наиболее выраженное образование припухлости кожи отмечено у морских свинок контрольной группы – диаметром 9.2 ± 0.58 мм, затем у иммунизированных БЦЖ – 7.0 ± 1.3 мм. Интенсивность кожной реакции у животных, иммунизированных конъюгатами антигенов БЦЖ с кислотами (**II**) и (**III**), была ниже – диаметр припухлости кожи составил, соответственно, 5.4 ± 1.53 и 5.6 ± 0.6 мм.

Через 30 сут после инфицирования *M. bovis* у морских свинок проводили отбор проб крови для оценки иммунных реакций по тем же показателям, которые были использованы в предыдущий срок исследования (табл. 2).

Иммунологическая перестройка на 30-е сут после инфицирования *M. bovis* у морских свинок, иммунизированных конъюгатами на основе антигенов БЦЖ с кислотами (**II**) и (**III**), сопровождалась снижением числа лейкоцитов, соответственно, на 35.6 и 33.6% ($p < 0.001$), лимфоцитов – на 39.8 и 36.9% ($p < 0.001$) и нейтрофилов – на 14.3 и 16.8% ($p < 0.01$) относительно соответствующих значений у животных контрольной группы. Следует отметить, что введение *M. bovis* особям, вакцинированным БЦЖ, не оказывало статистически значимого влияния на указанные показатели, хотя и прослеживалась тенденция к их повышению.

Снижение концентрации лимфоидных клеток после экспериментального заражения морских свинок, иммунизированных конъюгатами антигенов БЦЖ с кислотами (**II**) и (**III**), происходило за счет популяции цитотоксических Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов. Так, по сравнению с контрольной группой зарегистрировано уменьшение числа цитотоксических Т-клеток, соответственно, на 62.1 и 60.8% ($p < 0.01$), а В-клеток – на 33% ($p < 0.01$). В то же время инфицирование особей, которым предварительно вводили конъюгат антигенов БЦЖ с кислотой (**II**), индуцировало существенное увеличение концентрации Т-лимфоцитов – на 72.7% ($p < 0.05$). Последнее изменение также было характерно для животных, иммунизированных БЦЖ, у которых пролиферация Т-клеток носила более выраженный характер (увеличение в 2.7 раза по сравнению с контрольной группой, $p < 0.01$).

Таблица 2. Иммунологические параметры крови морских свинок на 30-е сут после инфицирования *Mycobacterium bovis* (штамм 8)

Показатель	Контроль	Опытные группы		
		1-я группа (конъюгат антигенов БЦЖ с бетулиновой кислотой (**III**))	2-я группа (конъюгат антигенов БЦЖ с бетулоновой кислотой (**II**))	3-я группа (вакцина БЦЖ)
Лейкоциты, $\times 10^9$/л	10.78 ± 0.34	7.16 ± 0.21***	6.94 ± 0.18***	11.36 ± 0.63
Лимфоциты, $\times 10^9$/л	7.43 ± 0.27	4.69 ± 0.25***	4.47 ± 0.27***	7.68 ± 1.05
Нейтрофилы, $\times 10^9$/л	2.79 ± 0.13	2.32 ± 0.06**	2.39 ± 0.12	3.21 ± 0.62
Т-лимфоциты, $\times 10^9$/л	0.99 ± 0.06	0.87 ± 0.07	1.71 ± 0.23*	2.69 ± 0.31**
В-лимфоциты, $\times 10^9$/л	1.06 ± 0.10	0.71 ± 0.08*	0.71 ± 0.10*	1.22 ± 0.32
Цитотоксические Т-лимфоциты, $\times 10^9$/л	3.22 ± 0.47	1.26 ± 0.03**	1.22 ± 0.18**	2.24 ± 0.36
НСТ-тест, спонт., ед. опт. пл.	0.65 ± 0.03	0.63 ± 0.02	0.60 ± 0.03	0.60 ± 0.02
НСТ-тест, стимулир., ед. опт. пл.	0.51 ± 0.02	0.59 ± 0.02	0.56 ± 0.02	0.57 ± 0.02
Функциональный резерв нейтрофилов, у.е.	0.78 ± 0.05	0.94 ± 0.01*	0.92 ± 0.02*	0.94 ± 0.01*
СЦК ЛКБ, у.е.	0.83 ± 0.05	0.99 ± 0.05	1.71 ± 0.18**	1.40 ± 0.30
СЦК МПО, у.е.	0.45 ± 0.03	0.44 ± 0.02	1.04 ± 0.02***	0.84 ± 0.19

* $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. Обозначения: НСТ-тест – тест с нитросиним тетразолием; СЦК ЛКБ – средний цитохимический коэффициент содержания лизосомальных катионных белков, СЦК МПО – средний цитохимический коэффициент активности миелопероксидазы. Данные приведены в виде средних значений ± s.d.

Изменения показателей кислород-зависимой бактерицидной активности нейтрофилов по результатам исследований в НСТ-тесте в анализируемых группах были однонаправленными. При отсутствии значимых отличий был отмечен рост стимулированной и снижение спонтанной тетразолиевой активности. Помимо этого, средние значения функционального резерва нейтрофилов у морских свинок опытных групп были увеличены в 1.18 и 1.2 раза относительно контрольной группы ($p < 0.05$).

Сходными изменениями характеризовались также СЦК ЛКБ и СЦК МПО: значения этих показателей у животных, иммунизированных БЦЖ, увеличились, соответственно, в 1.7 и 1.9 раза, а у морских свинок, иммунизированных конъюгатом антигенов БЦЖ с кислотой (**II**) – в 2.1 и 2.3 раза относительно контрольной группы, при этом только у последних наблюдалось статистически значимое повышение показателей. У особей, иммунизированных конъюгатом антигенов БЦЖ с кислотой (**III**), эти коэффициенты существенно не изменялись, хотя и наблюдалась некоторая тенденция к увеличению СЦК ЛКБ.

Известно, что при туберкулезе возникает дефицит Т-системы иммунитета, выраженность которого усиливается по мере прогрессирования заболевания. Ведущую роль в формировании противотуберкулезного иммунитета играет функциональное состояние фагоцитирующих клеток, особенно их бактерицидных систем. После экспериментального инфицирования вирулентным штаммом микобактерий указанные ключевые параметры иммунной системы у морских свинок, иммунизированных БЦЖ и конъюгатом антигенов БЦЖ с кислотой (**II**), были существенно выше по сравнению с животными контрольной группы, что свидетельствовало о более высокой противотуберкулезной активности этих препаратов.

Патологоанатомические исследования. Через 45 сут после инфицирования *M. bovis* морские свинки были подвергнуты эвтаназии. Последующие патологоанатомические исследования также подтвердили высокую эффективность конъюгата антигенов БЦЖ с кислотой (**II**) и вакцины БЦЖ. Так, показатель степени пораженности органов у особей этих групп был минимальным и в среднем составил 2.4 и 2.0 балла соответственно, при этом у отдельных особей отмечали значительное увеличение регионарных лимфатических узлов, их уплотнение с творожистым распадом. В то же время индекс защиты, напротив, был максимальным – 66 и 71%.

При патологоанатомическом исследовании морских свинок, иммунизированных конъюгатом антигенов БЦЖ с кислотой (**III**), помимо выраженных изменений лимфатических узлов могли наблюдать незначительное увеличение селе-

зенки и единичные мелкие туберкулезные узелки во внутренних органах. В контрольной группе животных эти изменения сопровождались увеличением лимфатических узлов с наличием казеозных масс в них, заметным увеличением селезенки с крупными туберкулезными узлами, а также наличием единичных крупных очагов в печени и легких. Показатель пораженности органов составил 7.0 баллов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и оборудование. Спектры ^{1}H- и ^{13}C-ЯМР регистрировали на спектрометре ECX 400A (Jeol, Япония) с рабочей частотой 400.13 МГц. Химические сдвиги измеряли по отношению к сигналу внутреннего стандарта – тетраметилсилана. ИК-спектры регистрировали на спектрометре Infralum FT-801 (СИМЕКС, Россия). ВЭЖХ проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1100 с диодно-матричным детектором (Agilent, Германия). Контроль за ходом реакции и чистотой полученных соединений осуществляли методом ТСХ на пластинках Sorbfil, проявление парами йода или УФ-светом. Температуру плавления определяли на столике Кофлера.

Экстракт бетулина. Для получения экстракта бетулина 230 г предварительно измельченной (до 2–5 мм в диаметре), промытой водой от луба и высушенной бересты помещали в экстрактор Сокслета и экстрагировали в течение 10 ч этанолом. Выделившийся при охлаждении раствора бетулин отфильтровывали, промывали несколько раз водой и высушивали до постоянной массы. Получили 73.4 г (выход 32%) сухого экстракта с относительным содержанием бетулина 82% (по данным ВЭЖХ).

Бетулоновая кислота (II). В трехгорлую колбу вместимостью 1000 мл, снабженную мешалкой, помещали 73.4 г выделенного экстракта бетулина и 300 мл ацетона. Реакционную смесь охлаждали до 0°C и при перемешивании добавляли по каплям рассчитанное количество оксида хрома(VI) в виде стандартного реактива Джонса в ацетоне. По окончании реакции реакционную смесь (верхний ацетоновый раствор) выливали в 1000 мл смеси воды и льда. Выпавший вязкий осадок постепенно стекловался, его далее растирали в ступке со льдом до порошкообразного состояния и отфильтровывали, промывая холодной водой. Неочищенную бетулоновую кислоту растворяли в 300 мл бензола, органический слой промывали разбавленной соляной кислотой, водой, 5%-ным раствором бикарбоната натрия и снова водой до нейтральной реакции. После сушки на воздухе получили 40.8 г сырой бетулоновой кислоты (выход 55%).

Для дальнейшей очистки в бензольный раствор бетулоновой кислоты добавляли раствор гидроксида натрия до полного выпадения осадка натриевой соли бетулоновой кислоты, который отфильтровывали, промывали сначала водой, затем 10%-ным раствором хлорида натрия, далее диэтиловым эфиром. Для выделения бетулоновой кислоты ее натриевую соль растворяли в водно-спиртовом растворе и обрабатывали разбавленной (1 : 5) соляной кислотой. Выпавшую в осадок бетулоновую кислоту отфильтровывали, промывали водой и высушивали; перекристаллизовывали из 2-пропанола.

Продукт представляет собой порошкообразное вещество белого цвета, т. пл. 245–246°C. ИК- и ^{1}H-ЯМР-спектры соответствовали представленным в литературе [28].

Бетулиновая кислота (III). В колбу вместимостью 500 мл, снабженную эффективной мешалкой, помещали 25 г (0.055 моль) бетулоновой кислоты, 200 мл 2-пропанола и постепенно частями присыпали 10.6 г (0.28 моль) боргидрида натрия (5-кратный избыток). По окончании реакции в колбу добавляли 50 мл 5%-ного раствора соляной кислоты для разложения остатков боргидрида натрия. По окончании разложения продукт реакции экстрагировали диэтиловым эфиром. Эфирный экстракт промывали водой, содой, затем снова водой, сушили над сульфатом натрия. Эфир отгоняли, получили 22.6 г (выход 90%) белого порошкообразного вещества. После перекристаллизации из 2-пропанола получили белые кристаллы с т. пл. 287–290°C. ИК- и ^{1}H-ЯМР-спектры соответствовали представленным в литературе [28].

Получение экспериментальных конъюгатов. Для получения антигенных комплексов культуру вакцинного штамма БЦЖ, выращенную на жидкой синтетической среде Сотона, подвергали ультразвуковой дезинтеграции на аппарате УЗДН-1 (22–35 кГц, 60–70 Вт/см^{2}) в течение 30 мин. Для посева на питательную среду использовали суспензию из лиофилизата микобактерий вакцинного штамма БЦЖ-1 (Филиал “Медгамал” ФГБУ “НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России). Полученную взвесь центрифугировали, в надосадочной жидкости определяли содержание белка с помощью красителя бромфенолового синего. Для иммунизации животных использовали конъюгаты, в состав которых входили антигены БЦЖ в комплексе с бетулоновой (**II**) или бетулиновой (**III**) кислотами в качестве корпускулярных адъювантов в соотношении 2 : 1. Концентрацию белка в антигенном комплексе доводили до 1000 мкг/мл, затем в препарат добавляли адъювант в количестве 500 мкг/мл и размешивали до полного растворения при комнатной температуре.

Экспериментальные животные и схема опыта. Исследования выполняли на самцах морских

свинок линии агути (масса 400–450 г, возраст 4–5 месяцев), содержавшихся в условиях специализированного вивария лаборатории эпизоотологии и мер борьбы с туберкулезом отдела ветеринарии Омского аграрного научного центра. До начала исследований всем животным выстригали боковую поверхность тела и внутрикожно вводили туберкулин очищенный (ППД) для млекопитающих (Курская биофабрика – фирма “БИОК”, Россия) в дозе 25 МЕ в объеме 0.1 мл растворителя. Аллергическую реакцию оценивали через 24 ч. Для проведения исследований были отобраны только особи (n = 20) с отрицательной реакцией на введение туберкулина.

Животных опытных групп иммунизировали противотуберкулезными препаратами: животным 1-й группы (n = 5) подкожно (в область паха справа) вводили конъюгат антигенов БЦЖ с бетулиновой кислотой (**III**) в дозе 0.5 мл, животным 2-й группы (n = 5) подкожно вводили конъюгат с антигенов БЦЖ бетулоновой кислотой (**II**) в той же дозе; животным 3-й группы (n = 5) внутрикожно вводили вакцину БЦЖ в дозе 0.1 мг в 0.1 мл физиологического раствора. Животным контрольной группы (n = 5) подкожно вводили физиологический раствор (0.5 мл).

На 29-е сут после введения противотуберкулезных препаратов всем животным внутрикожно вводили туберкулин. Аллергическую реакцию оценивали через 24 ч, затем производили отбор проб крови из сердца для изучения иммунного статуса.

Через 30 сут после иммунизации животным контрольной и опытных групп подкожно (в область паха слева) вводили вирулентную культуру *M. bovis* (штамм 8) в дозе 1 мкг/мл. В работе использовали культуру из Биоресурсной коллекции патогенных микроорганизмов отдела ветеринарии Омского аграрного научного центра.

На 29-е сут после инфицирования *M. bovis* всем животным внутрикожно вводили туберкулин. Аллергическую реакцию оценивали через 24 ч, затем производили отбор проб крови из сердца для изучения иммунного статуса по тем же показателям, которые были использованы в предыдущий срок исследования.

За лабораторными животными вели постоянное клиническое наблюдение, которое включало оценку двигательной активности, поведения животного, а также регистрацию частоты пульса, дыхания и температуры тела.

Через 45 сут после инфицирования *M. bovis* животных подвергали эвтаназии ингаляционным наркозом парами эфира и проводили патологоанатомические исследования: показатель пораженности органов оценивали по методу С.И. Гельберг и Е.А. Финкель [30], индекс защиты – по методике А.И. Тогуновой и Е.Н. Лещинской [31].

Изучение иммунологических параметров. Количественное определение иммунокомпетентных клеток проводили методами спонтанного, комплементарного и глобулинового розеткообразования в соответствии с методическими рекомендациями по оценке иммунного статуса при хронических инфекциях животных [32]. Подсчет лейкоцитов и лейкограммы осуществляли по общепринятым методикам.

Функциональную активность нейтрофилов оценивали в тесте с нитросиним тетразолием (НСТ-тест) в спонтанном и индуцированном (вакцина БЦЖ) вариантах фотометрическим способом. Дополнительно рассчитывали функциональный резерв нейтрофилов как отношение индуцированного варианта НСТ к спонтанному [33]. В нейтрофильных гранулоцитах цитохимическим методом определяли активность миелопероксидазы (МПО) по методу Грэхем–Кнолля с использованием бензидина [34], а также содержание лизосомально-катионных белков (ЛКБ) по методу М.Г. Шубича с бромфеноловым синим [35]. При анализе мазков подсчитывали процент положительно прореагировавших клеток и в соответствии со стандартными методиками рассчитывали средний цитохимический коэффициент (СЦК).

Статистический анализ. Достоверность различий между группами оценивали по t-критерию Стьюдента в программе Microsoft Excel.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Введение морским свинкам препаратов на основе антигенов БЦЖ и дериватов бетулина оказывает иммуностимулирующее действие, проявляющееся в увеличении числа иммунокомпетентных клеток и усилении бактерицидной функции нейтрофильных гранулоцитов разной степени выраженности в зависимости от используемого в конъюгате производного бетулина.

Конъюгат антигенов вакцинного штамма БЦЖ с бетулоновой кислотой (**II**) индуцировал наиболее высокую противотуберкулезную устойчивость, сопоставимую с вакциной БЦЖ, о чем свидетельствовали выраженное увеличение в крови концентрации Т-лимфоцитов и усиление активности бактерицидных систем нейтрофилов после введения вирулентного штамма *Mycobacterium bovis*, а также результаты патологоанатомических исследований.

Полученный конъюгат антигенов вакцинного штамма БЦЖ с бетулоновой кислотой (**II**) – перспективный препарат для проведения испытаний на крупном рогатом скоте с целью профилактики туберкулеза.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки Омского аграрного научного центра по теме: 0797-2019-0018 “Разработка новых и усовершенствование существующих средств и методов диагностики и профилактики хронических инфекций животных, обеспечивающих эффективный контроль эпизоотического процесса в современных условиях” (№ государственной регистрации АААА-А19-119111500003-6).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования на морских свинках проведены в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других целях, от 18.03.1986.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Толстиков Г.А., Флехтер О.Б., Шульц Э.Э., Балтина Л.А., Толстиков А.Г.* // Химия в интересах устойчивого развития. 2005. № 13. С. 1–30.
2. *Pisha E., Chai H., Lee I.S., Chagweder I.E., Farnsworth N.R., Cordell G.A., Beecher C.W.W., Fong H.H.S., Kinghorn A.D., Brown D.M., Wani M.C., Wall M.E., Hieken T.J., Das Gupta T.K., Pezzuto J.M.* // Nat. Med. 1995. V. 1. P. 1046–1051.
3. *Казакова О.Б., Смирнова И.Е., Балтина Л.А., Бореко Е.И., Савинова О.В., Покровский А.Г.* // Биоорг. химия. 2019. Т. 45. С. 69–74. [*Kazakova O.B., Smirnova I.E., Baltina L.A., Boreko E.I., Savinova O.V., Pokrovskii A.G.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. P. 740–744.] https://doi.org/10.1134/S1068162018050059
4. *Казакова О.Б., Смирнова И.Е., Медведева Н.И., Лопатина Т.В., Чудов И.В., Шарипов А.Р., Зиганшин А.С., Tran Thi Phuong Thao* // Биоорг. химия. 2019. Т. 45. С. 664–672. [*Kazakova O.B., Smirnova I.E., Medvedeva N.I., Lopatina T.V., Chudov I.V., Sharipov A.R., Ziganshin A.S., Tran Thi Phuong Thao* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 558–565.] https://doi.org/10.1134/S1068162019050030
5. *Selzer E., Thallinger C., Hoeller C., Oberkleiner P., Wacheck V., Pehamberger H., Jansen B.* // Mol. Med. 2002. V. 8. P. 877–884.
6. *Recio C.M., Giner R.M., Manez S., Gueho J., Julien H.R., Hostettmann K., Rios J.L.* // Planta Med. 1995. V. 61. P. 9–12.
7. *Fujioka T., Kashiwada Y., Kilkuskie R., Cosentino L.M., Ballas L.M., Jiang J.B., Janzen W.P., Chen I.S., Lee K.H.* // J. Nat. Prod. 1994. V. 57. P. 243–247.
8. *Kashiwada Y., Hashimoto F., Cosentino L.M., Chen C.H., Garrett P.E., Lee K.H.* // J. Med. Chem. 1996. V. 39. P. 1016–1017.
9. *Голдырев А.А., Деев Л.Е., Ситников В.А.* // Аграрная наука. 2007. № 11. С. 26–28.
10. *Щегловитова О.Н., Шуляк А.Ф., Величко Г.Н.* // РВЖ СХЖ. 2007. № 1. С. 31–33.
11. *Задорожная М.В.* // Птицеводство. 2011. № 4. С. 61–62.
12. *Задорожная М.В., Лыско С.Б., Красиков А.П.* // Птица и птицепродукты. 2012. № 4. С. 43–45.
13. *Caminiti A., Pelone F., Battisti S., Gamberale F., Colafrancesco R., Sala M., La Torre M., Della Marta U., Scaramozzino P.* // Transbound. Emerg. Dis. 2017. V. 64. P. 1493–1504. https://doi.org/10.1111/tbed.12540
14. *Ciaravino G., Ibarra P., Casal E., Pastor Lopez S., Espluga J., Casal J., Napp S., Allepuz A.* // Front. Vet. Sci. 2017. V. 4. Article 202. https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00202
15. *Allen A.R., Skuce R.A., Byrne A.W.* // Front. Vet. Sci. 2018. V. 5. Article 109. https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00109
16. *Mingaleev D.N., Hisamutdinov A.G., Efimova M.A., Trubkin A.I., Kamalieva J.R.* // BIO Web Conf. 2020. V. 17. Article 00115. https://doi.org/10.1051/bioconf/20201700115
17. *Parlane N.A., Buddle B.M.* // Curr. Clin. Microbiol. Rep. 2015. V. 2. P. 44–53. https://doi.org/10.1007/s40588-014-0009-4
18. *Balseiro A., Jobin T., Gortázar C., Risalde M.A.* // Pathogens. 2020. V. 9. P. 472. https://doi.org/10.3390/pathogens9060472
19. *Li J., Zhao A., Tang J., Wang G., Shi Y., Zhan L., Qin C.* // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2020. V. 39. P. 1405–1425. https://doi.org/10.1007/s10096-020-03843-6
20. *Гурвич А.Е.* // Иммуносорбенты и их использование в биотехнологии. М.: АМН СССР, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, 1986. С. 3–22.
21. *Бажин М.А., Шамов В.В.* // Актуальные проблемы бруцеллеза и туберкулеза животных: сб. науч. тр. ВНИИБТЖ. Омск: Полиграфический центр ЧП Кухар Г.Г., 2000. С. 61–66.
22. *Власенко В.С., Шулико Е.М., Петров С.Ю., Бажин М.А., Новиков А.Н.* // Достижения науки и техники АПК. 2009. № 12. С. 47–49.
23. *Красильников И.В., Николаева А.М., Машин В.В.* // Сибирский медицинский журнал (г. Томск). 2011. Т. 26. № 2–2. С. 65–67.
24. *Красильников И.В., Аракелов С.А., Петровский С.В.* // Медицинский алфавит. 2017. Т. 1. № 8(305). С. 24–29.
25. *Флехтер О.Б., Карачурина Л.Т., Поройков В.В., Нигматуллина Л.Р., Балтина Л.А., Зарудий Ф.С., Давыдова В.А., Спирихин Л.В., Байкова И.П., Галин Ф.З., Толстиков Г.А.* // Биоорг. химия, 2000. Т. 26. С. 215–223. [*Flekhter O.B., Karachurina L.T., Nigmatullina L.P., Baltina L.A., Zarudii F.S., Davydova V.A., Spirikhin L.V., Baikova I.P., Galin F.Z., Tolstikov G.A., Poroikov V.V.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2000. V. 26. P. 192–200.] https://doi.org/10.1007/BF02786345

26. *Barthel A., Stark S., Csuk R.*// Tetrahedron. 2008. V. 64. P. 9225–9229.

27. *Флехтер О.Б., Бореко Е.И., Нигматуллина Л.Р., Павлова Н.И., Николаева С.Н., Савинова О.В., Еремин В.Ф., Балтина Л.А., Галин Ф.З., Толстиков Г.А.* // Биоорг. химия. 2003. Т. 29. С. 326–332. [*Flekhter O.B., Boreko E.I., Nigmatullina L.R., Pavlova N.I., Nikolaeva S.N., Savinova O.V., Eremin V.F., Baltina L.A., Galin F.Z., Tolstikov G.A.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2003. V. 29. P. 296–302.] https://doi.org/10.1023/A:1023948919315

28. *Флехтер О.Б., Нигматуллина Л.Р., Балтина Л.А., Карачурина Л.Т., Галин Ф.З., Зарудий Ф.С., Толстиков Г.А., Бореко Е.И., Павлова Н.И., Николаева С.Н., Савинова О.В.* // Хим.-фарм. журн. 2002. Т. 36. № 9. С. 26–28.

29. *Когай Т.И.* // Журнал Сибирского федерального университета. Химия. 2008. № 1. Р. 97–104.

30. *Гельберг С.И., Финкель Е.А.* // Проблемы туберкулеза. 1959. № 2. С. 80–84.

31. *Тогунова А.И., Лещинская Е.Н.* // Бюл. ин-та туберкулеза АМН СССР. 1951. № 1. С. 27–33.

32. *Бажин М.А., Власенко В.С., Новиков А.Н., Пацула Ю.И.* // Дискретно-динамический анализ в оценке иммунитета: методические рекомендации. СО РАСХН. Омск, 2005. 24 с.

33. *Власенко В.С., Донченко Н.А., Пацула Ю.И., Бажин М.А., Иванов А.И., Морозова О.В., Дудоладова Т.С.* // Методы оценки функциональной активности лейкоцитов при туберкулезе и лейкозе животных (методическое пособие). Омск, 2015. 16 с.

34. *Hrycek A.* // Follia Biol. (Praha). 1993. V. 39. № 6. P. 304–310.

35. *Шубич М.Г.* // Цитология. 1974. Т. 16. № 10. С. 1321–1322.

Influence of Experimental BCG Antigen and Betulin Derivative Based Conjugates on Immunological Response in Guinea Pigs

I. N. Koshkin*, V. S. Vlasenko,#, and I. V. Kulakov*****

#Phone: +7 (951) 408-34-21; e-mail: vvs-76@list.ru

**Stolypin Omsk State Agricultural University, Institutskaya pl. 2, Omsk, 644008 Russia*

***Omsk Agrarian Scientific Center, prosp. Koroleva 26, Omsk, 644012 Russia*

****Institute of Chemistry, Tyumen State University, ul. Perekopskaya 15a, Tyumen, 625003 Russia*

The evaluation findings for the immunopotentiating properties of BCG vaccine strain antigen- and betulin derivative-based conjugates are delivered herein. The experiments were carried out on agouti guinea pigs ($n = 20$). The animals of the experimental groups ($n = 5$) were immunized with anti-tuberculosis drugs: the 1st group – with antigens of the BCG vaccine strain conjugated with betulinic acid; the 2nd group – BCG antigens conjugated with betulonic acid; the 3rd group – BCG vaccine. The animals of the control group ($n = 5$) were injected with saline solution. All animals were infected with a virulent culture of *Mycobacterium bovis* (strain 8) on the 30th day after the administration of anti-tuberculosis agents. The blood sampling for the assessment of the immune status was conducted on the 30th day after the administration of drugs and 30th day after infection. It has been established that the engineered conjugates had an immunopotentiating activity characterized by 1.7–3.8-fold increase in the amount of immune competent cells and by an increase in the neutrophil functional activity that it was the most significant in the 2nd group of guinea pigs. After infection with *M. bovis* such key parameters of the immune system as the content of T-lymphocytes and the activity of the enzymatic (myeloperoxidase) and non-enzymatic (cationic proteins) bactericidal systems of neutrophilic granulocytes were significantly increased in guinea pigs of the 2nd and 3rd groups, which testified to the highest anti-tuberculosis activity of drugs administered to these animals. The guinea pigs were euthanized in 45 days after infection with *M. bovis*. The following pathoanatomical examinations proved that the vaccine strain-based conjugate with betulonic acid and the BCG vaccine induce the evident resistance against pathogenic mycobacteria. The protection index created by these drugs was approximately at the same level and amounted to 66 and 71%, respectively.

Keywords: betulinic acid, betulonic acid, BCG vaccine, conjugates, tuberculosis, guinea pigs

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 5, с. 642–646

ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.115.4:577.352:535.372

Cy5-МЕЧЕНЫЙ ФОСФАТИДИЛХОЛИН

© 2021 г. Ю. А. Грачёва*, Д. С. Третьякова, О. Г. Замышляева*, Е. С. Кудряшова*, Е. Л. Водовозова**, А. Ю. Федоров*, И. А. Болдырев**, #**

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

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

Поступила в редакцию 30.10.2020 г.
После доработки 11.11.2020 г.
Принята к публикации 14.11.2020 г.

Флуоресцентные липидные зонды широко применяются в качестве инструментов для исследования биологических функций липидов (метаболических путей и молекулярных механизмов заболеваний) и изучения свойств биологических мембран. В данной статье мы описываем новый флуоресцентный липидный зонд – Cy5-меченый фосфатидилхолин (Cy5-PC), приводим его геометрические параметры, методику синтеза, спектральные характеристики и данные по подвижности в липидной мембране. Cy5-PC – хороший зонд для биоимиджинга – интенсивность его флуоресценции сохраняет линейную зависимость вплоть до высоких значений концентрации. Однако применение Cy5-PC в исследованиях мембранной динамики невозможно, т.к. зонд нечувствителен даже к фазовому переходу в липидной мембране.

Ключевые слова: флуоресцентные липидные зонды, цианиновые красители, биологические мембраны

DOI: 10.31857/S0132342321050262

ВВЕДЕНИЕ

Флуоресцентные липидные зонды – распространенный инструмент для исследования биологических функций липидов [1]. Поведение липидных зондов в мембране зависит от структуры флуорофора. Оно различается для дифенилгексатриена [2], пирена [3], 4-нитробензо-2-окса-1,3-диазола (NBD) [4–6], производных группы BODIPY [7, 8] и других флуорофоров [9, 10]. Цианиновые флуорофоры широко применяются для мечения белков [11] и нуклеиновых кислот [12–15]. Для изучения биологических мембран используются диалкильные производные цианинов (DII, DIO, DID и DIR), сильно отличающиеся по структуре от молекул липидов [16, 17]. Стремясь разработать флуоресцентные зонды, как можно более близкие по структуре к природным липидам, мы синтезировали фосфолипидный аналог Cy5-PC – фосфатидилхолин с флуорофором Cy5, присоединенным через ацильный линкер в *sn*-2-положение глицерина. Это распространенный дизайн липидных зондов для мембранных исследований [18–21]. Однако именно Cy5-меченых фосфатидилхолинов до сих пор не было предложено. Cy5 – достаточно полярный флуорофор, он применялся (в виде конъюгата с дибензоциклооктином для последующей реакции циклоприсоединения к азиду) для мечения встроенного в клеточную мембрану гликолипида, модифицированного азидогруппой по остатку маннозы [22, 23]. Мы считаем, что введение Cy5 в гидрофобную часть молекулы фосфолипида представляет не меньший интерес. Во-первых, относительно неполярные метки, обладающие подходящими для биоимиджинга спектральными характеристиками, все равно вытесняются из плотно упакованной гидрофобной области мембраны в приповерхностную полярную область [8]. Во-вторых, полярные метки, такие как NBD, располагаются в полярной области мембраны независимо от места крепления в молекуле липида [5]. И, наконец, Cy5 сорбируется на поверхности липидной мембраны из водного раствора, даже если флуорофор содержит сульфогруппы [24].

Сокращения: BODIPY – 4,4-дифтор-4-бора-3a,4a-диаза-*s*-индацен-8-ил; Cy5 – цианиновый флуорофор, содержащий полиметиновую цепь из пяти атомов C; Cy5-PC – Cy5-меченый фосфатидилхолин; DMPC – 1,2-димиристоил-*sn*-глицерофосфохолин; NBD – 4-нитробензо-2-окса-1,3-диазол; TMB-PC – (1,3,5,7-тетраметил-BODIPY)-меченый фосфатидилхолин.

[#] Автор для связи (тел.: +7 (495) 330-66-10; эл. почта: ivan@lipids.ibch.ru).

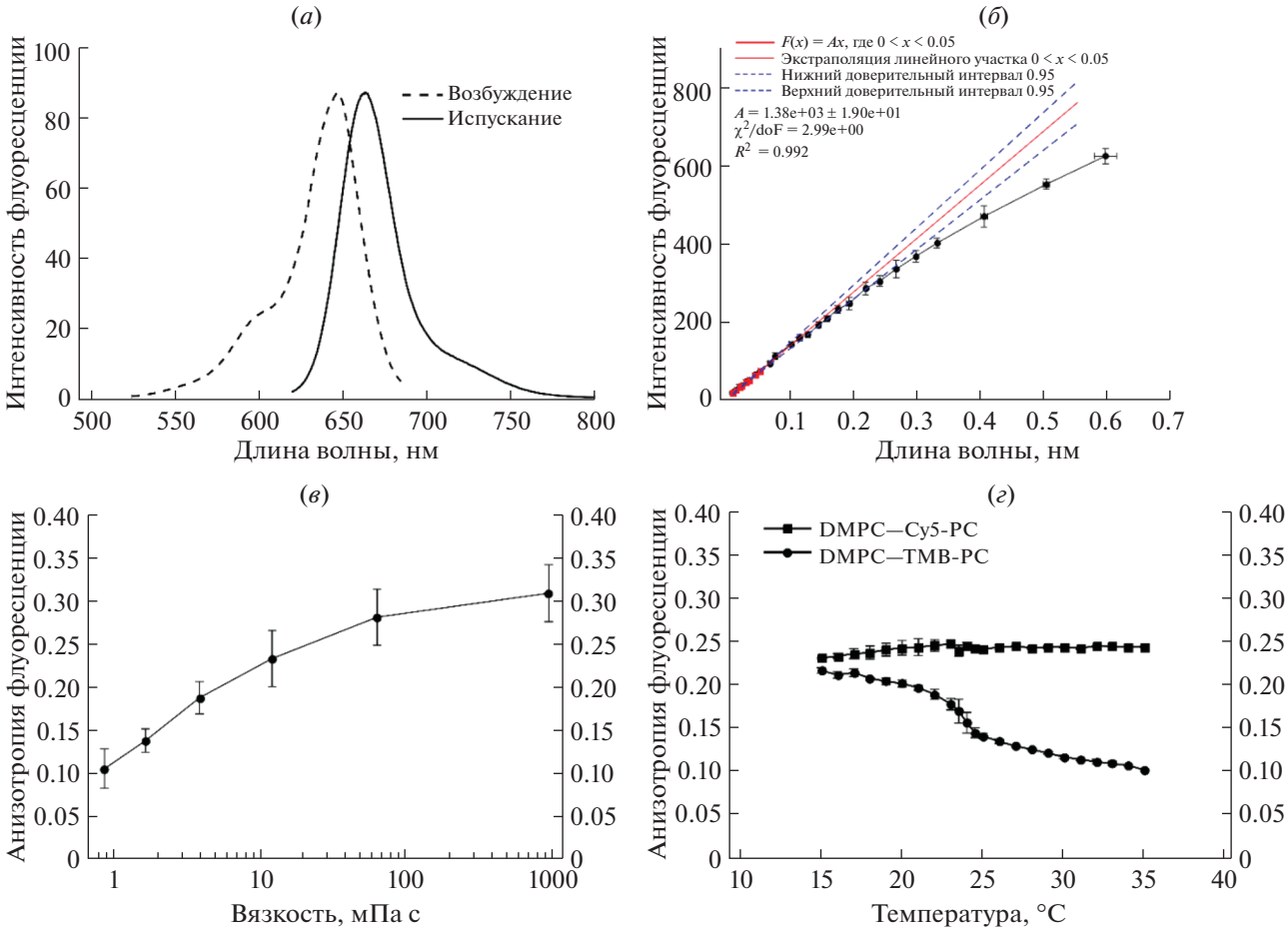


Рис. 1. (*а*) – Спектры возбуждения и испускания зонда Cy5-PC в этаноле; (*б*) – зависимость интенсивности флуоресценции Cy5-PC от концентрации; (*в*) – зависимость анизотропии флуоресценции Cy5 от вязкости среды (смеси глицерина с водой); (*г*) – анизотропия флуоресценции фосфолипидных зондов Cy5-PC и TMB-PC [8] в бислое DMPC в зависимости от температуры.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектральные характеристики Cy5-PC идентичны таковым для исходного флуорофора Cy5: $\lambda_{возб}/\lambda_{эм}$ = 646/664 нм (рис. 1*а*). С ростом концентрации Cy5-PC в растворе эффект внутреннего фильтра не проявляется вплоть до оптической плотности 0.3 (что соответствует концентрации 1.2 мкМ, молярный коэффициент поглощения ε ~ 250000) (рис. 1*б*). Это позволяет использовать Cy5-PC в больших локальных концентрациях в мембранах, не опасаясь самотушения его флуоресценции, что важно для биоимиджинга липосом в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Анизотропия флуоресценции (*r*) – мера подвижности флуорофора. Если последний быстро и свободно вращается, анизотропия флуоресценции будет стремиться к нулю. Если молекула зафиксирована в пространстве, величина *r* будет равна предельному значению, характеристическому для данного флуорофора (но не более максимально возможного значения 0.4). Измерения анизотропии флуоресценции позволяют оценить свойства среды, в которой находится флуорофор: с ростом вязкости среды подвижность флуорофора уменьшается, а величина *r* растет (рис. 1*в*). По изменению анизотропии флуоресценции отслеживают изменение фазового состояния липидной мембраны. На рис. 1*г* показано изменение анизотропии флуоресценции для BODIPY-меченого липида, TMB-PC [8], в липидном бислое из 1,2-димиристоил-*sn*-глицерофосфохолина (DMPC) при изменении температуры. DMPC при 24°C переходит из гелевой (*So*) в жидкую неупорядоченную фазу (*Ld*), и в районе точки фазового перехода анизотропия меняется скачкообразно. Однако в случае Cy5-PC фазовый переход в липидном бислое практически не отражается на анизотропии флуоресценции зонда.

Можно было предположить, что вращение флуорофора Cy5 затормаживается за счет электростатических взаимодействий с фосфатными группами двух соседних липидов в мембране.

Действительно, расстояние между катионными центрами (атомами N) Cy5 равно 9.8 Å (данные из оптимизированной геометрии флуорофора, программное обеспечение ORCA [25], уровень теории B3LYP), что очень близко к расстоянию между фосфатами соседних липидов – 9.1 Å (исходя из средней площади на один липид в 65 Å^2 [26]). Однако в работе Lam et al. [27] с помощью полноатомной молекулярной динамики показано, что ароматические системы цианиновых флуорофоров, включая атомы азота, погружены в область углеводородных цепей и не взаимодействуют с фосфатными группами липидов.

Мы считаем, что пониженная чувствительность анизотропии флуоресценции Cy5 к изменению фазового состояния внутри бислоя обусловлена коротким временем жизни возбужденного состояния. Для цианиновых красителей оно составляет менее 2 нс [28]. За это время соседние с зондом молекулы липидов не успевают переместиться на заметное расстояние. Соответственно, и сам флуорофор не успевает изменить своего положения в пространстве. Иными словами, короткое время жизни флуоресценции цианинового флуорофора не позволяет отличить друг от друга липидные среды с высоким (в фазе *Ld*) и низким (в фазе *So*) коэффициентом диффузии. Для зонда TMB-PC время жизни возбужденного состояния превышает 6 нс [8]. Этого оказывается достаточно, чтобы почувствовать разницу между динамикой липидов в жидкокристаллической и гелевой фазах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР (δ, м.д.; КССВ – *J*, Гц) регистрировали на спектрометре DD2 400 (Agilent, США) в CD_3OD при 25°C, используя TMS в качестве внутреннего стандарта. Масс-спектр получен на масс-спектрометре Microflex LT (Bruker, Германия); MS (MALDI-TOF). Электронные спектры (в этаноле) регистрировали на спектрофотометре СФ2000 (ООО “ОКБ Спектр”, Россия), спектры флуоресценции (в этаноле) – на спектрофлуориметре Hitachi F-4000 (Япония), спектральные щели 5 нм. Спектр испускания в диапазоне 620–800 нм снимали при возбуждении 600 нм; спектр возбуждения в диапазоне 525–685 нм – при испускании 695 нм.

Синтез Cy5-PC из лизофосфатидилхолина (LysoPC) и карбоксипентильного производного Cy5 проводили в условиях реакции Штеглиха, как описано ранее [21] (схема 1). Целевой продукт выделяли хроматографией на силикагеле 60, элюируя градиентом метанола в хлороформе от 10 до 20%, затем системой $CHCl_3$: MeOH : H_2O, 65 : 25 : 4 (выход 46%; темно-синее маслообразное вещество). Выход реакции синтеза зонда Cy5-PC (схема 1) составил 46%. Структура была подтверждена методами масс- (m/z 960.1 $[M]^+$) и ЯМР-спектроскопии.

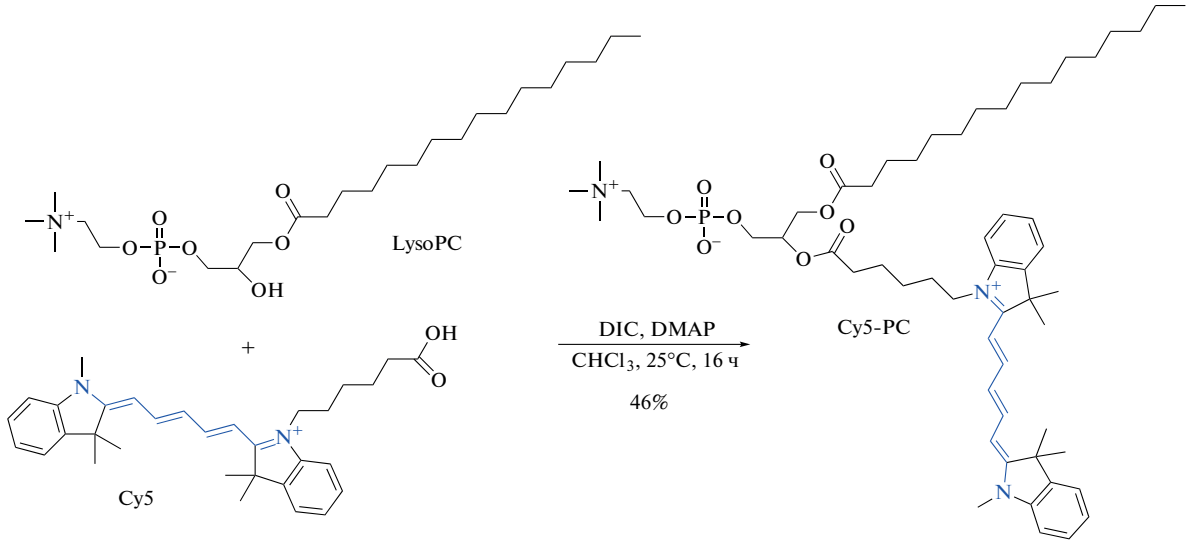


Схема 1. Схема синтеза флуоресцентного липидного зонда Cy5-PC. LysoPC – лизофосфатидилхолин, Cy5 – карбоксипентильное производное Cy5, DIC – диизопропилкарбодиимид, DMAP – 4-диметиламинопиридин.

^{1}H-ЯМР-спектр (400 МГц): 8.33–8.24 (м, 2H), 7.50 (д, *J* 7.1, 2H), 7.44–7.39 (м, 2H), 7.34–7.30 (м, 2H), 7.29–7.24 (м, 2H), 6.71–6.65 (м, 1H), 6.32 (д, *J* 13.8, 2H), 4.31 (с, 2H), 4.16–4.10 (м, 2H), 3.76–3.57 (м, 7H), 3.31 (с, 3H), 3.27 (д, *J* 3.5, 9H), 2.35 (тд, *J* 14.4, 13.3, 7.0, 4H), 1.73 (с, 14H), 1.60 (квин-

тет, *J* 8.5, 7.7, 2H), 1.56–1.50 (м, 2H), 1.28 (уш. с, 26H), 0.89 (т, *J* 6.3, 3H).

^{31}P-ЯМР-спектр (162 МГц): –1.11.

^{13}C-ЯМР-спектр (101 МГц): 175.38, 174.95, 174.64, 174.50, 174.35, 155.62, 155.51, 144.24, 143.53, 142.67, 142.55, 129.73, 126.87, 126.23, 126.15, 123.43, 123.28, 112.00, 111.89, 104.58, 104.32, 71.98, 67.40, 67.35, 64.97, 63.52, 60.66, 54.77, 54.74, 50.51, 44.81, 34.86, 33.05, 31.73, 30.77, 30.73, 30.59, 30.42, 30.15, 28.16, 28.05, 27.88, 27.25, 25.99, 25.69, 23.73, 23.70, 14.46.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированный нами Cy5-PC оказался зондом с узкой областью использования. Его применение в исследованиях мембранной динамики невозможно, т.к. зонд нечувствителен даже к фазовому переходу в липидной мембране. Однако Cy5-PC – хороший зонд для биоимиджинга – интенсивность его флуоресценции сохраняет линейную зависимость вплоть до высоких значений концентрации. Cy5-PC найдет применение для окрашивания мембран клеток и искусственных липидных мембран.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 0729-2020-0039) в рамках базовой части государственного задания.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Varandas P., Cobb A., Segundo M., Silva E.* // Bioconjugate Chem. 2020, V. 31, P. 417–435. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00660
2. *do Canto A., Robalo J., Santos P., Palace Carvalho A., Prates Ramalho J., Loura L.* // Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 2016. V. 1858. P. 2647–2661. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.07.013
3. *Fraňová M.D., Vattulainen I., Ollila O.H.S.* // Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 2014. V. 1838. P. 1406–1411. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.030
4. *Filipe H., Bowman D., Palmeira T., Cardoso R., Loura L., Moreno M.* // Phys. Chem. Chem. Phys. 2015. V. 17. P. 27534–27547. https://doi.org/10.1039/C5CP04191K
5. *Filipe H., Pokorna S., Hof M., Amaro M., Loura L.* // Phys. Chem. Chem. Phys. 2019, V. 21. P. 1682–1688. https://doi.org/10.1039/C8CP06064A
6. *Amaro M, Filipe H., Prates Ramalho J., Hof M., Loura L.* // Phys. Chem. Chem. Phys. 2016. V. 18. P. 7042–7054. https://doi.org/10.1039/C5CP05238F
7. *Sachl R., Boldyrev I., Johansson L.* // Phys. Chem. Chem. Phys. 2010. V. 12. P. 6027–6034. https://doi.org/10.1039/b926953c
8. *Tretiakova D.S., Alekseeva A.S., Galimzyanov T.R., Boldyrev A.M., Chernyadyev A.Y., Ermakov Y.A., Batishchev O.V., Vodovozova E.L., Boldyrev I.A.* // Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 2018. V. 1860. P. 2337–2347. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.05.020
9. *Faller R.* // Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 2016. V. 1858. P. 2353–2361. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.02.014
10. *Loura L., Prates Ramalho J.* // Biophys. Rev. 2009. V. 1. P. 141–148. https://doi.org/10.1007/s12551-009-0016-5
11. *Leisle L., Chadda R., Lueck J., Infield D., Galpin J., Krishnamani V., Robertson J., Ahern C.* // eLife. 2016. V. 5. P. e19088. https://doi.org/10.7554/eLife.19088
12. *Fegan A., Shirude P., Balasubramanian S.* // Chem. Commun. (Camb). 2008. V. 17. P. 2004–2006. https://doi.org/10.1039/B801629A
13. *Gerowska M., Hall L., Richardson J., Shelbourne M., Brown T.* // Tetrahedron. 2012. V. 68. P. 857–864. https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.11.041
14. *Lapa S.A., Guseinov T.O., Pavlov A.S., Shershov V.E., Kuznetsova V.E., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 557–562. https://doi.org/10.1134/S1068162020040111
15. *Shershov V.E., Miftakhov R.A., Kuznetsova V.E., Timofeev E.N., Grechishnikova I.V., Spitsyn M.A., Guseinov T.O., Lapa S.A., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 68. P. 217–220. https://doi.org/10.1134/S1068162019030051
16. *Shim S.H., Xia C., Zhong G., Babcock H.P., Vaughan J.C., Huang B., Wang X., Xu C., Bi G.Q., Zhuang X.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 13978–13983. https://doi.org/10.1073/pnas.1201882109
17. *Daubeuf S., Bordier C., Hudrisier D., Joly E.* // Cytometry A. 2009. V. 75. P. 380–389. https://doi.org/10.1002/cyto.a.20679
18. *Boldyrev I.A., Zhai X., Momsen M.M., Brockman H.L., Brown R.E., Molotkovsky J.G.* // J. Lipid Res. 2007. V. 48. P. 1518–1532. https://doi.org/10.1194/jlr.M600459-JLR200
19. *Boldyrev I.A., Molotkovsky J.G.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2006. V 32. P.78–83. https://doi.org/10.1134/S1068162006010080
20. *Polozov I.V., Molotkovsky J.G., Bergelson L.D.* // Chem. Phys. Lipids. 1994. V 69. P. 209–218. https://doi.org/10.1016/0009-3084(94)90002-7

21. *Alekseeva A., Tretiakova D., Melnikova D., Molotkovsky U., Boldyrev I.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2016. V. 42. P. 305–309. https://doi.org/10.1134/S1068162016030031
22. *Shen L., Cai K., Yu J., Cheng J.* // Bioconjugate Chem. 2019. V 30. P. 2317–2322. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00509
23. *Shen L., Cai K., Yu J., Cheng J.* // ACS Omega. 2020. V. 5. P. 14111–14115. https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01644
24. *Hughes L., Rawle R., Boxer S.* // PLoS One. 2014. V. 9. P. e87649. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087649
25. *Neese F.* // WIREs Comput. Mol. Sci. 2012. V. 2. P. 73–78. https://doi.org/10.1002/wcms.81
26. *Petrache H.I., Dodd S.W., Brown M.F.* // Biophys. J. 2000. V. 79. P. 3172–3192. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76551-9
27. *Lam K., Tajkhorshid E.* // Biophys. J. 2020. V. 119. P. 24–34. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.05.027
28. *Gustafson T., Cao Q., Achilefu S., Berezin M.* // ChemPhysChem. 2012. V. 13. P. 716 –723. https://doi.org/10.1002/cphc.201100916

Cy5-Labeled Phosphatidylcholine

I. A. Gracheva*, D. S. Tretiakova, O. G. Zamyshlyaeva*, E. S. Kudriashova*, E. L. Vodovozova**, A. Y. Fedorov*, and I. A. Boldyrev**,[#]**

[#]Phone: +7 (495) 330-66-10; e-mail: ivan@lipids.ibch.ru

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

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

Fluorescent lipid probes are widely used as tools for studying the biological functions of lipids (such as metabolic pathways and molecular mechanisms of diseases) and studying the properties of biological membranes. In this report, we describe a new fluorescent lipid probe, Cy5-labeled phosphatidylcholine (Cy5-PC), present its geometrical parameters, synthesis, spectral characteristics, and data on the mobility in lipid membrane. Cy5-PC is an excellent probe for bioimaging, the intensity of its fluorescence retains a linear dependence up to high concentrations. At the same time the use of Cy5-PC in studies of membrane dynamics is impossible, since the probe is insensitive even to the phase transition in the lipid membrane.

Keywords: fluorescent lipid probes, cyanine dyes, biological membrane

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 5, с. 647–651

ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.782

ТИОФЕНОВЫЙ АНАЛОГ ХРОМОФОРА GFP КАК ФЛУОРОГЕН ДЛЯ БЕЛКА FAST

© 2021 г. Н. С. Балеева*, **, #, А. Ю. Смирнов*, **, И. Н. Мяснянко*, **, А. С. Гавриков*, 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 12.03.2021 г.
После доработки 25.03.2021 г.
Принята к публикации 28.03.2021 г.

Синтезировано тиофеновое производное хромофора белка GFP. Установлено, что введение тиофенового заместителя приводит к значительному возрастанию коэффициента экстинкции. Показано, что полученное соединение может быть использовано для флуоресцентной микроскопии в качестве пары для флуороген-активирующего белка FAST.

Ключевые слова: флуорогены, флуороген-активирующие белки, флуоресценция

DOI: 10.31857/S0132342321050195

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы популярным типом генетически кодируемых флуоресцентных меток стали так называемые флуороген-активирующие белки [1–3]. Такие белки способны формировать комплексы с флуорогенами – низкомолекулярными люминесцирующими молекулами, имеющими в растворах лишь слабовыраженную флуоресценцию. В результате формирования комплекса и фиксации флуорогена белком происходит многократное усиление флуоресценции [4]. Представитель такой группы белков – белок FAST (Fluorescence-Activating and absorption-Shifting Tag) [5]. Этот белок способен образовывать флуоресцентные комплексы с бензилиденовыми производными роданинов [6] или производными хромофоров флуоресцентных белков [7] (схема 1).

На данный момент для белка FAST создано более десятка флуорогенов, имеющих самую разную окраску [8, 9]. Однако все эти вещества образуют флуоресцентные комплексы с умеренной яркостью: их квантовый выход флуоресценции лежит в районе 20–30%, коэффициент экстинкции составляет 20000–40000 M^{-1} $см^{-1}$. Поскольку яркость флуоресцентных меток – одна из важнейших характеристик, актуальное направление дальнейшего исследования в области создания новых пар "белок FAST – флуороген" – поиск веществ, отличающихся более интенсивными поглощением и/или флуоресценцией. Поэтому целью данной работы стало создание соединения с такими свойствами на основе хромофора GFP.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы исследовали, как влияет на оптические свойства флуоресцентного комплекса введение тиофенового заместителя в структуру флуорогена. Хорошо известно, что введение в молекулы красителей такого фрагмента может приводить к заметному росту коэффициента экстинкции [10, 11]. Для синтеза тиофенового аналога хромофора белка GFP (**II**) нами была выбрана палладий-катализируемая реакция кросс-сочетания (схема 1). Этот метод уже был использован для синтеза ряда бензилиденимидазолонов, содержащих различные ароматические заместители во втором положении имидазолона [12, 13]. Целевое соединение было получено с общим выходом 38% из силилированного *пара*-гидрокси-*мета*-метоксибензальдегида (схема 1).

Сокращения: GFP – зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein); FAST – fluorescence-activating and absorption-shifting tag.

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

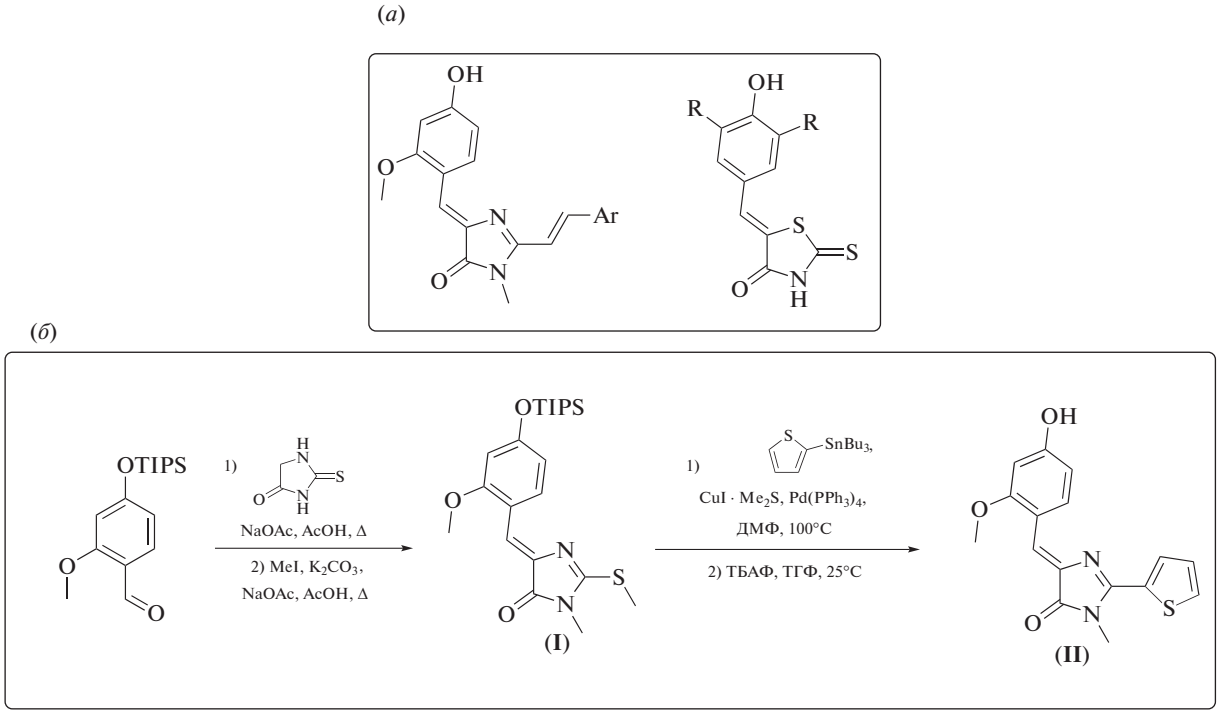


Схема 1. (*а*) – Примеры флуорогенов белка FAST; (*б*) – схема синтеза соединения (**II**).

Наличие гидроксигруппы в бензилиденовом фрагменте соединения (**II**) обеспечивает возможность перехода молекулы в анионную форму. Было установлено, что максимум абсорбции нейтральной формы составляет 432 нм, а анионной – 492 нм. Обе формы характеризуются очень слабой флуоресценцией в области 510–545 нм с квантовым выходом менее 0.05% (табл. 1).

Дальнейшее исследование показало, что соединение (**II**) проявляет ярко выраженные флуорогенные свойства. Добавление белка FAST в раствор соединения (**II**) приводит к увеличению интенсивности флуоресценции в 150 раз и батохромному смещению максимума абсорбции на 80 нм (рис. 1*а*). Последнее, очевидно, вызвано депротонированием гидроксигруппы, как и для других флуорогенов белка FAST [5]. Мы установили, что комплекс белка FAST с соединением (**II**) характеризуется квантовым выходом флуоресценции 2% и коэффициентом экстинкции 101500 $М^{-1}$ $см^{-1}$ (табл. 1). Таким образом, нам не удалось заметно повысить яркость, однако мы показали, что введение тиофенового фрагмента в структуру флуорогена позволяет значительно увеличить коэффициент экстинкции.

Мы исследовали возможность использования соединения (**II**) для окрашивания живых клеток линии HeLa Kyoto, трансфицированных конструкцией H2B-FAST. При добавлении соединения (**II**) в клеточную среду наблюдалось появление яркого флуоресцентного сигнала в отсутствие заметного нецелевого окрашивания (рис. 1*б*).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование. Спектры ЯМР (δ, м.д.; *J*, Гц) регистрировали на спектрометре Avance III (700 МГц; Bruker, США) при 303 K в DMSO-d_6 (внутренний стандарт – Me_4Si), спектры поглощения – на спектрофотометре Cary 100 Bio (Varian, США), спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США). Температуры плавления определяли на приборе SMP 30 (Stuart Scientific, Великобритания) и не исправляли. Масс-спектры высокого разрешения записывали на масс-спектрометре micrOTOF II (Bruker, Германия), ионизация электрораспылением.

(*Z*)-5-(2-Метокси-4-((триизопропилсилил)окси)бензилиден)-3-метил-2-(метилтио)-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он (I). Смесь 2-метокси-4-((триизопропилсилил)окси)бензальдегида (2 г, 6.5 ммоль), 2-тиоксоимидазолидин-4-она (0.58 г, 5 ммоль) и ацетата натрия (1.76 г, 21.5 ммоль) в уксусной кислоте (15 мл) кипятили в течение 3 ч. Затем при интенсивном перемешивании реакционную смесь разбавляли водой (50 мл). Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой (20 мл) и диэтиловым эфиром (10 мл), сушили под вакуумом. Полученный осадок растворяли в ацетонитриле (65 мл), добавляли иодметан (1.6 мл, 3.7 г, 26 ммоль) и карбонат калия (3.6 г, 26 ммоль). Реакционную смесь кипятили 8 ч, затем охлаждали до комнатной температуры и упаривали на роторном испарителе до четверти исходного объема. Затем остаток разбавляли этилацетатом (350 мл), промывали насыщенным

Таблица 1. Оптические свойства соединения (**II**) в фосфатном буфере в свободном виде и в виде комплекса с белком FAST

Соединение/комплекс		Положение максимума абсорбции, нм	Коэффициент экстинкции, M^{-1} $см^{-1}$	Положение максимума эмиссии, нм	Квантовый выход флуоресценции, %	K_d, мкМ
Соединение (**II**)	Нейтральная форма	432	75000	~510	<0.05	–
	Анионная форма	492	152500	545	<0.05	–
Комплекс белка FAST с соединением (**II**)		512	101500	543	2	0.21

раствором NaCl (150 мл), высушивали над безводным Na_2SO_4 и упаривали на роторном испарителе. Полученный продукт дополнительно очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент хлороформ–этанол, 99 : 1). Желтый порошок (1.7 г, 61%); т. пл. 152–154°C.

^{1}H-ЯМР: 8.74 (д, J_2 8.8, 1 H), 7.15 (с, 1 H), 6.58 (дд, J_2 8.5, 2.2, 1 H), 6.50 (д, J_2 2.3, 1 H), 3.85 (с, 3 H), 3.07 (с, 3 H), 2.70 (с, 3 H), 1.31 (кв, J_2 7.5, 3 H), 1.09 (д, J_2 7.5, 18 H).

^{13}C-ЯМР: 168.9, 164.0, 159.8, 158.8, 136.0, 133.1, 116.2, 115.3, 112.1, 102.9, 55.7, 26.2, 17.6, 12.4, 12.0.

HRMS (ESI) *m/z*: найдено *M* 435.2129; рассчитано для $C_{22}H_{35}N_2O_3SSi^+$, $[M]^+$ 435.2132.

5-((*Z*)-4-Гидрокси-2-метоксибензилиден)-3-метил-2-(тиофен-2-ил)-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он (II). (*Z*)-5-(2-Метокси-4-((триизопропилсилил)окси)бензилиден)-3-метил-2-(метилтио)-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он (0.43 г, 1 ммоль) растворяли в диметилформамиде (20 мл), добавляли 2-(трибутилстаннил)тиофен (0.35 мл, 1.1 ммоль), раствор CuI · Me_2S в диэтиловом эфире (0.84 М, 1.9 мл, 2.2 ммоль) и тетракис(трифенилфосфин)палладий (0.06 г, 0.05 ммоль) и перемешивали при температуре 100°C в течение 15 ч в инертной атмосфере. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли этилацетатом (100 мл), промывали водой (3 × × 25 мл), насыщенным раствором хлорида натрия (3 × 25 мл), высушивали над безводным Na_2SO_4 и упаривали на роторном испарителе. Полученный остаток растворяли в тетрагидрофуране (50 мл), добавляли фторид тетрабутиламмония (0.48 г, 1.5 ммоль) и перемешивали 1 ч при комнатной температуре. Затем реакционную смесь разбавляли этилацетатом (100 мл), промывали фосфатным буфером (pH 7; 5 × 25 мл), насыщенным раствором NaCl (3 × 25 мл), высушивали над безводным Na_2SO_4 и упаривали на роторном испарителе. Полученный продукт дополнительно очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент гексан–этилацетат, 1 : 1). Оранжевый порошок (0.2 г, 62%); т. пл. ~245°C с разложением.

^{1}H-ЯМР: 10.33 (с, 1 H), 8.71 (д, J_2 8.6, 1 H), 7.96–7.96 (м, 2 H), 7.39 (с, 1 H), 7.32–7.29 (м, 1 H), 6.53 (дд, J_2 8.6, 2.1, 1 H), 6.47 (д, J_2 2.1, 1 H), 3.85 (с, 3 H), 3.44 (с, 3 H).

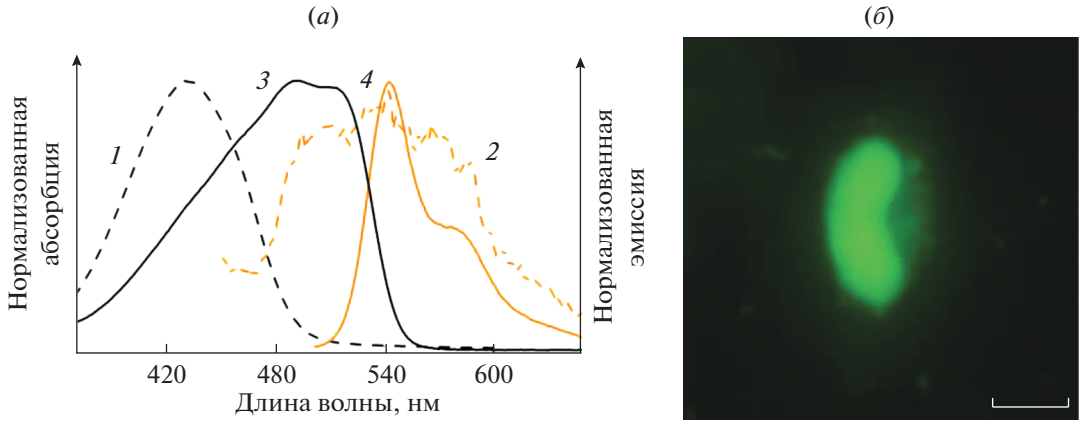


Рис. 1. (*а*) – Спектры абсорбции (черный) и эмиссии (оранжевый) соединения (**II**) в свободном виде (пунктирные кривые *1* и *2*) и в виде комплекса с белком FAST (сплошные кривые *3* и *4*) в фосфатном буфере; (*б*) – флуоресцентная микроскопия живых клеток HeLa Kyoto, временно трансфицированных конструкцией, кодирующей H2B-FAST. Конечная концентрация соединения (**II**) в растворе – 20 мкМ. Масштабный отрезок – 10 мкм.

^{13}C-ЯМР: 170.0, 162.1, 160.7, 154.4, 135.1, 133.9, 132.3, 131.8, 130.5, 128.9, 119.9, 114.3, 108.8, 98.7, 55.6, 28.3.

HRMS (ESI) *m/z*: найдено *M* 315.0794; рассчитано для $C_{16}H_{15}N_2O_3S^+$, $[M]^+$ 315.0798.

Экспрессия и выделение белка FAST. Препарат белка FAST получали согласно методике, опубликованной ранее [7].

Флуоресцентная микроскопия. Клеточную линию HeLa Kyoto (получена из EMBL) выращивали в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с 50 ед./мл пенициллина, 50 мг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия), 2 мМ L-глутамина (ПанЭко, Россия) и 10% бычьего сывороточного альбумина (HyClone, Thermo Scientific, США) при 37°C и 5% CO_2. Для временной трансфекции использовали трансфекционный агент FuGENE 6 (Promega, США). Конструкция H2B-FAST, кодирующая белок слияния гистона H2B с белком FAST, была собрана по стандарту GoldenGate [14]. Непосредственно перед съемкой среду DMEM заменяли на раствор Хэнкса (ПанЭко, Россия) с 20 мМ HEPES (Sigma, США).

Широкопольную флуоресцентную микроскопию проводили с помощью микроскопа Leica 6000 (Leica, Германия) с объективом HCX PL APO 100X/1.40-0.70NA. Микроскоп оснащен камерой Zyla sCMOS (Andor) и источником света CoolLED pE-300. При съемке использовали GFP-фильтр. Концентрация флуорогена в среде для имиджинга составляла 20 мкМ, мощность облучения – 2.5 Вт/см^2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезировано новое производное хромофора GFP, содержащее тиофеновый заместитель во втором положении имидазолонового фрагмента. Установлено, что это соединение способно формировать флуоресцентный комплекс с белком FAST, характеризующийся интенсивным поглощением с коэффициентом экстинкции 101500 М$^{-1}$ см$^{-1}$. Таким образом, можно заключить, что тиофеновые производные хромофоров флуоресцентных белков – перспективная основа для создания новой группы флуорогенов белка FAST, а также прочих флуороген-активирующих белков или иных мишеней.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-33-90142).

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. *Xu S., Hu H.Y.* // Acta Pharm. Sin. B. 2018. V. 8. P. 339–348. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.02.001
2. *Péresse T., Gautier A.* // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 6142. https://doi.org/10.3390/ijms20246142
3. *Gallo E.* // Bioconjugate Chem. 2020. V. 31. P. 16–27. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00710
4. *Baldridge A., Feng S., Chang Y.T., Tolbert L.M.* // ACS Comb. Sci. 2011. V. 13. P. 214–217. https://doi.org/10.1021/co200025e
5. *Plamont M.A., Billon-Denis R., Maurin S., Gauron C., Pimenta F.M., Specht C.G., Shi J., Quérard J., Pan B., Rossignol J., Moncoq K., Morellet N., Volovitch M., Lescop E., Chen Y., Triller A., Vriz S., Saux T., Jullien L., Gautier A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. P. 497–502. https://doi.org/10.1073/pnas.1513094113
6. *Li C., Plamont M.A., Sladitschek H.L., Rodrigues V., Aujard I., Neveu P., Saux T., Jullien L., Gautier A.* // Chem. Sci. 2017. V. 8. P. 5598–5605. https://doi.org/10.1039/C7SC01364G
7. *Povarova N.V., Zaitseva S.O., Baleeva N.S., Smirnov A.Y., Myasnyanko I.N., Zagudaylova M.B., Bozhanova N.G., Gorbachev D.A., Malyshevskaya K.K., Gavrikov A.S., Mishin A.S., Baranov M.S.* // Chem. Eur. J. 2019. V. 25. P. 9592–9596. https://doi.org/10.1002/chem.201901151
8. *Myasnyanko I.N., Gavrikov A.S., Zaitseva S.O., Smirnov A.Yu., Zaitseva E.R., Sokolov A.I., Malyshevskaya K.K., Baleeva N.S., Mishin A.S., Baranov M.S.* // Chem. Eur. J. 2020. V. 27. P. 3986–3990. https://doi.org/10.1002/chem.202004760
9. *Li C., Tebo A.G., Thauvin M., Plamont M., Volovitch M., Morin X., Vriz S., Gautier A.* // Angew. Chemie. 2020. V. 132. P. 18073–18079. https://doi.org/10.1002/ange.202006576
10. *Sun Y., Qu Z., Zhou Z., Gai L., Lu H.* // Org. Biomol. Chem. 2019. V. 17. P. 3617–3622. https://doi.org/10.1039/c9ob00030e
11. *Kubota Ya., Kimura K., Jin J., Manseki K., Funabiki K., Matsui K.* // New J. Chem. 2019. V. 43. P. 1156–1165. https://doi.org/10.1039/C8NJ04672G
12. *Oumouch S., Bourotte M., Schmitt M., Bourguignon J.-J.* // Synthesis. 2005. V. 1. P. 25–27. https://doi.org/10.1055/s-2004-834935
13. *Gosling S., Rollin P., Tatibouët A.* // Synthesis. 2011. V. 22. P. 3649–3660. https://doi.org/10.1055/s-0030-1260259
14. *Engler C., Kandzia R., Marillonnet S.* // PLoS One. 2008. V. 3. P. e3647. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003647

Thiophene Analog of the GFP Chromophore as Fluorogen for FAST Protein

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

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

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

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

We report novel thiophene derivative of the GFP chromophore. The introduction of thiophene substituent leads to increase absorption intensity. Thiophene analogs can be used as fluorogens for the fluorogen-activating protein FAST protein in fluorescent microscopy.

Keywords: fluorogens, fluorogen-activating proteins, fluorescence

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 5, с. 652–656

ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 57.083.18

МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ ПЦР НА ЧИПЕ С ПРЯМОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ УДЛИНЕНИЯ ИММОБИЛИЗОВАННОГО ПРАЙМЕРА

© 2021 г. С. А. Лапа*, #, Е. С. Клочихина*, Р. А. Мифтахов*, А. С. Заседателев*, А. В. Чудинов*

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

Поступила в редакцию 09.12.2020 г.
После доработки 26.12.2020 г.
Принята к публикации 27.12.2020 г.

Разработан вариант мультиплексной ПЦР на чипе с прямой детекцией удлинения иммобилизованного праймера. Детекция осуществляется определением флуоресцентного сигнала встраиваемых в растущую цепь флуоресцентно-меченных dUTP. Благодаря такому подходу образуется удлиненный праймер, иммобилизованный на твердой фазе, несущий в своей цепи несколько ковалентно связанных флуоресцентных меток (их количество зависит от AT-состава и длины ПЦР-продукта), что позволяет полностью удалять все компоненты смеси после проведения ПЦР и тем самым резко снижать фоновый сигнал и увеличивать чувствительность анализа на гидрогелевых биочипах. Метод успешно применен для дифференциального обнаружения важных бактериальных возбудителей пневмонии человека – *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*, в том числе в одном анализируемом образце.

Ключевые слова: мультиплексная ПЦР в иммобилизованной фазе, гидрогелевые биочипы, флуоресцентно-меченные dUTP, инфекционная пневмония

DOI: 10.31857/S0132342321050298

ВВЕДЕНИЕ

Ускоренное дифференциальное определение возбудителя – важная задача клинической молекулярной биологии. Методы, основанные на ПЦР в едином общем объеме, ограничены степенью мультиплексности системы, требуют строгих расчетов при конструировании праймеров и визуальной детекции с помощью гель-электрофореза, причем из-за сходной длины ПЦР-продуктов интерпретация может быть в высокой мере субъективной. Методы, основанные на ПЦР в общем объеме с последующей гибридизацией продуктов в иммобилизованной фазе – трудоемки и требуют значительного времени для осуществления анализа, а в ряде случаев – методических усложнений [1]. Методы, основанные на ПЦР с применением биологических микрочипов, используют в качестве стадии детекции гибридизацию удлиненного в растворе флуоресцентно-меченного праймера (ПЦР-продукта) либо избытка того же непрореагировавшего праймера с удлиненным иммобилизованным праймером [2–4]. Квазиравновесная процедура отмывки прогибридизованного продукта может вносить искажения в результирующую картину сигналов чипа. Использование флуоресцентных праймеров, находящихся в растворе, увеличивает неспецифический флуоресцентный фон при детекции сигнала.

Предлагаемый подход – мультиплексная ПЦР с прямой детекцией флуоресцентного сигнала удлиненного иммобилизованного праймера – позволяет избежать этих недостатков, увеличивает скорость проведения анализа и чувствительность диагностической системы за счет полного удаления всех компонентов жидкой фазы (реакционной смеси "над поверхностью чипа").

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами была разработана мультиплексная ПЦР для видового определения пяти основных возбудителей бактериальной пневмонии человека [5]. В настоящей работе использованы праймеры, специфичные к двум основным возбудителям инфекционной пневмонии, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*, фланкирующие регионы генов *ebpS* и *cpsB* соответственно. Ген эластин-связывающего белка *ebpS* (elastin-binding

Сокращения: *ebpS* – ген, кодирующий эластин-связывающий белок S (EbpS); *cpsB* – ген, кодирующий протеиновую тирозинфосфатазу B (CpsB).

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (495) 135-98-00; эл. почта: lapa@biochip.ru).

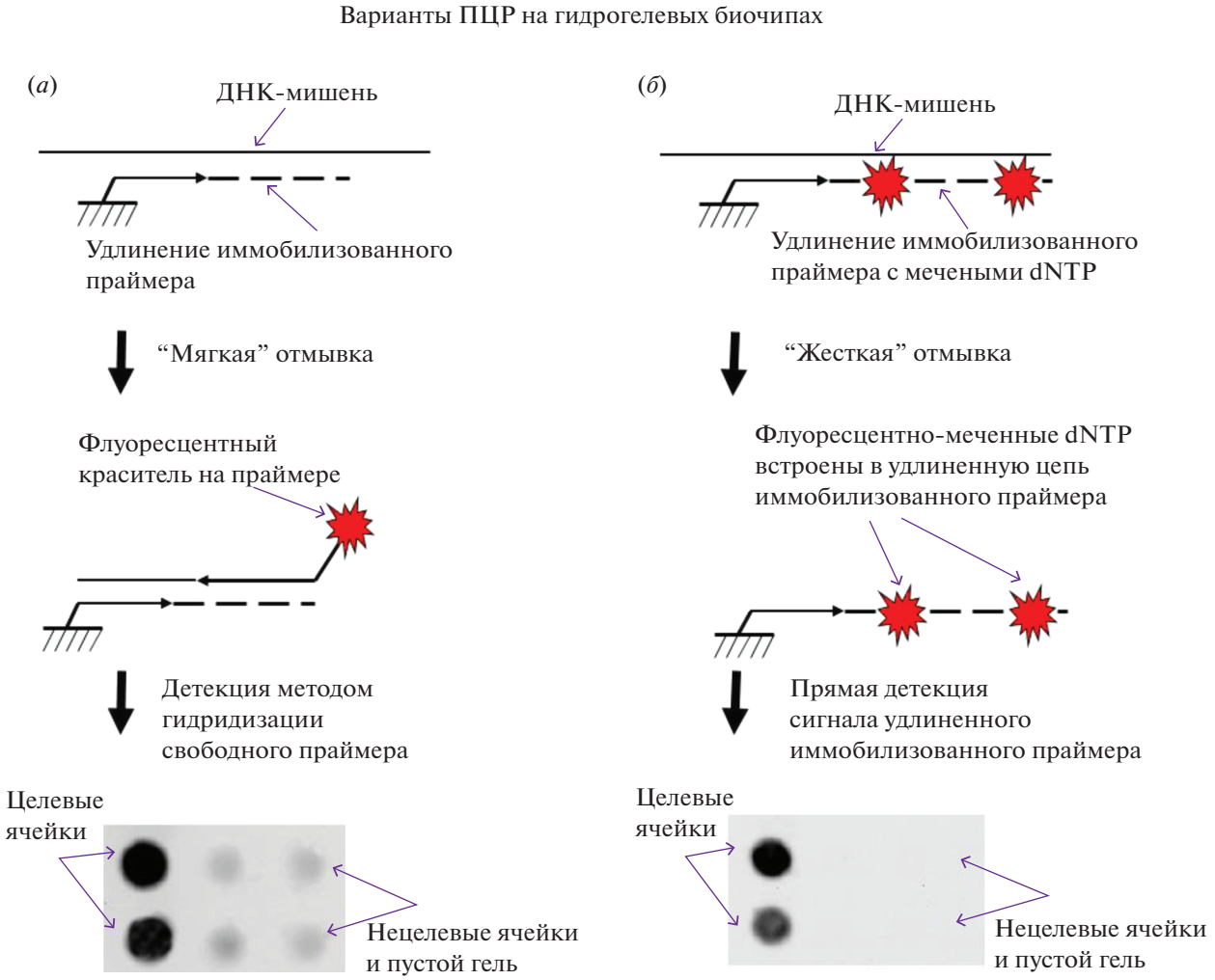


Рис. 1. Схема вариантов ПЦР на гидрогелевых биочипах: (*а*) – стандартный вариант ПЦР с использованием свободного (не иммобилизованного) флуоресцентно-меченного праймера в смеси; (*б*) – предлагаемый вариант ПЦР с использованием иммобилизованного праймера, содержащего флуоресцентно-меченный dUTP.

protein S) относится к группе генов *S. aureus*, которые кодируют белки, участвующие в связывании молекул на поверхности клеток [6]. Стрептококковый ген *cpsB* (tyrosine-protein phosphatase B) участвует в регуляции биосинтеза капсульных полисахаридов [7]. Обе генетические мишени используются в качестве видоспецифичных маркеров для определения вышеуказанных возбудителей.

На рис. 1 показана схема анализа образцов: с применением стандартной технологии гидрогелевых биочипов (рис. 1*а*) и с применением предлагаемого способа прямой детекции удлинения иммобилизованного праймера после проведения реакции (рис. 1*б*). Стандартный подход подразумевает использование дополнительной стадии после проведения ПЦР – гибридизации находящегося в растворе меченого праймера (а также продуктов амплификации) с удлиненным иммобилизованным праймером. Это требует тонкой оптимизации условий гибридизации и на практике приводит к высокому фоновому сигналу из-за неспецифического связывания флуоресцентно-меченного праймера с гелевыми ячейками и с неспецифическими иммобилизованными праймерами.

В предлагаемом нами подходе применяется "жесткая" отмывка, возможная благодаря включению флуоресцентно-меченных нуклеотидов (Cy5-dUTP) в иммобилизованную растущую цепь в процессе ПЦР, что резко снижает уровень неспецифических сигналов: достигнуто среднее отношение сигнал/фон, равное (30–35)/1 (в зависимости от нуклеотидной последовательности праймера), в то время как для стандартной технологии ПЦР на биочипе характерны значения (5–15)/1 для тех же праймеров.

На рис. 2 продемонстрированы результаты мультиплексной ПЦР на гидрогелевом биочипе

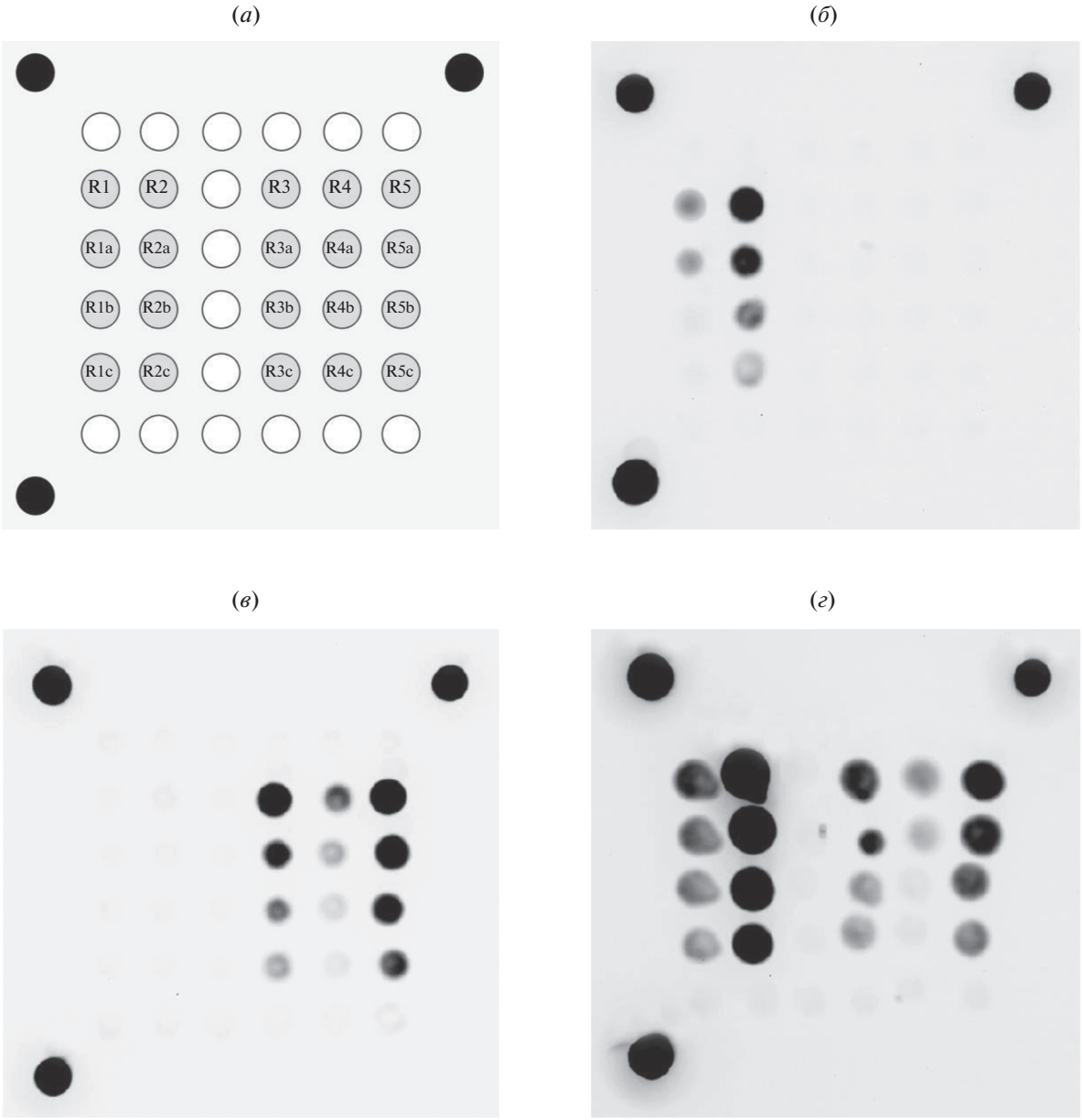


Рис. 2. Результаты ПЦР на гидрогелевом биочипе. (*а*) – Схема биочипа для проведения ПЦР в иммобилизованной фазе: маркеры для пространственного позиционирования чипа в чип-детекторе обозначены черным, ячейки пустого геля – белым, ячейки с иммобилизованными праймерами – серым; R1 и R2 – праймеры, специфичные к *Staphylococcus aureus* (ген *ebpS*); R3–R5 – праймеры, специфичные к *Streptococcus pneumoniae* (ген *cpsB*); концентрации праймеров: без литеры – 8000 пмоль/мкл, литера a – 4000 пмоль/мкл, литера b – 2000 пмоль/мкл, литера c – 1000 пмоль/мкл; (*б*) – детекция *Staphylococcus aureus*; (*в*) – детекция *Streptococcus pneumoniae*; (*г*) – детекция смеси *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae* в одном исследуемом образце.

для дифференциального обнаружения в образце двух наиболее значимых бактериальных возбудителей пневмонии человека: *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*. Проводили тестирование образцов, содержащих как один возбудитель, так и два возбудителя в одном анализируемом образце. Наблюдали только сигналы специфичных к мишеням ячеек чипа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы. В работе использовали деконтаминированную полногеномную ДНК бактериальных штаммов из коллекции Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (п. Оболенск, Россия): *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 и *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

Выделение ДНК из клеточных культур осуществляли CTAB-методом [8].

Праймеры. Множественное выравнивание последовательностей геномных мишеней (не менее 20 последовательностей для каждой мишени) проводили с помощью алгоритма ClustalW (www.clustal.org). Конструирование праймеров осуществляли с помощью сетевого ресурса www.idtdna.com, анализ специфичности проводили с использованием алгоритма BLAST (NIH, США).

Праймеры, специфичные к *Staphylococcus aureus*, ген *ebpS*: прямой ebpS-f (5'-ACTCGACTGAGGATAAAGCGTCT-3'), обратный ebpS-r (5'-CCTCCAAATATCGCTAATGCACC-3'), иммобилизованные R1 (5'-NH_2-CCTCCAAATATCGCTAATGCACC-3'), R2 (5'-NH_2-GGTAACAATACTTTGGCCATGCCACC-3'); длина ПЦР-продукта – 283 п.н.

Праймеры, специфичные к *Streptococcus pneumoniae*, ген *cpsB*: cpsB-f (5'-TTGATGTAGATGACGGTCCCAAG-3'), обратный cpsB-r (5'-TATATCTCTGCGCCATAAGCAAT-3'), иммобилизованные R3 (5'-NH_2-TATATCTCTGCGCCATAAGCAAT-3'), R4 (5'-NH_2-CGAACCTGAAGAAAGTTTTCTG-3'), R5 (5'-NH_2-GCAATGACTAAATCATCTGCCAC-3'); длина ПЦР-продукта – 217 п.н.

Мультиплексная ПЦР в иммобилизованной фазе. Реакционная смесь (30 мкл) содержала 1.5 ед. Taq-полимеразы (Thermo Scientific, США) в буфере той же фирмы, dNTP в концентрации 400 мкМ каждого, праймеры и полногеномную бактериальную матрицу (либо смесь бактериальных ДНК) в количестве 10^3–10^5 копий. В качестве флуоресцентного субстрата для полимеразы использовали Cy5-dUTP [9] в концентрации 8 мкМ. Смесь помещали на биочип и герметизировали реакционный объем с помощью Frame-Seal (25 мкл; Bio-Rad, США). Биочип представлял собой обработанное силикатное стекло либо полимерную подложку с матрицей гидрогелевых ячеек, в которых были иммобилизованы праймеры с первичной аминогруппой на 5'-конце, изготовленные по методу Rubina et al. [10]. Реакцию проводили на ДНК-амплификаторе TGradient (Biometra, США) для *in situ* ПЦР при следующих условиях: 95°C – 3 мин (начальная денатурация); 36 циклов: 95°C – 20 с, 64°C – 30 с, 72°C – 40 с; далее 72°C – 5 мин (завершающая инкубация).

После проведения ПЦР проводили “жесткую” отмывку биочипа в 1%-ном водном растворе Tween-20 в течение 2 мин при 100°C. Флуоресцентные сигналы регистрировали на специализированном анализаторе биочипов [11] разработки ИМБ РАН (Россия) при длине волны возбуждения, соответствующей Cy5 (~650 нм).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан и применен метод детекции возбудителей пневмонии *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*, основанный на мультиплексной ПЦР в иммобилизованной фазе. Ковалентное встраивание меток в удлиняющийся иммобизованный праймер позволяет полностью удалять реакционный раствор после проведения ПЦР и тем самым резко снижать фоновый сигнал и увеличивать чувствительность анализа на гидрогелевых биочипах.

На основе продемонстрированного подхода предполагается создание тест-системы с расширенным спектром диагностируемых возбудителей инфекционной пневмонии для применения в ускоренной клинической диагностике.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 20-14-00287).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tang X., Morris S.L., Langone J.J., Bockstahler L.E.* // J. Microbiol. Methods. 2005. V. 63. P. 318–330. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.04.026
2. *Mikhailovich V., Lapa S., Gryadunov D., Sobolev A., Strizhkov B., Chernyh N., Skotnikova O., Irtuganova O., Moroz A., Litvinov V., Vladimirskii M., Perelman M., Chernousova L., Erokhin V., Zasedatelev A., Mirzabekov A.* // J. Clin. Microbiol. 2001. V. 39. P. 2531–2540. https://doi.org/10.1128/JCM.39.7.2531-2540.2001
3. *Pemov A., Modi H., Chandler D.P., Bavykin S.* // Nucleic Acids Res. 2005. V. 33. P. e11.
4. *Cooney C., Sipes D., Thakore N., Holmberg R., Belgrader P.* // Biomed. Microdevices. 2012. V. 14. P. 45–53. https://doi.org/10.1093/nar/gnh184
5. *Лапа С.А., Клочихина Е.С., Мифтахов Р.А., Золотов А.М., Заседателев А.С., Чудинов А.В.* // Биоорг. химия. 2020. Т. 46. С. 550–552. [*Lapa S.A., Klochikhina E.S., Miftakhov R.A., Zolotov A.M., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 859–861.] https://doi.org/10.1134/S1068162020050131
6. *Downer R., Roche F., Park P.W., Mecham R.P., Foster T.J.* // J. Biol. Chem. 2002. V. 4. P. 243–250. https://doi.org/10.1074/jbc.M107621200

7. *Morona J.K., Morona R., Miller D.C., Paton J.C.* // J. Bacteriol. 2002. V. 184. P. 577–583. https://doi.org/10.1128/jb.184.2.577-583.2002
8. *Doyle J.J., Doyle J.L.* // Phytochem. Bulletin. 1987. V. 19. P. 11–15.
9. *Shershov V.E., Lapa S.A., Kuznetsova V.E., Spitsyn M.A., Guseinov T.O., Polyakov S.A., Stomahin A.A., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V.* // J. Fluoresc. 2017. V. 27. P. 2001–2016. https://doi.org/10.1007/s10895-017-2139-6
10. *Rubina A.Yu., Pan'kov S.V., Dementieva E.I., Pen'kov D.N., Butygin A.V., Vasiliskov V.A., Chudinov A.V., Mikheikin A.L., Mikhailovich V.M., Mipzabekov A.D.* // Anal. Biochem. 2004. V. 325. P. 92–106. https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.10.010
11. *Lysov Yu., Barsky V., Urasov D., Urasov R., Cherepanov A., Mamaev D., Yegorov Ye., Chudinov A., Surzhikov S., Rubina A., Smoldovskaya O., Zasedatelev A.* // Biomed. Opt. Express. 2017. V. 8. P. 114798. https://doi.org/10.1364/BOE.8.004798

Multiplex on-Chip PCR with Direct Detection of Immobilized Primer Elongation

S. A. Lapa*, #, E. S. Klochikhina*, R. A. Miftakhov*, A. S. Zasedatelev*, and A. V. Chudinov*

#Phone: +7 (495) 135-98-00; e-mail: lapa@biochip.ru

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

A variant of multiplex PCR on a chip with direct detection of immobilized primer elongation has been developed. Detection is performed by determining the fluorescence signalof labeled dUTPs incorporated in the growing chain. This approach creates an elongated immobilized primer with covalently boundfluorescent label. The product of a primerelongation carries several fluorescent labels (depending on the A-T composition and length of the PCR product), which allows completely remove all the components of the mixture after PCR and thus dramatically reduce the background signal and increase the sensitivity of analysis on hydrogel microchips. The method was successfully applied for differential detection of important bacterial pathogens of human pneumonia *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*, including testing of the one analyzed sample for the both pathogens.

Keywords: multiplex PCR in the immobilized phase, hydrogel microchips, fluorescently labeled dUTP, infectious pneumonia