## СОДЕРЖАНИЕ

## Том 46, номер 1, 2020

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

Основы биологии микроРНК: строение, биогенез и регуляторные функции (Обзорная статья)	
И. А. Запорожченко, Е. Ю. Рыкова, П. П. Лактионов	3
Димерные (олигомерные) производные циклодекстринов как новый класс супрамолекулярных систем. Синтез и соединения включений на их основе (Мини-обзорная статья)	
М. К. Грачев, И. В. Терехова, Д. А. Шипилов, Н. В. Кутяшева, Е. Ю. Емельянова	18
Конвергентный синтез галанина крысы и изучение его биологической активности	
М. В. Сидорова, М. Е. Палькеева, Д. В. Авдеев, А. С. Молокоедов, М. В. Овчинников, А. А. Азьмуко, Л. И. Серебрякова, О. М. Веселова, И. М. Студнева, О. И. Писаренко	36
Применение моноклональных антител и технологии фагового дисплея для анализа белка YB-1	
А. Г. Ламан, А. О. Шепеляковская, Ф. А. Бровко, С. В. Сизова, М. В. Артемьев, В. А. Олейников	47
Устранение мультимеризации ДНК, возникающей при изотермической амплификации в присутствии ДНК-полимеразы BST exo-	
А. Р. Сахабутдинова, Л. Р. Мирсаева, И. П. Оскорбин, М. Л. Филипенко, Р. Р. Гарафутдинов	56
Структура О-специфического полисахарида и липида А типового штамма бактерий <i>Azospirillum rugosum</i> DSM-19657	
Е. Н. Сигида, М. С. Кокоулин, П. С. Дмитренок, В. С. Гринёв, Ю. П. Федоненко, С. А. Коннова	65
Ингибирование чувства кворума: успехи в применении природных противомикробных агентов	
M. Asif and M. Imran	77
Влияние экспрессии секвестосомы-1/p62 на аутофагию фибробластов надкостницы зуба человека, вызванную <i>Porphyromonas gingivalis</i>	
Han Su, Yibo Zhang, Yongju Chen, Bingjun Fan, Bo Hao, and Xin Li	78
Амфифильные катионные производные β-циклодекстрина, содержащие остатки 2-(4-изобутилфенил)- и 2-(3-бензоилфенил)пропионой кислоты	
М. А. Маленковская, Д. А. Шипилов, М. К. Грачев	79
Дизайн противоопухолевых агентов на основе хромон-пиразола	
Marwa S. Salem, Eman A. E. El-Helw, and Hamed A. Y. Derbala	86

Синтез, реакции и антимикробная активность новых гетероциклических соединений, содержащих циклопента[d]тиено[2,3-b]пиридиновый остаток и родственные конденсированные гетероциклы	
Remon M. Zaki, Adel M. Kamal El-Dean, Shaban M. Radwan, and Mahmoud A. Ammar	87
Простой синтез новых гибридных производных 2-хинолинона — потенциальных противораковых препаратов для лечения рака молочной железы	
Safyah B. Bakare	88
Синтез и оценка биологической активности новых стероидных производных 5α,8α-эндопероксида с ароматическими гидразонами в боковой цепи в качестве противоопухолевых агентов	
H. J. Wang, M. Bu, J. Wang, L. Liu, and S. Zhang	89
Синтез и оценка биологической активности некоторых гибридных сукцинимидов	
Fatih Yılmaz, Emre Menteşe, and Nimet Baltaş	90
Дизайн, синтез, исследования <i>in silico</i> и противомикробная активность ряда тиадазинов и 1,2,4-триазол-3-тионов, несущих пиразоловую группу	
Soukhyarani Gopal Nayak and Boja Poojary	91
Анксиолитическая активность производных 11 <i>H</i> -2,3,4,5-тетрагидро[1,3]диазепино[1,2- <i>а</i> ]бензимидазола и 2-меркаптобензимидазола	
А. А. Спасов, О. Н. Жуковская, Д. В. Мальцев, М. В. Мирошников, М. О. Скрипка, К. Т. Султанова, А. С. Морковник	92
Синтез и цитотоксическая активность ряда функционализированных 2,3-алленоатов	
Р. Н. Маликова, И. М. Сахаутдинов, М. А. Максимова, У. Ш. Кузьмина, Ю. В. Вахитова, М. С. Юнусов	101
ПИСЬМО РЕДАКТОРУ	
Синтез и оптические свойства нового аналога хромофора белка Kaede	
С. О. Зайцева, Э. Р. Зайцева, А. Ю. Смирнов, Н. С. Балеева, М. С. Баранов	106
Правила для авторов 2020	110



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2020, том 46, № 1, с. 3–17

УДК 577.241

## ОСНОВЫ БИОЛОГИИ микроРНК: СТРОЕНИЕ, БИОГЕНЕЗ И РЕГУЛЯТОРНЫЕ ФУНКЦИИ

© 2020 г. И.А. Запорожченко\*, \*\*, <sup>#</sup>, Е.Ю. Рыкова\*, \*\*, П.П. Лактионов\*, \*\*

\*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Россия, 630090, Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева 8

\*\*ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр имени Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения РФ, Россия, 630055, Новосибирск, Новосибирская обл., Речкуновская ул. 15

> Поступила в редакцию 08.07.2019 г. После доработки 31.07.2019 г. Принята к публикации 09.09.2019 г.

Эпигенетическая регуляция экспрессии играет ключевую роль в контроле многих клеточных процессов. Важными участниками такой регуляции являются микроРНК, представляющие собой короткие некодирующие РНК. Впервые микроРНК были обнаружены в 1993 г., однако их активное исследование началось лишь с 2000-х годов. Современные данные указывают на то, что микроРНК могут контролировать экспрессию как минимум половины генов человека. Будучи вовлеченными в регуляцию большого количества генов-мишеней, отвечающих за жизнедеятельность клетки, микроРНК необходимы для нормального развития и функционирования организма, а нарушение их функций сопутсвует развитию многих патофизиологических процессов. В настоящем обзоре описаны основные стадии "жизненного цикла" молекул микроРНК в клетках человека. Отдельные разделы посвящены происхождению, созреванию, функциям и регуляции активности микроРНК. Обзор рассчитан в первую очередь на читателей, желающих впервые познакомиться с особенностями биологии этих РНК, однако может быть полезен и специалистам в этой области в качестве справочного материала.

Ключевые слова: микроРНК, созревание, функции, механизм действия, пост-транскрипционная регуляция экспрессии, RISC

DOI: 10.31857/S0132342320010182

#### введение

В 1993 г. Ли с соавторами обнаружили у Caenorhabditis elegans короткую РНК, продукт гена lin-4, обладавшую антисмысловой комплементарностью к РНК гена lin-14 [1]. Это первое свидетельство существования микроРНК не вызвало большого резонанса – находке не придали особого значения и приписали статус артефакта. Спустя почти десять лет, в 2000 г., Рейнхарт с коллегами обнаружили короткую некодирующую РНК let-7, которая обладала комплементарностью к участку 3' нетранслируемой области (3'-НТО) продукта гена lin-41 и, посредством взаимодействия с ней, регулировала ход поздних стадий развития C. elegans [2]. Эта вторая находка послужила отправной точкой интереса научного сообщества к таким молекулам и вскоре исследователями было обнаружено огромное многообразие молекул со сходными свойствами. Из-за небольшой длины им дали название микроРНК (microRNA, miRNA) и выделили в отдельный класс малых РНК [3-5]. Представители этого класса обнаружены у большинства животных и растений. Последняя редакция базы аннотированных микроРНК (miRBase, http://www.mirbase.org) содержит информацию о более чем 28000 потенциальных микроРНК у почти 100 биологических видов, в том числе 2400 микроРНК человека, из которых около 1000 определено с высоким уровнем доверия (high confidence) [6-8]. За последние два десятилетия проделана огромная работа по изучению биологии этих РНК – исследованы особенности структуры микроРНК, механизмы их созревания, определены основные функции микроРНК в клетке и спектр ассоциированных с ними белковых факторов.

#### ПРОИСХОЖДЕНИЕ И СОЗРЕВАНИЕ микроРНК

На данный момент известно несколько разных классов коротких регуляторных PHK, например, малые ядрышковые PHK (snoRNA, small nucleolar

Сокращения: RISC – РНК-индуцируемый комплекс выключения гена.

<sup>&</sup>lt;sup>#</sup> Автор для связи: (тел.: +7 (383) 363-51-44; факс: +7 (383) 363-51-53; эл. почта: ivanzap@niboch.nsc.ru).

Таблица 1.	. Структура	наименования	микроРНК
------------	-------------	--------------	----------

	Орга	НИЗМ	Тип		Номер		Цепь (копия для гена)
Ген	hsa	-	MIR	-	19a	_	1
Предшественник	hsa	_	mir	_	19a	_	1
Зрелая микроРНК	hsa	—	miR	_	19a	—	3p

RNA) [9], рімі-взаимодествующие РНК (ріRNA, piwi-interacting RNA) [10, 11], эндогенные малые интерферирующие PHK (endo-siRNA, endogenous small interfering RNA) [11, 12], короткие шпилечные PHK (shRNA, short hairpin RNA) [13], инициаторные PHK (tiRNA, transcription initiation RNA) [14]. Представителей класса микроРНК от других некодирующих РНК отличает совокупность особых характеристик зрелой молекулы, характер процесса созревания и особенности предшественников, а также ряд их характерных функций в клетке [15]. Зрелая молекула микроРНК представляет собой одноцепочечную молекулу РНК длиной 18-24 нт, выбираемую в процессе созревания из состава асимметричного РНК-дуплекса [16]. Вместе с одним из белков из семейства Аргонавтов (Argonaute, AGO) и вспомогательными белками, эта цепь микроРНК образует RISC – РНК-индуцируемый комплекс выключения гена (RNA-Induced Silencing Complex; в литературе можно также встретить понятия miRISC - miRNA-loaded RISC, и mature RISC, обозначающие функционально активный RISCкомплекс, содержащий в составе зрелую микроРНК). Этот рибонуклеиновый комплекс способен связывать и регулировать экспрессию мРНК мишеней, имеющих соответствующие цисрегуляторные элементы [17].

Номенклатура микроРНК. Для наименования микроРНК используется стандартизованная система имеющая вид hsa-miR-(N)-3/5p (табл. 1) [15]. Первые три буквы указывают видовую принадлежность микроРНК (в данном примере Ното sapiens) и во многих контекстах часто опускаются. Следующий трехбуквенный блок указывает, идет ли речь о зрелой одноцепочечной микроРНК (miR), ее предшественнике (mir или *mir*) или гене, кодирующем эту микроРНК (MIR или MIR). Далее идет порядковый номер (N), присваиваемый при аннотации, например, miR-17, после которого может следовать латинская буква (a, b, c и т.д.), используемая для указания близкого родства последовательностей микроРНК. Так, последовательности зрелых hsa-miR-19a-3p и hsa-miR-19b-3р отличаются лишь одним основанием. Дополнительные копии генов (или шпилечных предшественников), экспрессирующие идентичные зрелые микроРНК, обозначаются дополнительным порядковым номером — hsa-mir-121-1 и hsa-mir-121-2. Для зрелой микроРНК после номера через дефис следует индикатор цепи шпилечного предшественника, из которой происходит микроРНК (3р для 3', 5р для 5'). В литературе также можно встретить устаревший вариант обозначения цепей микроРНК, основанный на уровне экспрессии каждой цепи. При такой записи для указания направляющей или ведущей (guide) цепи, которая предпочтительно включается в RISC, дополнительных символов не используется, а комплементарная ей пассажирская (passenger) цепь отмечается звездочкой (\*), например, miR-17\*.

Следует отметить, что для обозначения ряда исключительных микроРНК, например, lin-4 и let-7, используются первоначально присвоенные им тривиальные названия, но при этом к ним применяются остальные правила нотации, описанные выше, к примеру, hsa-let-7b-5p.

Кодирование микроРНК в геноме. Последняя редакция базы аннотированных микроРНК miRBase (http://www.mirbase.org) содержит информацию о более чем 28000 потенциальных микроРНК у почти 100 биологических видов [7]. В том числе в miRBase представлены записи о 2400 отдельных микроРНК человека, из которых около 1000 определено с высоким уровнем доверия (high confidence) [8]. Корреляция между числом микроРНК и разнообразием клеточного состава организма позволяет предположить, что развитие этой системы регуляции может быть одним из ключевых эволюционных факторов усложнения организации. В совокупности с другими некодирующими РНК, существование микроРНК может отчасти объяснять отсутствие корреляции размера генома и числа пристутствуюших нем белок-кодирующих генов в С фенотипической сложностью организма (так называемые С- и G-парадоксы) [18, 19]. У сложных многоклеточных организмов количество генов микроРНК может исчисляться сотнями, в то время как у одноклеточных эукариот, например дрожжей Saccharomyces cerevisiae, они отсутствуют полностью [18, 20].

Исторически первые обнаруженные микроРНК являлись продуктами процессинга транскриптов специализированных микроРНК-кодирующих генов [1, 2, 4]. Фромм с соавторами с высокой степенью достоверности выявили 519 канонических генов микроРНК человека, которые расположены на всех аутосомах и Х-хромосоме человека и часто сгруппированы в кластеры [21– 23]. Гены в пределах одного кластера часто кодируют гомологичные микроРНК со схожим набором регулируемых мишеней, и образуют семейства микроРНК. При этом специализированные гены являются не единственным источником микроРНК – до 50% микроРНК млекопитающих происходит из транскриптов других генов [24, 25].

Основным источником "внутригенных" микроРНК являются интроны (такие микроРНК часто называют *миртроны*, miRNA + intron = mirtron), но при помощи биоинформатического анализа предсказано существование генов микроРНК в экзонах и регуляторных областях генов, соответствующих 3'- и 5'-нетранслируемым областям (НТО) [18, 26-30]. Часть интронных микроРНК (25-30%) имеет собственные промоторы, находящиеся в предшествующих интронах, транскрипция с которых независима от транскрипции гена-хозяина [29, 31, 32]. Внутригенные микроРНК могут транскрибироваться и процессироваться вместе с геном-хозяином, и в отдельных случаях показана корреляция между их экспрессией [24, 33], но в других исследованиях такая зависимость отсутствовала [30]. Кроме того, ряд авторов предполагают, что источником микроРНК могут служить другие некодирующие РНК, например, малые ядрышковые РНК (мяРНК) и транспортные РНК (тРНК), мобильные элементы генома и продукты процессированных псевдогенов [34-39].

Факт наличия у большинства животных явных гомологов основных белков, участвующих в созревании и функционировании микроРНК позволяет предполагать общее филогенетическое происхождение микроРНК-опосредованной регуляции у животных [20]. Это предположение подтверждается и тем, что многие микроРНК высоко консервативны, и их гомологи встречаются у видов, филогенетически далеко отстоящих друг от друга. Сравнительный анализ малых РНК метазоа показал, что miR-100 встречается у всех билатеральных животных, а также у кишечнополостного Nematostella vectensis [20]. Последовательность функциональных участков микроРНК эволюционно наиболее жестко закреплена, и эта консервативность снижается в ряду: 5'-концевой участок узнавания мишени; З'-последовательность, содержащая нуклеотиды, участвующие в компенсаторном спаривании; центральная часть основной цепи микроРНК; остальные части микроРНК-дуплекса [20, 40-42]. При этом регуляторные области мРНК, в составе которых есть сайты связывания микроРНК, также находятся под эволюционным давлением [43-45].

Созревание микроРНК. Механизм созревания микроРНК являлся одним из их классообразующих признаков [15]. В основе механизма созревания микроРНК лежит серия последовательных расщеплений незрелых молекул предшественников при помощи специфической или неспецифической РНК-гидролизующей активности белковых комплексов с образованием незрелой двуцепочечной молекулы микроРНК, одна из цепей которой затем включается в состав RISC [46]. Первоначально был предложен один универсальный механизм созревания микроРНК, характерный для специализированных генов микроРНК, однако впоследствии были обнаружены альтернативные источники микроРНК, и в связи с этим круг известных механизмов созревания микроРНК также расширился. В современной научной литературе принято деление путей процессинга микроРНК на канонический и ряд исключений. формирующих гетерогенную группу неканонических путей созревания микроРНК.

Канонический путь созревания микроРНК (рис. 1) начинается в клеточном ядре с транскрипции гена микроРНК РНК-полимеразой II (Pol II) с образованием *при-микроPHK* (pri-miRNA, primary miRNA), часто достигающей нескольких тысяч нуклеотидов в длину и подвергающейся 5'кэпированию и, часто, З'-полиаденилированию [47-49]. Исключение составляют гены, прилегающие к Alu-повторам, которые транскрибирует РНК-полимераза III (Pol III) [50]. Кластеры микроРНК часто транскрибируются с образованием длинных, вплоть до нескольких тысяч нуклеотидов, полицистронных молекул, которые служат источником предшественников нескольких разных микроРНК [33, 51]. При-микроРНК обладают сложной вторичной структурой с множеством шпилек, и могут дополнительно образовывать сложную трехмерную структуру, параметры которой определяют эффективность узнавания и процессинга белковыми факторами [52, 53].

На следующем шаге при-микроРНК подвергается в ядре гидролизу микропроцессорным комплексом или микропроцессором (microprocessor complex), состоящим из РНКазы III класса Drosha и белка DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene) [54-56]. За счет сродства к двуцепочечной РНК микропроцессор узнает в при-микроРНК шпильки, обладающие характерной структурой и несущие определенные нуклеотидные мотивы [57-62]. В результате гидролиза высвобождаются шпилечные молекулы РНК длиной ~70 нт, называемые предшественниками микроРНК или пре-микроРНК (precursor miRNA, premiRNA) и состоящие из петлевого одноцепочечного участка и двуцепочечного стебля (не всегда обладающего идеальной комплементарностью оснований), заканчивающегося выступающим 3'концом длиной в 2 нт [55, 63]. Эти структурные



**Рис. 1.** Канонический путь созревания микроРНК. На рисунке схематично представлены стадии превращения предшественников микроРНК – от транскрипции до образования активного RISC. Пояснения в тексте.

элементы необходимы для узнавания экспортином-5 (exportin-5, karyopherin-5), который при участии GTP-азы RanGTP переносит пре-микроРНК в цитоплазму клетки [64–66].

В цитоплазме пре-микроРНК передается комплексу белков, состоящему из РНКазы III класса Dicer, TRBP (transactivation response RNA-binding protein), PACT (protein kinase R activating protein), и одного из белков семейства Argonaute (AGO1-AGO4) [67]. Dicer узнает характерную структуру пре-микроРНК (неспаренные 5'- и 3'-концы, стебель и одноцепоченый петлевой участок [68-71]) и вырезает из нее петлевой участок. Это приводит к образованию асимметричных двуцепочечных молекул РНК длиной 19-24 п.о. с выступающими 3'-концами размером 2 нт – незрелых микроРНК (immature miRNA) [72, 73]. Гидролиз происходит на фиксированном расстоянии в ~22 п.о. от конца дуплекса, которое определяется взаимным пространственным расположением доменов белка, вследствие чего опознавание пре-микроРНК белком Dicer часто сравнивают с молекулярной "линейкой" [70, 74].

Завершающим этапом канонического пути созревания микроРНК является "загрузка" одной из цепей дуплекса на белок AGO с образованием RISC [75, 76]. Структура АGO высоко консервативна и состоит из четырех доменов: *N*-концевого, PAZ (PIWI-Argonaute-Zwille), MID (middle) и PIWI, попарно объединенных в субъединицы N-PAZ и MID-PIWI, которые соединены подвижным шарнирным участком [77, 78]. MID и PAZ домены содержат сайты связывания 5'- и 3'-концов микроРНК, соответственно [79, 80]. У человека существует четыре паралога AGO (AGO1-AGO4), не имеющих заметных функциональных и структурных различий [81]. Единственным исключением является эндонуклеазная активность AGO2. Наборы микроРНК, связанные с разными паралогами AGO различаются мало, но относительная избирательность загрузки микроРНК все же присутствует [82, 83].

В процессе загрузки микроРНК в RISC происходит перенос и связывание микроРНК белком AGO, выбор ведущей цепи, расплетание дуплекса и удаление второй цепи. Весь процесс загрузки обеспечивается работой шаперонов, в том числе комплекса Hsc70/Hsp90 [84-86]. Незрелый микроРНК-дуплекс передается на MID домен белка AGO сразу после гидролиза Dicer. Связывание микроРНК происходит асимметрично, и предпочтение обычно отдается концу дуплекса (нуклеотиды 1-4 с 5'-конца цепи) с наименьшей термодинамической стабильностью спаривания [87-89]. Ведущей становится цепь, 5'-конец которой участвует в таком спаривании. После успешного связывания конформационные изменения в AGO "утапливают" микроРНК во внутреннее пространство белка, где происходит связывание 3'-конца ведущей цепи, после чего молекула микроРНК изгибается и укладывается в специальный канал, разделяющий две субъединицы белка [77, 78, 82, 90]. Изгибание дуплекса приводит к его расплетению, в то время как *N*-концевой домен AGO выполняет роль клина, который разделяет цепи микроРНК, в результате чего пассажирская цепь, не имеющая связей с белком, вытесняется из комплекса [77, 78, 82, 91]. При загрузке на AGO2 в пассажирскую цепь также вносится одноцепочечный разрыв, что дополнительно облегчает ее высвобождение из RISC. За счет связывания белком 3'-конца и сахарно-фосфатного остова ведущей цепи микроРНК остается прочно закрепленной внутри AGO и выполняет роль "стержня", стабилизируя активную конформацию всего рибонуклеинового комплекса.

Неканонические пути созревания микроРНК отличаются тем, что в процессинге принимают участие не все белки канонического пути. Такие альтернативные пути принято делить на Droshaи Dicer-независимые. Известно несколько Drosha-независимых путей созревания микроРНК, в большинстве из которых предшественники микроРНК являются побочными продуктами процессинга других РНК (например, мяРНК и тРНК) и не требуют гидролиза при помощи микропроцессорного комплекса [92]. Так процессируются и предшественники ряда интронных микроРНК. Линеаризованные интроны могут формировать шпилечные структуры, которые затем процессируются при помощи Dicer [93-95]. Ярким примером Dicer-независимого процессинга является процесс созревания miR-451 – консервативной микроРНК, принимающей активное участие в дифференцировке клеток эритропоэтического ряда у позвоночных [96]. При-микроРНК mir-451 узнается и гидролизуется микропроцессорным комплексом, но получающаяся в итоге шпилечная структура имеет слишком короткий

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 46 № 1 2020

(17 п.о.) стебель для узнавания Dicer. Вместо этого предшественник напрямую загружается на AGO2, который надрезает одну из цепей, а затем полученный промежуточный продукт укорачивается при помощи poly(A)-специфичной рибонуклеазы (PARN) до получения зрелой молекулы длиной 23 нт [97–99].

Необходимо отметить, что различные варианты созревания микроРНК наблюдаются не только на этапах гидролиза предшественников. Например, известно, что 5'-кэпированые предшественники miR-320a и miR-484 переносит в цитоплазму экспортин-1 (exportin-1), а не экспортин-5 [100]. Недавнее исследование показало, что экспортин-1-зависимый транспорт характерен для многих пре-микроРНК в покоящихся клетках человека, и, таким образом, представляет собой важный альтернативный путь процессинга микроРНК [101].

Разнообразие механизмов созревания микроРНК имеет важный биологический смысл. С эволюционной точки зрения одним его преимуществ является частичная заменимость участников созревания микроРНК. Так, потеря или снижение экспрессии основных белков Drosha и Dicer обычно приводит к нарушению развития, и во многих случаях может быть летальной или условно летальной [102, 103] При этом наличие альтернативных путей процессинга позволяет частично избежать полной потери регуляторных функций микроРНК [104, 105]. Схожей цели может служить и видимая избыточность спектра белков AGO.

Несмотря на то что созревание большинства изученных микроРНК проходит по каноническому пути, наличие альтернативных путей биогенеза придает системе микроРНК дополнительную гибкость, а многие микроРНК, процессирующиеся неканонически, играют важную биологическую роль. В любом случае, вне зависимости от пути созревания, в результате образуется активный комплекс RISC, содержащий ведущую цепь микроРНК и готовый к выполнению регуляторных функций.

#### МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ И ФУНКЦИИ микроРНК

Определяющей чертой микроРНК, наряду с созреванием, являются их функции и особенности механизмов, обеспечивающих их реализацию. Известно, что микроРНК участвуют в регуляции множества клеточных процессов и выступают в качестве ключевых звеньев в составе сложных регуляторных путей. Действие микроРНК играет важную роль в регуляции важнейших биологических процессов, в том числе клеточного цикла, роста и дифференцировки клеток, миграции, апоптоза и реакции на стресс [106, 107].

Основной функцией микроРНК считается подавление экспрессии генов на пост-транскрипционном уровне посредством связывания с участками в нетранслируемых областях мРНК, приводящего к деградации или обратимой инактивации последних. Предполагают, что микроРНК могут контролировать экспрессию от 30 до 50% генов человека и выступают микро-регуляторами экспрессии или "скульпторами транскриптома", образуя своеобразную "страховочную сеть", препятствующую бесконтрольному изменению экспрессии клеточных белков [108-110]. Такая аналогия связана с тем, что в большинстве случаев результатом влияния микроРНК является только частичное изменение экспрессии гена-мишени – не более чем в два раза на уровне белкового продукта [67, 111–114]. В некоторых случаях микроРНК могут полностью ингибировать экспрессию гена-мишени (например, lin-4 и let-7 С. elegans [1, 2, 115]), однако это скорее исключение из правила. При этом, несмотря на столь "скромный" вклад большинства индивидуальных микроРНК, их суммарное влияние на регуляцию экспрессии нельзя недооценивать. Активность микроРНК из большинства консервативных семейств абсолютно необходима для нормального развития и функционирования организма (подробно описано в работе [108]).

Действие RISC можно разделить на два этапа – распознавание мишени и осуществление регуляторного эффекта. За первое отвечает рибонуклеиновый компонент RISC (за исключением очень редких случаев [116]). Узнавание и связывание обеспечивается комплементарным взаимодействием участка узнавания (seed) микроРНК и узнаваемого участка (seed-match или miRNA response element, MRE), находящегося в мРНК-мишени (рис. 2) [117]. Канонические участки узнавания включают нуклеотиды 2-7 (или 2-8) в составле последовательности микроРНК, иногда подкрепленные неканоническим спариванием 5'-концевого нуклеотида микроРНК с аденозином в мРНК мишени [67, 118–122]. Взаимодействие с мишенью может дополнительно стабилизироваться за счет компенсаторного спаривания одного или нескольких оснований на 3'-конце микроРНК [67]. Описан также ряд неканонических сайтов узнавания, в том числе центральные (centered) участки узнавания, образуемые 4-15 нуклеотилами в составе последовательности микроРНК [42, 123], а также форматы взаимодействия с мишенью, в которых участвуют нуклеотиды, разнесенные по последовательности микроРНК [124, 125]. В комплексах, образованных участком узнавания и мишенью, часто присутствуют ошибочно спаренные и "вывернутые" (bulge) основания, причем предполагается, что это может играть важную функциональную роль в механизме узнавания мишени [123, 126–128]. При этом, взаимодействие микроРНК с мишенью может, в определенной степени, влиять на тип и силу вызываемого регуляторного эффекта [129]. Низкая энергия связывания может негативно влиять на эффективность подавления трансляции [121], а при высокой степени комплементарности мишени микроРНК в комплексе с AGO2 может катализировать гидролиз мишени [130].

В силу описанных особенностей узнавания мишеней большинство микроРНК не обладают строгой специфичностью, и способны регулировать до нескольких сотен мишеней [21, 67, 119], причем связывание с множественными мишенями подтверждается экспериментальными данными [131]. При этом в одной мишени также могут присутствовать множественные сайты узнавания (одной или нескольких) микроРНК, которые являются синергистами или антагонистами [114, 132]. Антагонистами по отношению друг к другу могут выступать и сайты связывания, находящиеся на разных мРНК [133]. Гибкость и конкурентность узнавания и связывания мишени приводят к формированию сложных регуляторные сетей, вовлекающих большее число экпрессируемых мРНК [133-135].

Регуляторные эффекты микроРНК обеспечивает белковая составляющая RISC. Помимо AGO важным участником этих событий является белок GW182 (TNRC6A, B, C у человека), который обеспечивает взаимодействие RISC с белками трансляционного аппарата и привлекает дополнительные комплексы, например CCR4-NOT, PAN2-PAN3, DCP1-DCP2 и DDX6 [136-140]. После узнавания и связывания мишени с АGO связывается GW182, что запускает развитие эффекта на мишень. Для подавления трансляции под действием RISC было предложено несколько разных механизмов [17, 141-143]. Известный набор регуляторных механизмов позволяет микроРНК как препятствовать началу трансляции мишени, так и остановить процесс синтеза пептида в процессе элонгации и предотвратить реинициацию за счет деградации мРНК или ограничения ее доступности для рибосом.

Согласно современным взглядам, многие из этих механизмов являются звеньями одного и того же процесса, связанными между собой конкурентными взаимодействиями. Так, если ранее полагалось, что дестабилизация и деградация мРНК является основным механизмом регуляции, то более свежие данные показывают, что подавление трансляции может играть гораздо более важную роль [144]. На основании этих данных рядом авторов была предложена последовательная модель регуляции, обобщающая основные механизмы действия микроРНК (рис. 3) [142, 145, 146].



**Рис. 2.** Примеры взаимодействия микроРНК с мРНК-мишенью. Варианты канонического участка узнавания (seed) с компенсаторным спариванием нуклеотидов на 3'-конце микроРНК (*a*), (*b*) и без компенсаторного спаривания (5'-доминантный участок узнавания мишени) (*b*). Неканонические типы узнавания мишени: 3'-доминантное связывание с редуцированным участком узнавания (*c*) и центральный участок узнавания мишени (*d*).

Согласно этой модели, предотвращение и подавление трансляции является первым, наиболее быстрым и часто основным механизмом действия микроРНК, однако на уровне белка эффект этого механизма относительно невелик [142, 146—148]. Дезаденилирование под действием ССR4-NOT и PAN2-PAN3, декепирование при помощи DDX6 и последующий гидролиз нуклеазами не являются необходимыми для репрессии мРНК, но выступают в качестве вспомогательных механизмов, способных вызывать значительные изменения экспрессии белка [17, 115, 130, 146, 147, 149, 150]. Особняком в этой схеме стоит способность AGO2-содержащих RISC катализировать гидролиз мишени [130].

Интересно, что помимо подавления транскрипции обнаружены и другие механизмы действия микроРНК. Так, микроРНК могут стабилизировать мРНК и усиливать их трансляцию, выполнять функцию "приманки" (decoy), препятствуя взаимодействию белковых факторов с их РНК-мишенями, а также участвовать в процессе созревания других микроРНК [151–153]. В последнее время было показано, что зрелые микроРНК и компоненты RISC обнаружены в клеточном ядре, где они могут принимать участие в регуляции транскрипции и поддержании структуры хроматина [154].

Спектр функций микроРНК постоянно растет, а механизмы, ответственные за их исполнение, постоянно пополняются новыми деталями. Ситуацию дополнительно усложняет наличие сторонних функций у большинства белковых партнеров микроРНК [155]. Например, Dicer и AGO2 участвуют в РНК-интерференции [156]. Drosha и Dicer задействованы в репарации двуцепочечных разрывов, регуляции транскрипции Pol II, сплайсинга и метаболизма рибосомных PHK, а также подавлении транскрипции мобильных элементов [157, 158]. Причем часть этих функций также осуществляется этими белками в тандеме с короткими PHK во многом схожими с микроPHK, что часто мешает достоверной идентификации и аннотации таких молекул.

#### РЕГУЛЯЦИЯ СОЗРЕВАНИЯ И ФУНКЦИЙ микроРНК

Система регуляции экспрессии под действием микроРНК не существует в изоляции от других клеточных систем. Все стадии "жизненного цикла" микроРНК в клетке регулируются посредством разнообразных механизмов, многие из которых до сих пор не изучены детально или просто неизвестны. В данном разделе будут кратко рассмотрены основные типы факторов, оказывающих влияние на созревание микроРНК, а также функции и стабильность комплекса RISC.

Регуляция экспрессии и созревания микроРНК. Биогенез микроРНК это сложный многоступенчатый процесс, каждый этап которого контролируется множеством самых разнообразных факторов.

Гены микроРНК могут входить в состав различных геномных локусов, в том числе внутри других генов. Картирование промоторов генов микроРНК человека показало, что они обладают схожими характеристиками с промоторами белок-кодирующих генов, и регулируются классическими транскрипционными факторами, например с-тус, p53, ZEB1/2, MYOD1 и др. [159].



**Рис. 3.** Механизм подавления трансляции под действием RISC. Представлены возможности блока инициации трансляции мРНК и подавления трансляции на стадии элонгации путем обратимой репрессии и последующей деградации мишени. Пояснения в тексте. PABP – poly(A)-связывающий белок. eIF4A, eIF4A2, eIF4E, eIF4G, eIF4E – факторы инициации трансляции.

Регуляторами транскрипции микроРНК являются и сигналы, опосредованные стимуляцией ростовых факторов, таких как PDGF, TGF-β и BDNF [159]. Эпигенетическая регуляция также играет важную роль в контроле экспрессии микроРНК, причем многие основные компоненты систем, отвечающих за метилирование и ацетилирование гистонов в свою очередь являются мишенями микроРНК [159, 160].

микроРНК также подвержены активной посттранскрипционной регуляции. Модификация белков Dicer и Drosha, участвующих в биогенезе микроРНК, и их партнеров, а также взаимодействие с ними регуляторных белковых факторов может модулировать скорость и специфичность созревания предшественников и влиять на уровни зрелых микроРНК в клетке [160]. Мишенями регуляторных белков могут служить и сами предшественники микроРНК. Примером такой регуляции может служить участие HNRNPA1, KSRP и LIN28A/B в созревании let-7, а также способность SRp20/SRSF3 и геликазы DDX17 активировать созревание ряда микроРНК [160]. Активность терминальных уридилтрансфераз TUT7, TUT4 и TUT2 по отношению к предшественникам играет важную роль в регуляции процессинга ряда микроРНК, например let-7 и miR-122 [161, 162]. Показана также роль третичной и четвертичной структуры, образуемой предшественниками микроРНК, на эффективность их процессинга [53, 163].

Клеточная популяция микроРНК микрогетерогенна — в один и тот же момент в клетке могут присутствовать разные *изоформы микроРНК*, или *изомиры* (isomiRs). Такие молекулы происходят из одного источника, но отличаются несколькими основаниями (обычно 5'- и 3'-концовыми нуклеотидами) [164—166]. Частично такие различия являются следствием модуляции процессинга [167, 168], но их причиной также может являться укорачивание концов зрелых микроРНК под действием AGO2 [169], а также редактирование последовательности микроРНК (уридинилирование, метилирование, превращение аденозина в инозин под действием РНК-зависимой аденозиндезаминазы ADAR) [160, 165, 170—173]. Современные данные показывают, что редактирование может играть важную роль в регуляции созревания микроРНК [174].

Отдельной проблемой является вопрос выбора цепи микроРНК. Во многих случаях роль каждой цепи микроРНК (ведущая или пассажирская) жестко не закреплена, а иногда в клетке наблюдается паритет включения обеих цепей микроРНК в RISC [175–177]. Выбор цепи является динамическим параметром и зависит от ткани. фазы клеточного цикла, возраста и ряда факторов внешней среды [178-180]. Смена активной цепи микроРНК может быть ответом на активацию других процессов в клетке. Например, появление избытка мишени также способно увеличивать экспрессию пассажирской цепи [181]. Был определен ряд закономерностей последовательности ведущих и пассажирских цепей микроРНК. Так, в 5'-концевом положении ведущей цепи часто стоит урацил, а в пассажирской цепи – цитозин [182]. Кроме того, в последовательности ведущей цепи преобладают пурины, в то время как пассажирские цепи обогащены пиримидиновыми основаниями. Такая статистика коррелирует с данными о роли термодинамической стабильности в асимметричности связывания микроРНК-дуплекса с AGO [87–89]. Мутации и редактирование последовательности микроРНК могут приводить к изменению ряда ключевых нуклеотидов в последовательности микроРНК, в том числе концевых нуклеотидов, и влиять на выбор цепи для включения в RISC [174, 180].

Регуляция действия и стабильности RISC. Доступность белков AGO является одним из основных лимитирующих факторов действия микроРНК [183]. Стабильность AGO регулируется стандартными клеточными механизмами через фосфорилирование, гидроксилирование, роly(ADP-рибозил)-ирование и убиквитинирование, и стабилизируются загрузкой микроРНК [160]. Недавно было обнаружено, что с АGO также могут быть связаны интронные РНК длиной около 100 нт, названные аготронами (agotrons), основной функцией которых может быть регуляция доступности или стабильности AGO в отсутствие микроРНК [184–187]. Недавно были получены данные, что количество зрелых микроРНК в клетках человека может существенно (~ в 14 раз) превышать число молекул AGO [188–190]. Это может означать, что большая часть зрелых микроРНК не находится в RISC, что дополнительно повышает значимость доступности AGO в определении функций микроРНК. Роль такого пула "избыточных" молекул микроРНК в клетке остается неясной, однако показано, что в поддержании концентрации и стабилизации микроРНК участвует ряд PHK-связывающих белков, например, HuR, AUF1 и др. [191]. Хотя эти данные и требуют дополнительного подтверждения, они как минимум подтверждают, насколько мало доподлинно известно о биологии микроРНК.

Активность RISC также зависит от наличия в клетке мишеней микроРНК, входящей в состав комплекса. Избыток сайтов связывания микроРНК может снижать эффективность подавления трансляции [121]. При этом доступность мишеней и сайтов связывания может изменяться под действием мутагенеза, регуляции процессинга мРНК (альтернативный сплайсинг, использование альтернативных сайтов полиаденилирования), в процессе развития организма, в ответ на стресс, в зависимости от факторов среды и внеклеточных сигналов [142].

Известно, что ряд белковых факторов могут влиять на эффективность действия микроРНК кооперативно (PUM1 и PUM2) или конкурентно (DND1, CRD-BP, HNRNP E2 и HuR) (подробно освещено в работе [192]). Недавно также был обнаружен новый вариант регулирования активности микроРНК – феномен конкурентных эндогенных PHK (competing endogenous RNA, ceRNA). Конкурентные РНК содержат множественные сайты связывания микроРНК, благодаря чему они могут эффективно связывать микроРНК, снижая их доступность и способность действовать на целевые мишени [193]. Из-за такой способности "впитывать" микроРНК такие конкурентные РНК часто называют микроРНК-губками (miRNA sponges). Среди известных конкурентных РНК присутствуют длинные некодирующие РНК (днРНК, lncRNA/lincRNA), кольцевые РНК (circular RNA, circRNA), являющиеся продуктами бэксплайсинга колирующих генов. и лаже некоторые белок-кодирующие транскрипты [135, 193-196].

Стабильность микроРНК также может регулироваться за счет механизмов их направленной деградации. Гантье с соавторами показали, что среднее время полужизни микроРНК в клетке в отсутствие Dicer составляет 119 часов, однако этот параметр варьирует более чем в два раза для разных микроРНК [197]. Примерами быстрой направленной деградации микроРНК являются нейроны, в которых блокирование транскрипции при-микроРНК быстро приводит к снижению уровня зрелых микроРНК, а также резкие пере-

стройки спектра микроРНК в ряде тканей, наблюдаемые в процессе развития организма [198-201]. Кроме того, регуляция микроРНК может быть напрямую связана с выполнением ими своей основной функции. Так, у C. elegans существует механизм мишень-опосредованной защиты мик*poPHK* (target-mediated miRNA protection) – в отсутствие мишени микроРНК освобождается из AGO и деградирует [202]. У человека и Drosophila melanogaster обнаружен механизм, работающий по иному принципу – высокая комплементарность микроРНК и мишени приводит к дестабилизации и деградации микроРНК [203, 204]. Недавно также было показано, что стабильность некоторых микроРНК в клетке регулируется за счет полиаденилирования зрелых молекул и их предшественников, которое, в свою очерель, определяется балансом активности poly(A)-полимеразы РАРD5 и РНКазы PARN [205].

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы микроРНК попали в объектив исследователей в контексте многих важнейших биологических процессов. Были изучены многие особенности структуры микроРНК, их кодирования в геноме ряда организмов, механизмы их экспрессии и созревания; определены основные функции микроРНК в клетке и спектр их основных белковых партнеров. Однако, несмотря на большой прогресс, достигнутый в области изучения микроРНК и некодирующих РНК в целом, многие детали их биогенеза и механизмов действия микроРНК до сих пор остается загадкой. Очевидно, что микроРНК и связанные с ними белковые факторы участвуют в гораздо более широком спектре событий, чем предполагалось изначально. К сожалению, современные данные в области исследования механизмов действия микроРНК неполны и зачастую противоречивы, во многом из-за разнообразия используемых экспериментальных подходов и отсутствия четкого понимания многих основных механизмов действия микроРНК. Поэтому для достижения глубокого понимания всех их функций необходима в первую очередь исчепывающая систематизация современных знаний и методик изучения микроРНК.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-15-00124) и проекта базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013—2020 № АААА-А17-117020210024-8 (П.П. Лактионов).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. // Cell. 1993. V. 75. № 5. P. 843–854.
- Reinhart B.J., Slack F.J., Basson M., Pasquinelli A.E., Bettinger J.C., Rougvie A.E., Horvitz H.R., Ruvkun G. // Nature. 2000. V. 403. № 6772. P. 901–906.
- Lee R.C., Ambros V., Erdmann V.A., Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V., Reinhart B., Wightman B., Ha I., Ruvkun G., Pasquinelli A.E., Grishok A., Hutvagner G., Sharp P.A., Kent W.J. et al. // Science. 2001. V. 294. № 5543. P. 862–864.
- Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T., Elbashir S.M., Lendeckel W., Tuschl T., Hamilton A.J., Baulcombe D.C., Hammond S.M., Bernstein E., Beach D., Hannon G.J., Zamore P.D., Tuschl T. et al // Science. 2001. V. 294. № 5543. P. 853–858.
- Lau N.C., Lim L.P., Weinstein E.G., Bartel D.P., Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V., Wightman B., Ha I., Ruvkun G., Reinhart B.J., Moss E.G., Lee R.C., Ambros V., Slack F.J. et al. // Science. 2001. V. 294. № 5543. P. 858–862.
- 6. Axtell M.J., Westholm J.O., Lai E.C. // Genome Biol. 2011. V. 12. № 4. P. 221.
- Griffiths-Jones S., Saini H.K., Dongen S. van, Enright A.J. // Nucl. Acids Res. 2008. V. 36. Database issue. P. D154–D158.
- Kozomara A., Griffiths-Jones S. // Nucl. Acids Res. 2014. V. 42. Database issue. P. D68–D73.
- Ying H., Kimmelman A.C., Lyssiotis C.A., Hua S., Chu G.C., Fletcher-Sananikone E., Locasale J.W., Son J., Zhang H., Coloff J.L., Yan H., Wang W., Chen S., Viale A., Zheng H. et al. // Cell. 2012. V. 149. № 3. P. 656–670.
- Han B.W., Wang W., Li C., Weng Z., Zamore P.D. // Science. 2015. V. 348. № 6236. P. 817–821.
- 11. Hyun S. // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18. № 5.
- Herrmann A., Priceman S.J., Swiderski P., Kujawski M., Xin H., Cherryholmes G.A., Zhang W., Zhang C., Lahtz C., Kowolik C., Forman S.J., Kortylewski M., Yu H. // J. Clin. Invest. 2014. V. 124. № 7. P. 2977–2987.
- Kang S., Kang D., Bakhtiar Ul Islam S.M., Je S., Kim J.-H., Song J.J. // Cell. Signal. 2015. V. 27. № 6. P. 1214– 1224.
- 14. *Taft R.J., Hawkins P.G., Mattick J.S., Morris K.V. //* Epigenetics Chromatin. 2011. V. 4. P. 13.
- Ambros V., Bartel B., Bartel D.P., Burge C.B., Carrington J.C., Chen X., Dreyfuss G., Eddy S.R., Griffiths-Jones S., Marshall M., Matzke M., Ruvkun G., Tuschl T. // RNA. 2003. V. 9. № 3. P. 277–279.

- 16. Bartel D.P. // Cell. 2004. V. 116. № 2. P. 281-297.
- 17. *Fabian M.R., Sonenberg N., Filipowicz W.* // Annu. Rev. Biochem. 2010. V. 79. № 1. P. 351–379.
- Berezikov E. // Nat. Rev. Genet. 2011. V. 12. № 12. P. 846–860.
- 19. Taft R.J., Pheasant M., Mattick J.S. // BioEssays. 2007. V. 29. № 3. P. 288–299.
- Grimson A., Srivastava M., Fahey B., Woodcroft B.J., Chiang H.R., King N., Degnan B.M., Rokhsar D.S., Bartel D.P. // Nature. 2008. V. 455. № 7217. P. 1193– 1197.
- Griffiths-Jones S., Grocock R.J., Dongen S. van, Bateman A., Enright A.J. // Nucleic Acids Res. 2006. V. 34. Database issue. P. D140–D144.
- Umu S.U., Langseth H., Bucher-Johannessen C., Fromm B., Keller A., Meese E., Lauritzen M., Leithaug M., Lyle R., Rounge T.B. // RNA Biol. 2017. P. 1–9.
- Fromm B., Billipp T., Peck L.E., Johansen M., Tarver J.E., King B.L., Newcomb J.M., Sempere L.F., Flatmark K., Hovig E., Peterson K.J. // Annu. Rev. Genet. 2015. V. 23. № 49. P. 213–242.
- 24. *Rodriguez A., Griffiths-Jones S., Ashurst J.L., Bradley A. //* Genome Res. 2004. V. 14. № 10A. P. 1902–1910.
- 25. Saini H.K., Enright A.J., Griffiths-Jones S. // BMC Genomics. 2008. V. 9. P. 564.
- Campo-Paysaa F, Semon M., Cameron R.A., Peterson K.J., Schubert M. // Evol. Dev. 2011. V. 13. № 1. P. 15–27.
- Colaiacovo M., Lamontanara A., Bernardo L., Alberici R., Crosatti C., Giusti L., Cattivelli L., Faccioli P. // Biol. Direct. 2012. V. 7. P. 15.
- Saini H.K., Griffiths-Jones S., Enright A.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2007. V. 104. № 45. P. 17719– 17724.
- Corcoran D.L., Pandit K. V., Gordon B., Bhattacharjee A., Kaminski N., Benos P. V. // PLoS One. 2009. V. 4. № 4. P. e5279.
- Ramalingam P., Palanichamy J.K., Singh A., Das P., Bhagat M., Kassab M.A., Sinha S., Chattopadhyay P. // RNA. 2014. V. 20. № 1. P. 76–87.
- 31. Ozsolak F., Poling L.L., Wang Z., Liu H., Liu X.S., Roeder R.G., Zhang X., Song J.S., Fisher D.E. // Genes Dev. 2008. V. 22. № 22. P. 3172–3183.
- Monteys A.M., Spengler R.M., Wan J., Tecedor L., Lennox K.A., Xing Y., Davidson B.L. // RNA. 2010. V. 16. № 3. P. 495–505.
- 33. Baskerville S., Bartel D.P. // RNA. 2005. V. 11. № 3. P. 241–247.
- Yuan Z., Sun X., Liu H., Xie J. // PLoS One. 2011. V. 6. № 3. P. e17666.
- 35. Friedländer M.R., Mackowiak S.D., Li N., Chen W., Rajewsky N. // Nucleic Acids Res. 2012. V. 40. № 1. P. 37–52.
- Ender C., Krek A., Friedländer M.R., Beitzinger M., Weinmann L., Chen W., Pfeffer S., Rajewsky N., Meister G. // Mol. Cell. 2008. V. 32. № 4. P. 519–528.
- 37. Pederson T. // RNA. 2010. V. 16. № 10. P. 1865–1869.
- Ono M., Scott M.S., Yamada K., Avolio F., Barton G.J., Lamond A.I. // Nucleic Acids Res. 2011. V. 39. № 9. P. 3879–3891.
- 39. Devor E.J. // J. Hered. 2006. V. 97. № 2. P. 186–190.

- 40. Lewis B.P., Shih I.-H., Jones-Rhoades M.W., Bartel D.P. // Cell. 2003. V. 115. P. 787–798.
- 41. Lim L.P., Glasner M.E., Yekta S., Burge C.B., Bartel D.P. // Science (80-.). 2003. V. 299. № 5612. P. 1540.
- 42. Shin C., Nam J.-W., Farh K.K.-H., Chiang H.R., Shkumatava A., Bartel D.P. // Mol. Cell. 2010. V. 38. № 6. P. 789–802.
- 43. Farh K.K.-H. // Science. 2005. V. 310. № 5755. P. 1817–1821.
- 44. Stark A., Brennecke J., Bushati N., Russell R.B., Cohen S.M. // Cell. 2005. V. 123. № 6. P. 1133–1146.
- 45. Sood P., Krek A., Zavolan M., Macino G., Rajewsky N. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2006. V. 103. № 8. P. 2746–2751.
- 46. *Daugaard I., Hansen T.B.* // Trends Genet. 2017. V. 33. № 3. P. 208–219.
- 47. Lee Y., Kim M., Han J., Yeom K.-H., Lee S., Baek S.H., Kim V.N. // EMBO J. 2004. V. 23. № 20. P. 4051–4060.
- 48. Cai X., Hagedorn C.H., Cullen B.R. // RNA. 2004. V. 10. № 12. P. 1957–1966.
- Ballarino M., Pagano F., Girardi E., Morlando M., Cacchiarelli D., Marchioni M., Proudfoot N.J., Bozzoni I. // Mol. Cell. Biol. 2009. V. 29. № 20. P. 5632–5638.
- 50. Borchert G.M., Lanier W., Davidson B.L. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2006. V. 13. № 12. P. 1097–1101.
- 51. Liang Y., Ridzon D., Wong L., Chen C. // BMC Genomics. 2007. V. 8. P. 166.
- 52. Chaulk S.G., Thede G.L., Kent O.A., Xu Z., Gesner E., Veldhoen R.A., Khanna S.K., Goping I.S., MacMillan A.M., Mendell J.T., Young H., Fahlman R.P., Glover M.J.N. // RNA Biol. 2011. V. 8. № 6. P. 1105–1114.
- 53. Chakraborty S., Mehtab S., Patwardhan A., Krishnan Y. // RNA. 2012. V. 18. № 5. P. 1014–1028.
- Denli A.M., Tops B.B.J., Plasterk R.H.A., Ketting R.F., Hannon G.J. // Nature. 2004. V. 432. № 7014. P. 231– 235.
- 55. Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Rå Dmark O., Kim S., Kim V.N. // Nature. 2003. V. 425. № 6956. P. 415–419.
- 56. Roth B.M., Ishimaru D., Hennig M. // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. № 37. P. 26785–26799.
- 57. Han J., Lee Y., Yeom K.-H., Nam J.-W., Heo I., Rhee J.-K., Sohn S.Y., Cho Y., Zhang B.-T., Kim V.N. // Cell. 2006. V. 125. № 5. P. 887–901.
- Maa H., Wub Y., Choia J.-G., Wua H. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2013. V. 110. № 51. P. 20687– 20692.
- 59. *Castilla-Llorente V., Nicastro G., Ramos A.* // Biochem. Soc. Trans. 2013. V. 41. № 4. P. 861–865.
- 60. Chen C.-Z., Li L., Lodish H.F., Bartel D.P. // Science (80-.). 2004. V. 303. № 5654. P. 83–86.
- 61. Fang W., Bartel D.P. // Mol. Cell. 2015. V. 60. P. 131– 145.
- 62. Auyeung V.C., Ulitsky I., McGeary S.E., Bartel D.P. // Cell. 2013. V. 152. № 4. P. 844–858.
- 63. Nicholson A.W. // Wiley Interdiscip. Rev. RNA. 2014. V. 5. № 1. P. 31–48.
- 64. Zeng Y., Cullen B.R. // Nucleic Acids Res. 2004. V. 32. № 16. P. 4776–4785.

- 65. Lund E., Güttinger S., Calado A., Dahlberg J.E., Kutay U. // Science (80-.). 2004. V. 303. № 5654. P. 95–98.
- 66. Yi R., Qin Y., Macara I.G., Cullen B.R. // Genes Dev. 2003. V. 17. № 24. P. 3011–3016.
- 67. Bartel D.P. // Cell. 2009. V. 136. № 2. P. 215-233.
- 68. Park J.-E., Heo I., Tian Y., Simanshu D.K., Chang H., Jee D., Patel D.J., Kim V.N. // Nature. 2011. V. 475. № 7355. P. 201–205.
- 69. Gu S., Jin L., Zhang Y., Huang Y., Zhang F., Valdmanis P.N., Kay M.A. // Cell. 2012. V. 151. № 4. P. 900–911.
- MacRae I., Zhou K., Li F., Repic A., Brooks A., Cande Z., Adams P., Doudna J. // Science (80-.). 2006. V. 311. № 5758. P. 195–198.
- 71. *MacRae I.J., Zhou K., Doudna J.A.* // Nat. Struct. Mol. Biol. 2007. V. 14. № 10. P. 934–940.
- Provost P., Dishart D., Doucet J., Frendewey D., Samuelsson B., Rådmark O. // EMBO J. 2002. V. 21. № 21. P. 5864–5874.
- 73. *Hammond S.M.* // FEBS Lett. 2005. V. 579. № 26. P. 5822–5829.
- 74. Zhang H., Kolb F.A., Brondani V., Billy E., Filipowicz W. // EMBO J. 2002. V. 21. № 21. P. 5875–5885.
- Kawamata T., Tomari Y. // Trands Biochem. Sci. 2010. V. 35. № 7.
- Nakanishi K. // Wiley Interdiscip. Rev. RNA. 2016.
  V. 7. № 5. P. 637–660.
- 77. Schirle N.T., MacRae I.J. // Science. 2012. V. 336. № 6084. P. 1037–1040.
- Elkayam E., Kuhn C.-D., Tocilj A., Haase A.D., Greene E.M., Hannon G.J., Joshua-Tor L. // Cell. 2012. V. 150. № 1. P. 100–110.
- 79. *Jiang H., Sheong F.K., Zhu L., Gao X., Bernauer J., Huang X.* // PLOS Comput. Biol. V. 11. № 7. P. e1004404.
- 80. Jinek M., Doudna J.A. // Nature. 2009. V. 457.
- Swarts D.C., Makarova K., Wang Y., Nakanishi K., Ketting R.F., Koonin E. V, Patel D.J., van der Oost J. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2014. V. 21. № 9. P. 743–753.
- Faehnle C.R., Elkayam E., Haase A.D., Hannon G.J., Joshua-Tor L., Keck W.M. // Cell Rep. 2013. V. 3. № 6. P. 1901–1909.
- Bueck A., Ziegler C., Eichner A., Berezikov E., Meister G. // Nucleic Acids Res. 2012. V. 40. № 19. P. 9850–9862.
- Iwasaki S., Kobayashi M., Yoda M., Sakaguchi Y., Katsuma S., Suzuki T., Tomari Y. // Mol. Cell. 2010. V. 39. № 2. P. 292–299.
- Iwasaki S., Sasaki H.M., Sakaguchi Y., Suzuki T., Tadakuma H., Tomari Y. // Nature. 2015. V. 521. № 7553. P. 533–536.
- 86. *Miyoshi T., Takeuchi A., Siomi H., Siomi M.C.* // Nat. Struct. Mol. Biol. 2010. V. 17. № 8. P. 1024–1026.
- Khvorova A., Reynolds A., Jayasena S.D., Bartel D.P., Aronin N., Zamore P.D., Rappsilber J., Mann M., Dreyfuss G., Mello C.C. et al. // Cell. 2003. V. 115. № 2. P. 209–216.
- Schwarz D.S., Hutvágner G., Du T., Xu Z., Aronin N., Zamore P.D. // Cell. 2003. V. 115. № 2. P. 199–208.

- Suzuki H.I., Katsura A., Yasuda T., Ueno T., Mano H., Sugimoto K., Miyazono K. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2015. V. 22. № 7. P. 512–521.
- 90. Nakanishi K., Weinberg D.E., Bartel D.P., Patel D.J. // Nature. 2012. V. 486. № 7403. P. 368–374.
- 91. *Kwak P.B., Tomari Y.* // Nat. Struct. Mol. Biol. 2012. V. 19. № 2.
- 92. Yang J.-S., Lai E.C. // Mol. Cell. 2011. V. 43. № 6. P. 892–903.
- 93. Berezikov E., Chung W.-J., Willis J., Cuppen E., Lai E.C. // Mol. Cell. 2007. V. 28. № 2. P. 328–336.
- 94. *Ruby J.G., Jan C.H., Bartel D.P.* // Nature. 2007. V. 448. № 7149. P. 83–86.
- 95. Okamura K., Hagen J.W., Duan H., Tyler D.M., Lai E.C. // Cell. 2007. V. 130. № 1. P. 89–100.
- 96. Rasmussen K.D., Simmini S., Abreu-Goodger C., Bartonicek N., Giacomo M. Di, Bilbao-Cortes D., Horos R., Lindern M. Von, Enright A.J., O'Carroll D. // J. Exp. Med. 2010. V. 207. № 7. P. 1351–1358.
- Cheloufi S., Santos C.O. Dos, Chong M.M.W., Hannon G.J. // Nature. 2010. V. 465. № 7298. P. 584– 589.
- 98. Cifuentes D., Xue H., Taylor D.W., Patnode H., Mishima Y., Cheloufi S., Ma E., Mane S., Hannon G.J., Lawson N.D., Wolfe S.A., Giraldez A.J. // Science. 2010. V. 328. № 5986. P. 1694–1698.
- 99. Yoda M., Cifuentes D., Izumi N., Sakaguchi Y., Suzuki T., Giraldez A.J., Tomari Y. // Cell Rep. 2013. V. 5. № 3. P. 715–726.
- 100. *Kim Y.-K., Kim B., Kim V.N.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2016. V. 113. № 13. P. E1881–E1889.
- 101. Martinez I., Hayes K.E., Barr J.A., Harold A.D., Xie M., Bukhari S.I.A., Vasudevan S., Steitz J.A., Di-Maio D. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2017. V. 114. № 25. P. E4961–E4970.
- 102. Bernstein E., Kim S.Y., Carmell M.A., Murchison E.P., Alcorn H., Li M.Z., Mills A.A., Elledge S.J., Anderson K.V., Hannon G.J. // Nat. Genet. 2003. V. 35. № 3. P. 215–217.
- 103. Davis T.H., Cuellar T.L., Koch S.M., Barker A.J., Harfe B.D., McManus M.T., Ullian E.M. // J. Neurosci. 2008. V. 28. № 17. P. 4322–4330.
- 104. Babiarz J.E., Hsu R., Melton C., Thomas M., Ullian E.M., Blelloch R. // RNA. 2011. V. 17. № 8. P. 1489–1501.
- 105. Chong M.M.W., Zhang G., Cheloufi S., Neubert T.A., Hannon G.J., Littman D.R. // Genes Dev. 2010. V. 24. № 17. P. 1951–1960.
- 106. Ambros V. // Nature. 2004. V. 431. № 7006. P. 350– 355.
- 107. *Kloosterman W.P., Plasterk R.H.A.* // Dev. Cell. 2006. V. 11. № 4. P. 441–450.
- 108. Bartel D.P. // Cell. 2018. V. 173.
- 109. *Almeida M.I., Reis R.M., Calin G.A.* // Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen. 2011. V. 717. № 1–2. P. 1–8.
- 110. Bartel D.P., Chen C.-Z. // Nat. Rev. Genet. 2004. V. 5.
  № 5. P. 396–400.
- Selbach M., Schwanhäusser B., Thierfelder N., Fang Z., Khanin R., Rajewsky N. // Nature. 2008. V. 455. № 7209. P. 58–63.

- 112. Baek D., Villén J., Shin C., Camargo F.D., Gygi S.P., Bartel D.P. // Nature. 2008. V. 455. № 7209. P. 64–71.
- Mukherji S., Ebert M.S., Zheng G.X., Tsang J.S., Sharp P.A., Oudenaarden A. Van // Nat. Genet. V. 43. № 9. P. 854–859.
- 114. Fang Z., Rajewsky N. // PLoS One. 2011. V. 6. № 3. P. e18067.
- 115. Bagga S., Bracht J., Hunter S., Massirer K., Holtz J., Eachus R., Pasquinelli A.E. // Cell. 2005. V. 122. P. 553–563.
- 116. Leoni G., Tramontano A. // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. № 9. P. e82.
- 117. *Afonso-Grunz F., Müller S.* // Cell. Mol. Life Sci. 2015. V. 72. № 16. P. 3127–3141.
- 118. Lewis B.P., Burge C.B., Bartel D.P. // Cell. 2005. V. 120. № 1. P. 15–20.
- 119. Friedman R.C., Farh K.K.-H., Burge C.B., Bartel D.P. // Genome Res. 2009. V. 19. № 1. P. 92–105.
- 120. Royo F., Zuñiga-Garcia P., Sanchez-Mosquera P., Egia A., Perez A., Loizaga A., Arceo R., Lacasa I., Rabade A., Arrieta E., Bilbao R., Unda M., Carracedo A., Falcon-Perez J.M. // J. Extracell. Vesicles. 2016. V. 5. P. 29497.
- 121. Garcia D.M., Baek D., Shin C., Bell G.W., Grimson A., Bartel D.P. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2011. V. 18. № 10. P. 1139–1146.
- 122. *Grimson A*. // Nat. Methods. 2010. V. 7. № 10. P. 795–797.
- 123. *Chi S.W., Hannon G.J., Darnell R.B.* // Nat. Struct. Mol. Biol. 2012. V. 19. № 3. P. 321–327.
- 124. Helwak A., Kudla G., Dudnakova T., Tollervey D. // Cell. 2013. V. 153. № 3. P. 654–665.
- 125. Moore M.J., Scheel T.K.H., Luna J.M., Park C.Y., Fak J.J., Nishiuchi E., Rice C.M., Darnell R.B. // Nat. Commun. 2015. V. 6. P. 8864.
- 126. Loeb G.B., Khan A.A., Canner D., Hiatt J.B., Shendure J., Darnell R.B., Leslie C.S., Rudensky A.Y. // Mol. Cell. 2012. V. 48. № 5. P. 760–770.
- 127. Hafner M., Lianoglou S., Tuschl T., Betel D. // Methods. 2012. V. 58. № 2. P. 94–105.
- 128. Martin H.C., Wani S., Steptoe A.L., Krishnan K., Nones K., Nourbakhsh E., Vlassov A., Grimmond S.M., Cloonan N. // Genome Biol. 2014. V. 15. № 3. P. R51.
- 129. *Grimson A., Farh K.K.-H., Johnston W.K., Garrett-Engele P., Lim L.P., Bartel D.P.* // Mol. Cell. 2007. V. 27. № 1. P. 91–105.
- Valencia-Sanchez M.A. // Genes Dev. 2006. V. 20. № 5. P. 515–524.
- 131. Chou C.H., Chang N.W., Shrestha S., Hsu S. Da, Lin Y.L., Lee W.H., Yang C.D., Hong H.C., Wei T.Y., Tu S.J., Tsai T.R., Ho S.Y., Jian T.Y., Wu H.Y., Chen P.R. et al. // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. № D1.
- 132. Gam J.J., Babb J., Weiss R. // Nat. Commun. 2018. V. 9. № 1. P. 2430.
- 133. Jens M., Rajewsky N. // Nat. Rev. Genet. 2015. V. 16. № 2. P. 113–126.
- 134. *Guo L., Zhao Y., Yang S., Zhang H., Chen F.* // Biomed Res. Int. 2014. V. 2014. P. 1–8.

- 135. Rong D., Sun H., Li Z., Liu S., Dong C., Fu K., Tang W., Cao H. // Oncotarget. 2017.
- 136. *Yao B., Li S., Chan E.K.L.* // Ten Years Prog. GW/P Body Res. Adv. Exp. Med. Biol. 2013. V. 768. P. 71–96.
- Huntzinger E., Kuzuoğlu-Öztürk D., Braun J.E., Eulalio A., Wohlbold L., Izaurralde E. // Nucleic Acids Res. 2013. V. 41. № 2. P. 978–994.
- 138. Collart M.A., Panasenko O.O. // Gene. 2012. V. 492. № 1. P. 42–53.
- 139. Wolf J., Passmore L.A. // Biochem. Soc. Trans. 2014. V. 42. № 1. P. 184–187.
- 140. *Presnyak V., Coller J.* // Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech. 2013. V. 1829. № 8. P. 817–823.
- 141. Morozova N., Zinovyev A., Nonne N., Pritchard L.-L., Gorban A.N., Harel-Bellan A. // RNA. 2012. V. 18. № 9. P. 1635–1655.
- 142. Wilczynska A., Bushell M. // Cell Death Differ. 2015. V. 22. № 1. P. 22–33.
- 143. Fukaya T., Tomari Y. // Mol. Cell. 2012. V. 48. P. 825-836.
- 144. *Larsson O., Nadon R.* // Translation. 2013. V. 1. № 1. P. e24557.
- 145. Fabian M.R., Mathonnet G., Sundermeier T., Mathys H., Zipprich J.T., Svitkin Y. V, Rivas F., Jinek M., Wohlschlegel J., Doudna J.A., Chen C.Y.A., Shyu A. Bin, Yates J.R., Hannon G.J., Filipowicz W. et al. // Mol. Cell. 2009. V. 35. № 6. P. 868–880.
- 146. *Djuranovic S., Nahvi A., Green R.* // Science (80-.). 2012. V. 336. № 6078. P. 237–240.
- 147. Eichhorn S.W., Guo H., Mcgeary S.E., Rodriguez-Mias R.A., Shin C., Baek D., Hsu S.-H., Ghoshal K., Villén J., Bartel D.P. // Mol Cell. 2014. V. 56. № 1. P. 104–115.
- 148. Meijer H.A., Kong Y.W., Lu W.T., Wilczynska A., Spriggs R. V, Robinson S.W., Godfrey J.D., Willis A.E., Bushell M. // Science. 2013. V. 340. № 6128. P. 82–85.
- 149. *Rehwinkel J.* // RNA. 2005. V. 11. № 11. P. 1640– 1647.
- 150. Fukaya T., Tomari Y. // EMBO J. 2011. V. 30426. P. 4998–5009.
- 151. Yang Z., Wang L. // Cell Biosci. 2011. V. 1. № 1. P. 31.
- 152. *Finnegan E.F., Pasquinelli A.E.* // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2013. V. 48. № 1. P. 51–68.
- 153. Eiring A.M., Harb J.G., Neviani P., Garton C., Oaks J.J., Spizzo R., Liu S., Schwind S., Santhanam R., Hickey C.J., Becker H., Chandler J.C., Andino R., Cortes J., Hokland P. et al. // Cell. 2010. V. 140. № 5. P. 652–665.
- 154. Pitchiaya S., Heinicke L.A., Park J.I., Cameron E.L., Walter N.G. // Cell Rep. 2017. V. 19. № 3. P. 630–642.
- 155. Pong S.K., Gullerova M. // FEBS Lett. 2018. V. 592. № 17. P. 2973–2986.
- 156. *Czech B., Hannon G.J.* // Nat. Rev. Genet. 2011. V. 12. № 1. P. 19–31.
- 157. Rybak-Wolf A., Jens M., Murakawa Y., Herzog M., Landthaler M., Rajewsky N. // Cell. 2014. P. 1153– 1167.

- 158. Burger K., Gullerova M. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2015. V. 16. № 7. P. 417–430.
- 159. *Davis-Dusenbery B.N., Hata A.* // J. Biochem. 2010. V. 148. № 4. P. 381–392.
- 160. Ha M., Kim V.N. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2014. V. 15. № 8. P. 509–524.
- 161. Lee H., Han S., Kwon C.S., Lee D. // Protein Cell. 2016. V. 7. № 2. P. 100–113.
- 162. Kim B., Ha M., Loeff L., Chang H., Simanshu D.K., Li S., Fareh M., Patel D.J., Joo C., Kim N. // EMBO J. 2015. V. 34. P. 1801–1815.
- 163. Fernandez N., Cordiner R.A., Young R.S., Hug N., MacIas S., Cáceres J.F. // Nat. Commun. 2017. V. 8.
- 164. Guo L., Chen F. // Gene. 2014. V. 544. № 1. P. 1-7.
- 165. Chiang H.R., Schoenfeld L.W., Ruby J.G., Auyeung V.C., Spies N., Baek D., Johnston W.K., Russ C., Luo S., Babiarz J.E., Blelloch R., Schroth G.P., Nusbaum C., Bartel D.P. // Genes Dev. 2010. V. 24. № 10. P. 992–1009.
- 166. Kim B., Jeong K., Kim V.N. // Mol. Cell. 2017. V. 66. № 2. P. 258–269.
- 167. Humphreys D.T., Hynes C.J., Patel H.R., Wei G.H., Cannon L., Fatkin D., Suter C.M., Clancy J.L., Preiss T. // PLoS One. 2012. V. 7. № 2. P. e30933.
- 168. Starega-Roslan J., Krol J., Koscianska E., Kozlowski P., Szlachcic W.J., Sobczak K., Krzyzosiak W.J. // Nucl. Acids Res. 2011. V. 39. № 1. P. 257–268.
- 169. Juvvuna P.K., Khandelia P., Lee L.M., Makeyev E. V.// Nucl. Acids Res. 2012. V. 40. № 14. P. 6808–6820.
- 170. Liu X., Zheng Q., Vrettos N., Maragkakis M., Alexiou P., Gregory B.D., Mourelatos Z. // Mol. Cell. 2014. V. 55. P. 868–879.
- 171. *Heale B.S.E., Keegan L.P., O'Connell M.A.* // Adv. Exp. Med. Biol. 2010. V. 700. P. 76–84.
- 172. Morin R.D., O'Connor M.D., Griffith M., Kuchenbauer F., Delaney A., Prabhu A.-L., Zhao Y., McDonald H., Zeng T., Hirst M., Eaves C.J., Marra M.A. // Genome Res. 2008. V. 18. № 4. P. 610–621.
- 173. Lee L.W., Zhang S., Etheridge A., Ma L., Martin D., Galas D., Wang K. // RNA. 2010. V. 16. № 11. P. 2170–2180.
- 174. Li L., Song Y., Shi X., Liu J., Xiong S., Chen W., Fu Q., Huang Z., Gu N., Zhang R. // Genome Res. 2018. V. 28. № 1. P. 132–143.
- 175. Yang J.-S., Phillips M.D., Betel D., Mu P., Ventura A., Siepel A.C., Chen K.C., Lai E.C. // RNA. 2011. V. 17. № 2. P. 312–326.
- 176. Almeida M.I., Nicoloso M.S., Zeng L., Ivan C., Spizzo R., Gafà R., Xiao L., Zhang X., Vannini I., Fanini F., Fabbri M., Lanza G., Reis R.M., Zweidler-McKay P.A., Calin G.A. // Gastroenterology. 2012. V. 142. № 4. P. 886–896.
- 177. Yang X., Du W.W., Li H., Liu F., Khorshidi A., Rutnam Z.J., Yang B.B. // Nucleic Acids Res. 2013. V. 41. № 21. P. 9688–9704.
- 178. Kato M., Chen X., Inukai S., Zhao H., Slack F.J. // RNA. 2011. V. 17. № 10. P. 1804–1820.
- 179. Potla R., Singh I.S., Atamas S.P., Hasday J.D. // RNA. 2015. V. 21. № 7. P. 1261–1273.
- 180. Guo L., Lu Z. // PLoS One. 2010. V. 5. № 6.

- 181. Kang S.-M., Choi J.-W., Hong S.-H., Lee H.-J. // Int. J. Mol. Sci. 2013. V. 14. № 7. P. 13231–13240.
- 182. *Meijer H.A., Smith E.M., Bushell M.* // Biochem. Soc. Trans. 2014. V. 42. № 4. P. 1135–1140.
- 183. Grimm D., Wang L., Lee J.S., Schürmann N., Gu S., Börner K., Storm T.A., Kay M.A. // J. Clin. Invest. 2010. V. 120. № 9. P. 3106–3119.
- 184. Hansen T.B., Venø M.T., Jensen T.I., Schaefer A., Damgaard C.K., Kjems J. // Nat. Commun. 2016. V. 7. P. 11538.
- 185. Stagsted L.V.W., Daugaard I., Hansen T.B. // BioEssays. 2017. V. 39. № 4. P. 1600239.
- 186. Smibert P., Yang J.-S., Azzam G., Liu J.-L., Lai E.C. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2013. V. 20. № 7. P. 789–795.
- 187. *Martinez N.J., Gregory R.I.* // RNA. 2013. V. 19. № 5. P. 605–612.
- 188. Janas M.M., Wang B., Harris A.S., Aguiar M., Shaffer J.M., Subrahmanyam Y.V.B.K., Behlke M.A., Wucherpfennig K.W., Gygi S.P., Gagnon E., Novina C.D. // RNA. 2012. V. 18. № 11. P. 2041–2055.
- 189. Stalder L., Heusermann W., Sokol L., Trojer D., Wirz J., Hean J., Fritzsche A., Aeschimann F., Pfanzagl V., Basselet P., Weiler J., Hintersteiner M., Morrissey D.V., Meisner-Kober N.C. // EMBO J. 2013. V. 32. № 8. P. 1115–1127.
- 190. Flores O., Kennedy E.M., Skalsky R.L., Cullen B.R. // Nucleic Acids Res. 2014. V. 42. № 7.
- 191. Zealy R.W., Wrenn S.P., Davila S., Min K.W., Yoon J.H. // Wiley Interdiscip. Rev. RNA. 2017. V. 8. № 5. P. 1–8.
- 192. *Ciafrè S.A., Galardi S. //* RNA Biol. 2013. V. 10. № 6. P. 935–942.
- 193. *Kartha R. V., Subramanian S. //* Front. Genet. 2014. V. 5. № JAN. P. 1–9.
- 194. Memczak S., Jens M., Elefsinioti A., Torti F., Krueger J., Rybak A., Maier L., Mackowiak S.D., Gregersen L.H., Munschauer M., Loewer A., Ziebold U., Landthaler M., Kocks C., Noble F. le et al. // Nature. 2013. V. 495. № 7441. P. 333–338.
- 195. Denzler R., Agarwal V., Stefano J., Bartel D.P., Stoffel M. // Mol. Cell. 2014. V. 54. No 5. P. 766–776.
- 196. Thomson D.W., Dinger M.E. // Nat. Rev. Genet. 2016. V. 17. № 5. P. 272–283.
- 197. Gantier M.P., McCoy C.E., Rusinova I., Saulep D., Wang D., Xu D., Irving A.T., Behlke M.A., Hertzog P.J., MacKay F, Williams B.R.G. // Nucleic Acids Res. 2011. V. 39. № 13. P. 5692–5703.
- 198. Krol J., Busskamp V., Markiewicz I., Stadler M.B., Ribi S., Richter J., Duebel J., Bicker S., Fehling H.J., Schübeler D., Oertner T.G., Schratt G., Bibel M., Roska B., Filipowicz W. // Cell. 2010. V. 141. № 4. P. 618–631.
- 199. Okamura K., Phillips M.D., Tyler D.M., Duan H., Chou Y., Lai E.C. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2008. V. 15. № 4. P. 354–363.
- 200. Avril-Sassen S., Goldstein L.D., Stingl J., Blenkiron C., Quesne J. Le, Spiteri I., Karagavriilidou K., Watson C.J., Tavaré S., Miska E.A., Caldas C. // BMC Genomics. 2009. V. 10. № 1. P. 548.

- 201. Kato M., Lencastre A. de, Pincus Z., Slack F.J. // Genome Biol. 2009. V. 10. № 5. P. R54.
- 202. Chatterjee S., Fasler M., Büssing I., Groβhans H. // Dev. Cell. 2011. V. 20. № 3. P. 388–396.
- Bitetti A., Mallory A.C., Golini E., Carrieri C., Carreño Gutiérrez H., Perlas E., Pérez-Rico Y.A., Tocchini-Valentini G.P., Enright A.J., Norton W.H.J., Mandillo S.,

*O'Carroll D., Shkumatava A.* // Nat. Struct. Mol. Biol. 2018.

- 204. Ameres S.L., Horwich M.D., Hung J.-H., Xu J., Ghildiyal M., Weng Z., Zamore P.D. // Science (80-.). 2010. V. 328. № 5985. P. 1534–1539.
- 205. Shukla S., Bjerke G.A., Muhlrad D., Yi R., Parker R. // Mol. Cell. 2019. V. 73. № 6. P. 1204–1216.

## The Fundamentals of miRNA Biology: Structure, Biogenesis and Regulatory Functions

I. A. Zaporozhchenko\*, \*\*, #, E. Yu. Rykova\*, \*\*, and P. P. Laktionov\*, \*\*

 \*Phone: +7 (383) 363-51-44; fax: +7 (383) 363-51-53; e-mail: ivanzap@niboch.nsc.ru
 \*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, pr. Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia
 \*\*Meshalkin National Medical Research Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Rechkunovskaya ul. 15, Novosibirsk, 630055 Russia

Epigenetic regulation of gene expression plays a key role in the control of many cellular processes. One essential element of such regulation is the miRNA – a class of short non-coding RNAs. The miRNAs were first discovered in 1993, but their active investigation has not started until early 2000s. Recent data show that miRNA might regulate the expression of at least half of human genes. Being involved in the regulation of a large number of target genes implicated in cell functioning, miRNA activity is critical for normal human development and function, while dysregulation of miRNA is a hallmark of many pathophysiological processes. Current review introduces the reader to the main stages of the life cycle of miRNAs in human cells. The origins of cell miRNAs, their processing, functions and regulation of their activity are discussed. The publication is aimed at readers looking to gain first insight into the intiricacies of miRNA biology, but can also provide a source of reference material for specialists in the area.

Keywords: microRNA (miRNA), RISC, maturation, functions, mechanism of action, post-transcriptional regulation of gene expression



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2020, том 46, № 1, с. 18–35

= МИНИ-ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ ===

УДК 547.917

## ДИМЕРНЫЕ (ОЛИГОМЕРНЫЕ) ПРОИЗВОДНЫЕ ЦИКЛОДЕКСТРИНОВ КАК НОВЫЙ КЛАСС СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМ. СИНТЕЗ И СОЕДИНЕНИЯ ВКЛЮЧЕНИЙ НА ИХ ОСНОВЕ

© 2020 г. М. К. Грачев<sup>\*, #</sup>, И. В. Терехова<sup>\*\*</sup>, Д. А. Шипилов<sup>\*</sup>, Н. В. Кутяшева<sup>\*</sup>, Е. Ю. Емельянова<sup>\*</sup>

\*Московский педагогический государственный университет, Институт биологии и химии, Россия, 129164, Москва, ул. Кибальчича 6/2 \*\*Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН, Россия, 153045, Иваново, ул. Академическая 1 Поступила в редакцию 29.05.2019 г.

После доработки 20.06.2019 г. Принята к публикации 22.06.2019 г.

Приведен обзор работ по получению и применению димерных (олигомерных) производных циклодекстринов. Благодаря наличию двух и более внутренних циклодекстриновых полостей, их пространственной сближенности и ряду других особенностей, эти производные обладают повышенным, так называемым "кооперативным" эффектом по отношению к включению многочисленных "гостей", что позволяет определять их как новый класс супрамолекулярных структур. Кратко проанализированы возможности их использования в различных областях органической, аналитической и медицинской химии.

Ключевые слова: циклодекстрины, супрамолекулярная химия, димеры, соединения включения, "гостьхозяин", "кооперативный" эффект, комплексообразование, лиганд

DOI: 10.31857/S0132342320010029

#### СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение. Особые свойства циклодекстриновых димеров (олигомеров)

2. Циклодекстриновые димеры (олигомеры), связанные линкером по первичным гидроксильным группам

3. Циклодекстриновые димеры, связанные линкером по вторичным гидроксильным группам

- 4. Заключение
- 5. Список литературы

#### ВВЕДЕНИЕ. ОСОБЫЕ СВОЙСТВА ЦИКЛОДЕКСТРИНОВЫХ ДИМЕРОВ (ОЛИГОМЕРОВ)

Циклодекстрины (1)–(3) ( $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -) (рис. 1) представляют собой регулярно построенные циклические олигосахариды, в которых соответственно 6 (m = 1, n = 6), 7 (m = 2, n = 7) или 8 (m = 3, n = 8) остатков *D*-глюкопиранозы соединены  $\alpha$ -1–4-гликозидными связями. Благодаря своей относительной дешевизне, биоразлагаемости и нетоксичности они нашли широкое применение

в различных областях химии, в первую очередь супрамолекулярной химии, тонком органическом синтезе, аналитической, фармацевтической химии, а также в косметической и пищевой промышленности [1-6]. Основной интерес к циклодекстринам обусловлен их циклическим строением и наличием внутренней гидрофобной полости. способной к образованию соединений включения типа "гость-хозяин" с различными органическими субстратами. При этом такие важные свойства циклодекстринов, как растворимость в воде и органических растворителях, способность к образованию соединений включения, могут быть направленно изменены путем селективной модификации их структуры [5-7]. Однако направленная функционализация циклодекстринов является сложной в экспериментальном отношении задачей из-за присутствия в их молекулах трех типов различных по природе гидроксильных групп – один набор первичных (при С<sup>6</sup> на узкой стороне) и два набора вторичных гидроксильных групп (при C<sup>2</sup> и C<sup>3</sup> на широкой стороне циклодекстринового каркаса), склонных к образованию сильных внутри- и межмолекулярных водородных связей [8, 9].

Первоначально, при химической модификации циклодекстринов, речь обычно шла о полном

<sup>&</sup>lt;sup>#</sup> Автор для связи: (тел.: +7 (495) 682-02-45; эл. почта: mkgrachev@yandex.ru).



 $\alpha$  (1):  $m = 1, n = 6; \beta$  (2):  $m = 2, n = 7; \gamma$  (3): m = 3, n = 8**Рис. 1.** Структурные формулы  $\alpha$  (1),  $\beta$  (2),  $\gamma$ -циклодекстринов (3).

или хаотичном замещении их гидроксильных групп [10], но в дальнейшем, в связи с тем, что в практическом отношении больший интерес представляют региоселективно замещенные молекулы, внимание стали привлекать именно такие производные [5–7]. Между тем оказалось, что, несмотря на хорошую разработанность многих методик синтеза применительно к моносахаридам и линейным олигосахаридам, простой их перенос на циклодекстрины оказался невозможен из-за наличия большого количества близких по реакционной способности пространственно сближенных гидроксильных групп, а главное, изза наличия внутренней полости, обладающей склонностью к образованию соединений включения с реагентами, что, как следствие, приводит к изменению "обычного" порядка протекания реакций [11-14] и ограничивает практическое использование циклодекстринов. Поэтому, несмотря на обилие работ по синтезу производных циклодекстринов [4-6], общие возможности и закономерности их функционализации исследованы ограниченно.

В еще меньшей степени изучено влияние на модификацию циклодекстринов других важных факторов, таких как природа растворителя, мольное отношение реагентов, температура. Кроме этого, следует учитывать и еще одно важное обстоятельство, которое во многом определяет стратегию синтеза и применения циклодекстринов:  $\beta$ -циклодекстрин намного хуже растворим в воде (18.4 г л<sup>-1</sup>), чем  $\alpha$ - и  $\gamma$ -циклодекстрины (145 и 232 г л<sup>-1</sup>, соответственно). И наоборот,  $\beta$ -циклодекстрин хорошо растворим в таких полярных органических растворителях, как пиридин, DMSO и DMF, тогда как  $\alpha$ - и  $\gamma$ -циклодекстрины в них малорастворимы [15].

В ряду циклодекстринов их димерные (олигомерные) производные, т.е. содержащие два или более фрагментов циклодекстрина, занимают особое место. Так, начиная с первых сообщений [16—20], был отмечен так называемый "кооперативный" (не "аддитивный") эффект у данных соединений, то есть более высокую связывающую способность и молекулярную селективность в случае достаточно близкого расположения двух циклодекстриновых полостей [21]. Это свойство димерных (олигомерных) циклодекстринов определило их использование в качестве "гибких" рецепторов для молекулярного узнавания [22], в гомогенном катализе [23, 24], химиотерапии [25], для изучения мультивалентных взаимодействий [26] с ди- и олигодентатными лигандами.

Интерес к такого рода структурам определяется в первую очередь тем обстоятельством, что в одних случаях, в циклодекстриновых димерах, энергия связывания бидентатных лигандов может быть просто аддитивной [20], а в других – когда фрагменты циклодекстрина относительно жестко фиксированы, связывание с дитопным субстратом становится более сильным ("кооперативным"), чем отвечающее простой аддитивности [27]. Это является результатом выигрыша в энтальпии в сравнении со связыванием двумя монодентатными лигандами [28], что и обеспечивает более прочное хелатирование и компенсирует неблагоприятное действие энтропийной составляющей [25]. Хороший пример – структура (4), у которой линкер несет каталитическую группу и может действовать как дважды связанный лиганд. Например, был изучен гидролиз сложных диэфиров, имеющих на концах гидрофобные группы, способные каждая включаться в полость одного циклодекстринового фрагмента димера (4).



В случае иона металла Cu(II) или Zn(II), привязанного к бипиридину, катализ проходит в  $1.4 \times 10^6$  раз быстрее, чем без циклодекстринов [29, 30]. Такой эффект достигается, во-первых, за счет того, что два гидролизованных фрагмента становятся более не связаны хелатированием и, поэтому, быстро покидают катализатор и освобождают место для дальнейшего гидролиза следующего субстрата, и во-вторых, за счет благоприятной геометрии связывания дитопного субстрата с циклодекстриновым димером.

Некоторые циклодекстриновые димеры способны эффективно связываться с гидрофобными участками пептидных звеньев. Так, показана специфичность связывания участков пептидов с *L*-Phe-*D*-Pro-последовательностью циклодекстриновым димером (5).



Для сравнения эффективности связывания были выбраны циклический пептид (6) и его линейный аналог (7). Найдено, что связывание димера (5) с циклическим пептидом (6) предпочтительнее, чем с его линейным аналогом (7), что, возможно, обусловлено самоагрегацией гидрофобных групп линейного пептида (7), и это было подтверждено лучшим связыванием пептида (7) с мономерным циклодекстрином. Очевидно, что агрегаты (7) разрушаются при проникновении в полость мономерного циклодекстрина. и тогла другой остаток Phe-Pro лучше включается в полость второго мономерного циклодекстрина. Циклический же пептид настолько "жесткий", что у него нет внутренней агрегации, которую необходимо разрушить включением в циклодекстрин, хотя, с другой стороны, такая жесткость и создает трудности для идеального хелатирования путем "тонкого" подстраивания [31].

Следует отметить, что подобной агрегации протеинов уделяется повышенное внимание, особенно в присутствии агентов, которые могут ее нарушить [32–38]. Многие ферменты действуют только в виде олигомеров, и их агрегация обычно осуществляется за счет гидрофобного связывания неполярных боковых цепей. Ожидается, что связывание циклодекстриновыми димерами этих боковых цепей может нарушить агрегацию и ингибировать ферменты. Например, ВИЧ- протеаза относится именно к ферментам такого типа [35], и этот факт может найти важное медицинское применение.

Агрегация конкретного белка путем ассоциации его гидрофобных участков — важное и широко распространенное явление, которое может происходить также путем связывания двух разных белков, как, например, связывание гормона роста человека со своим рецептором [39]. В развитии такой возможности для медико-биологических исследований в разных направлениях окажется полезным использование не только димерных, но и олигомерных циклодекстринов.

Например, известна так называемая противоопухолевая фотодинамическая терапия, которая заключается в том, что фоточувствительный препарат (фотосенсибилизатор) после фотооблучения опухолевого участка онкобольного генерирует синглетный кислород, который убивает соседние клетки. Проблема, однако, заключается в обеспечении точечной доставки фотосенсибилизатора к опухолевому участку, чтобы максимально повысить эффективность и, главное, минимизировать побочные токсичные эффекты при фотоактивации других частей организма. С этой целью был синтезирован циклодекстриновый димер (8), чей линкер содержит олефиновый фрагмент с двумя атомами серы по краям [40].





Такой электрононасыщенный олефин легко реагирует с синглетным кислородом, образуя сначала диоксетан, который затем расщепляется, образуя карбонильные группы [34]. Найдено, что димер (8) связывает фталоцианиновый фотосенсибилизатор (9), несущий гидрофобные третбутилфенильные группы, и обеспечивает его водорастворимость [40]. Фотооблучение этого комплекса вызывает разрыв линкера синглетным кислородом и сенсибилизатор удаляется. Важно, что высвобождение сенсибилизатора облегчается потерей хелатного связывания у циклодекстриновых фрагментов (10), при этом расщепленные фрагменты линкера сами включаются в циклодекстриновые полости, конкурентно вытесняя сенсибилизатор. Другая перспектива применения циклодекстриновых димеров заключается в том, что их комплексы включения с такими важными противоопухолевыми препаратами как Паклитаксел (Paclitaxel) [41] и Метотрексат (Methotrexate) [42, 43], а также с рядом других лекарственных соединений [44, 45] становятся достаточно водорастворимыми, а их биодоступность возрастает по сравнению с исходным лекарственным средством, в том числе за счет более прочного связывания с димерным, чем с мономерным циклодекстрином.

Еще одна перспектива использования олигомерных циклодекстринов заключается в создании искусственных ферментов, которые будут связывать субстраты и работать с ними с селективностью, определяемой только геометрией комплексов. Эта возможность была реализована при использовании хелатирующего связывания с помощью циклодекстриновых тетрамеров. Так, получены тетрафенилпорфирины, несущие циклодекстриновые фрагменты, и исследованы их Mn(II) комплексы (11) как катализаторы для гидроксилирования связанных стероидов [46, 47]. Стероид (12), который дал наиболее интересные результаты, был получен из андростандиола путем присоединения к каждому гидроксилу сложноэфирной группы, которая несла гидрофобные *трет*-бутилфенильные группы (для связывания с циклодекстринами) и водосолюбилизирующие сульфонатные группы.



Обнаружено, что субстрат (12) связывается с циклодекстринами на противоположных концах порфиринового фрагмента в комплексе (11) таким образом, что стероидный углерод (С\*) находится прямо над Mn(III) в порфирине. Последующая обработка иодозобензолом, в качестве окислителя, вызывает перенос атома кислорода на Mn(III), приводя к гидроксилированию насыщенного атома углерода стероида (С\*). Образуется только единственный продукт (13) с количественным выходом, высокой стереоселективностью и примерно со 180 каталитическими циклами.

Малоизученный, но важный аспект применения димерных циклодекстринов заключается в том, что они могут быть представлены как так называемые Болаамфифилы (Bolaamphiphiles) — то есть амфифильные молекулы, которые имеют две гидрофильные группы на концах относительно длинной гидрофобной углеводородной цепи. Присутствие второй гидрофильной "головки" резко повышает растворимость в воде, увеличивает критическую концентрацию мицеллообразования, что позволяет таким болаамфифилам образовывать в воде разнообразные ансамбли: сферы, цилиндры, диски, везикулы и т.п.

#### ЦИКЛОДЕКСТРИНОВЫЕ ДИМЕРЫ (ОЛИГОМЕРЫ), СВЯЗАННЫЕ ЛИНКЕРОМ ПО ПЕРВИЧНЫМ ГИДРОКСИЛЬНЫМ ГРУППАМ

Выше уже упоминались трудности при регионаправленной функционализации циклодекстринов, главным образом, из-за наличия внутренней гидрофобной полости и ряда других структурных особенностей. Понятно, что в случае димерных (олигомерных) циклодекстринов это обстоятельство должно еще более затруднять их получение и направленную функционализацию. (R. Breslow) Р. Бреслоу для молекулярного узнавания холестерина синтезировал димер (14) (схема 1) и определил





константу связывания, которая оказалась в 200-300 раз выше, чем константа связывания холестерина с мономерным  $\beta$ -циклодекстрином (2) [48]. Ацилированием 6-амино-6-дезок-си- $\beta$ -циклодекстрина триспентафторфенило-

выми эфирами соответствующих трикарбоновых кислот получен набор тримеров (15)–(18), тритопное связывание которыми ведет к сильному и избирательному комплексообразованию [49].



Из пропаргилированного бензилзащищенного β-циклодекстрина (19) и иодоалкенильного α-циклодекстрина (20) впервые получен так называемый циклодекстриновый гетеродуплекс (21) [50], содержащий в своем составе два разных (α- и β-) циклодекстриновых фрагмента. Ранее аналогично получен и гомодуплекс, содержащий два одинаковых остатка α-циклодекстрина [51].



Димерные β-циклодекстрины (22) и (23) с диселеноорганическим мостиком были исследованы для узнавания размера и формы молекул ряда красителей [52] (акридиновый красный, нейтральный красный, метиленовый голубой, метиловый оранжевый и метиловый красный) и найдено, что они обладают повышенной комплексообразующей способностью и возможностью распознавать структурные различия молекул красителей именно благодаря кооперативному связыванию двумя близко расположенными циклодекстриновыми полостями.



Такие же результаты получены и при связывании  $\beta$ -циклодекстриновым димером (**24**) в водном растворе метил- (R = Me) и этил- (R = Et) оранжа (**25**) [53], а также при связывании разными димерами (**26**) этилоранжа [54].



С аналогичной целью синтезированы четыре димера (27)–(30), различающихся длиной связующего мостика, и изучена их комплексообразующуя способность по отношению к шести разным красителям [55].



Найдено, что длина линкера между двумя циклодекстринами играет определяющую роль в молекулярном узнавании молекул красителей так, что константы связывания с молекулами "хозяевами" снижаются при увеличении длины линкера. В работе [56] предложен способ получения димерного производного  $\gamma$ -циклодекстрина (**31**) (схема 2) исходя из монотозильного производного и бис(4-нитрофенил)сукцината (4-NPS) или димерного производного (**32**) (схема 3), через азидопроизводное  $\gamma$ -циклодекстрина:







Путем конденсации 6-амино-6-дезокси- $\alpha$ -,  $\beta$ -циклодекстринов с терефталевой кислотой получены три  $\alpha$ , $\alpha$ -,  $\alpha$ , $\beta$ - и  $\beta$ , $\beta$ -димеры (33) (схема 4) [57], которые изучены на предмет образования супрамолекулярных гидрогелей с так называемым виологеновым (viologen) полимером (**34**).



Найдено, что только с α,α-димером образуется высокоэластичный супрамолекулярный гидрогель за счет "нанизывания" на метиленовые гидрофобные участки виологенового полимера, а терминальные катионные гидрофильные участки полимера выполняют роль "стопперов". Монотозильное производное β-циклодекстрина широко используется для получения димерных диамин-производных (**35**) (схема 5) с различной длиной диаминного мостика [58–60], которые нашли применение как молекулы "хозяева" для различных лекарственных соединений (схема 6) [58, 59]:



Схема 6.

Моноиодпроизводное β-циклодекстрина послужило исходным соединением для получения дикатионного ("заряженного") димера (36) (схема 7):





Методами спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>Н, капиллярного электрофореза, спектрофотометрии и фазовой растворимости обнаружено, что димер (**36**) действует как эффективная дитопная молекула "хозяина" по отношению к противоопухолевому соединению Метотрексат, образуя в воде стабильные комплексы включения состава 1 : 2. Изучена термодинамика и геометрия этого комплекса в сравнении с комплексами мономерного и полимерных циклодекстринов и найдено, что благодаря "кооперативному" эффекту двух циклодекстриновых полостей димерный циклодекстрин (**36**) проявляет существенно более эффективное комплексообразование, чем мономерный и полимерные циклодекстриновые аналоги [**4**3].

Исходя из моноаминопроизводных α- и β-циклодекстринов получены ди- (37) и тримерные (38) производные, содержащие гибкий диамидный эфирный мостик для лучшего подстраивания при имитации взаимодействия рецептора и лиганда в биологических процессах [61].



Аналогично, из моноаминопроизводного β-циклодекстрина синтезирован новый фотопереключаемый димер (**39**), несущий диазабензольную группировку в качестве линкера, обладающий высокой водорастворимостью и способностью к *цис-*, *транс*фотоизомеризации при УФ-облучении (схема 8) [62].



Схема 8.

Аналогично диазасоединениям *транс*-стильбеновые димерные β-циклодекстрины (40) (схема 9) открывают путь для получения молекулярных машин, переключаемых светом из транс- в цис-положение.



Изучено включение дитопного диадамантанового "гостя" (41) при фотооблучении.



Оказалось, что в стабильной *транс*-конфигурации димер (40) с "гостем" (41) образует стабильный комплекс 1 : 1 с небольшим количеством супрамолекулярного линейного полимера, тогда как в условиях УФ-облучения изомеризованный цис-изомер образует супрамолекулярные полимеры с высокой молекулярной массой [63].

Для получения супрамолекулярных полимеров также изучены димер (42) (схема 10) на основе терефталевой кислоты и дитопный диадамантановый "гость" (43).





Схема 9.

28



Оказалось, что дитопный "гость" (43) с жестким мостиком (n = 0) между двумя терминальными адамантанами образует с димером (42) высокомолекулярный супрамолекулярный линейный полимер, тогда как с гибким мостиком (n = 2, 3) образуются циклические супрамолекулярные олигомеры типа (44) [64].





Возможна и "прививка" (grafting) циклодекстринового димера (45) (схема 11) на азидфункционализированную кварцевую поверхность [65].



ТВТА: трис(бензилтриазолилметил)амин

Схема 11.



Схема 12.

Этот "привитый" димер (**46**) (схема 12) образует комплекс 1 : 1 с флуоресцентным "гостем" (2-анилинонафталин-6-сульфоновая кислота: 2,6-ANS), причем флуоресциирующий гость включается в обе циклодекстриновые полости.

Легко получаемые олигомерные циклодекстриновые наногубки (карбонатные (**47**) (схема 13) и карбоксилатные (**48**) (схема 14) [66]) могут быть использованы как инновационные эксипиенты для наномедицины, для улучшения водорастворимости плохо растворимых в воде лекарственных соединений и защиты их от биоразложения.





Циклодекстриновые димеры (49), (50), образованные длинным мостиком по первичным гидроксильным группам "голова к голове", обладают неожиданным свойством: в зависимости от жесткости (или гибкости) и от длины соединяющего мостика они могут образовывать псевдоротаксаны путем самовключения одного (49 $\leftrightarrow$ 51) или двух (50 $\leftrightarrow$ 52) концов мостика в полость циклодекстрина за счет обратимого поворота вокруг 1,4-межгликозидной связи одного (или двух) глюкозидных фрагментов, несущих мостиковый заместитель. Такой переход зависит от природы растворителя и приводит к образованию димеров с конфигурацией "голова к хвосту" **51** (схема 15) или "хвост к хвосту" **52** (схема 16) [67–70]. Важно, что такое самовключение ограничивает возможности димера к включению других "гостей".



Схема 16.

Дисульфидный димер (53) (схема 17) показал высокие комплексующие свойства по отношению к потенциальному противоопухолевому препарату Cu-BBC адресной доставки (ди-*mpem*-бутил-Cuциклен) за счет включения гидрофобных *mpem*-бутилфенильных остатков в циклодекстриновые полости димера [71].



#### ЦИКЛОДЕКСТРИНОВЫЕ ДИМЕРЫ, Связанные линкером по вторичным гидроксильным группам

В литературе такие производные представлены заметно скромнее, что связано с более сложным путем их синтеза из-за необходимости постановки защит на первичных гидроксилах, хотя именно они часто проявляют более широкие способности для хелатирования дитопных лигандов за счет более широкого "входа" со стороны вторичных гидроксильных групп [72]. Обычно их получают либо путем образования 2,3-эпоксида из вторичных гидроксильных групп с последующим алкилированием, либо путем депротонирования наиболее кислотной гидроксильной группы положения 2 глюкозидного остатка с последующим алкилированием образующего карбоксилат аниона. Причем из-за существенной разности в кислотности гидроксильных групп (3-OH-группы заметно менее кислотные, чем 2-OH) для получения 2,2'- и 3,3'-димеров применяют разные экспериментальные подходы [25].

Так, например, изучены хелатирующие свойства двух димерных производных  $\beta$ -циклодекстрина (54) по отношению к 6-(*n*-толуидино)-2-нафталинсульфоновой кислоте (TNS), а димерное производное с бипиридильным мостиком использовали для получения металлокомплексов с Rh(II) [73].



Оказалось, что димер с коротким линкером (n = 2) связывает крепче молекулу TNS, чем димер с более длинным (n = 8) и примерно так же, как димер с сульфидным мостиком по первичным гидроксилам [74].

Интересно, что попытки алкилирования незащищенного β-циклодекстрина, предварительно обработанного гидридом натрия с целью получения бипиридинового мостика для образования металлокомплексов аналогичных димеру (54), привела к сложной смеси трех возможных изомеров (55) (схема 18) [74]:



#### Схема 18.

Аналогично получен димер (56) (схема 19), содержащий гибкий *пара*-диметиленфениленовый мостик [75],



Схема 19.

а с помощью 2-тозилпроизводного β-циклодекстрина получен димер (57), содержащий гибкие сульфидные мостики [76].





Обнаружено, что димер (57) (схема 20) проявляет исключительно высокие константы связывания по отношению к некоторым азакрасителям, значительно превышающие таковые для мономерного β-циклодекстрина. Обработкой 2,3-эпоксида γ-циклодекстрина гидроокись аммония, а затем бис(4-нитроенил)сукцинатом (4-NPS) получен 3,3'-диамидосвязанный димер (58) (схема 21), представляющий особый интерес для связывания объемных "гостей" (фуллерены, порфирины) [56].





Более сложная схема получения индивидуальных 2,2'- и 3,3'-циклодекстринов (**59**) (схема 22) включает сначала получение защищенных циклодекстринов с одним свободным гидроксилом в положении 2 или 3, последующую молекулярную сборку путем димеризации двух одинаковых терминальных алкенсодержащих фрагментов и снятие силильных защит [77].





Недавно были синтезированы два димерных 2,2'-связанных циклодекстрина (60), с жестким линейным спейсером разной длины [42].



Оба димера способны включать каждый по две молекулы противоопухолевого хемотерапевтического соединения метотрексата, причем с константой связывания в 2.4—3.5 большей, чем для мономерного  $\beta$ -циклодекстрина [79]. Аналогичные данные получены и при комплексообразовании метотрексата с димерным циклодекстрином, связанным по первичным гидроксилам [43]. Благодаря кооперативному содействию двух циклодекстриновых полостей, дансил-модифицированный димер (61) (схема 23) образует значительно более прочные комплексы со стероидными солями желчи, чем нативный β-циклодекстрин, а флуоресцентная метка служит сенсором для стероидов [78].



Схема 23.

Димерный 2,2'-дителлуробис-β-циклодекстрин (**62**) (схема 24) хорошо работает как селективный флуоресцентный сенсор по хиральному разделению дансил-*L*-фенилаланина (DLP) и дансил-*D*-фенилаланина (DDP) [79].



#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящий момент димерные (олигомерные) производные циклодекстринов представляют собой перспективный класс соединений с большими возможностями практического применения в различных областях супрамолекулярной химии, металлокомплексном катализе, биомиметической и фармацевтической химии, биохимических исследованиях и в ряде других междисциплинарных направлениях. Прогресс в развитии этих направлений во многом определяется нашими знаниями о возможностях синтеза таких структур и их способностей к образованию соединений включения. Можно надеяться, что данный обзор будет способствовать пониманию важной роли димерных (олигомерных) производных циклодекстринов и стимулирует новые исследования в этой области.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Лен Ж.-М. Супрамолекулярная химия: концепции и перспективы. Пер. с англ. Новосибирск: Наука. Сиб. Предприятие РАН, 1998. 334 с.
- Steed J.W., Atwood J.L. // Supramolecular Chemistry, J. Wiley& Sons Ltd. Chichester. 2000. 745 p.
- 3. *Dodziuk H.* Cyclodextrins and Their Complexes. Chemistry, Analytical Methods, Application. Wiley-VCH, Weinheim, 2006. 489 p.
- 4. Chem. Rev. (special issue). 1998. V. 98. № 5.
- 5. Beilstein J. Org. Chem. (special issue), 2012. V. 8.
- 6. Beilstein J. Org. Chem. (special issue), 2014. V. 10.
- Khan A.R., Forgo P., Stine K.J., D'Souza V.T. // Chem. Rev. 1998. V. 98. № 5. P. 1977–1996.
- 8. Szejtli J. // Chem. Rev. 1998. V. 98. № 5. P. 1743–1753.
- 9. Saenger W., Jacob J., Gessler K., Steiner T., Hoffman D., Sanbe H., Kozumi K., Smith S.M., Tanaka T. // Chem. Rev. 1998. V. 98. № 5. P. 1787–1802.
- Croft A.P., Bartsch R.A. // Tetrahedron. 1983. V. 39. № 9. P. 1417–1474.
- 11. Clazyrin A.E., Kurochkina G.I., Crachev M.K., Nifant'ev E.E. // Mendeleev Commun. 2001. № 6. P. 218–219.
- Грачев М.К., Глазырин А.Е., Курочкина Г.И., Нифантьев Э.Е. // Ж. общ. хим. 2004. Т. 74. Вып. 5. С. 877–878 [Grachev M.K., Glazyrin A.E., Kurochkina G.I., Nifant'ev E.E. // Russ. J. Gen. Chem. 2004. V. 74. P. 808–809].
- Глазырин А.Е., Сырцев А.Н., Курочкина Г.И., Кононов Л.О., Грачев М.К., Нифантьев Э.Е. // Изв. АН. Сер. хим. 2003. Вып. 1. С. 225–234 [Glazyrin A.E., Syrtsev A.N., Kurochkina G.I., Kononov L.O., Crachev M.K., Nifant'ev E.E. // Russ. Chem. Bull. 2003. V. 52. P. 237– 243].
- 14. Грачев М.К. // Усп. хим. 2013. Т. 82. Вып. 11. С. 1034–1046 [*Crachev M.K.* // Russ. Chem. Rev. 2013. V. 82. P. 1034–1046].
- 15. de Miranda J.C., Martins T.E.A., Veiga F., Ferraz H.G. // Braz. J. Pharm. Sci. 2011. V. 47. № 4. P. 665–681.
- Harada A., Furue M., Nozakura S.I. // Macromolecules. 1977. V. 10. P. 676–679.
- Tabushi I., Kuroda Y., Shimokawa K. // J. Am. Chem. Soc. 1979. V. 101. P. 1614–1615.
- Harada A., Furue M., Nozakura S.I. // Polym. 1981. V. 13. P. 777–781.
- 19. Fujita K., Ejima S., Imoto T. // Chem. Soc., Chem. Commun. 1984. P. 1277–1278.

- 20. Breslow R., Greenspoon N., Guo T., Zarzycki R. // J. Am. Chem. Soc. 1989. V. 111. P. 8296–8297.
- 21. Cho E., Jung S. // Molecules. 2015. V. 20. P. 19620-19646.
- 22. *Liu Y., Chen Y.* // Acc. Chem. Res. 2006. V. 39. P. 681–691.
- 23. Tilloy S., Binkowski-Machut C., Menuel S., Bricout H., Monflier E. // Molecules. 2012. V. 17. P. 13062–13072.
- Blaszkiewicz C., Bricout H., Leonard E., Len C., Landy D., Cezard C., Djedaïni-Pilard F., Monflier E., Tilloy S. // Chem. Commun. 2013. V. 49. P. 6989–6991.
- 25. *Breslow R., Belvedere S., Gershell L., Leung D.* // Pure Appl. Chem. 2000. V. 72. № 3. P. 333–342.
- 26. Beilstein J. Org. Chem. (special issue), 2015. V. 11.
- 27. *Breslow R., Chung S.* // J. Am. Chem. Soc. 1990. V. 112. P. 9659–9660.
- Zhang B., Breslow R. // J. Am. Chem. Soc. 1993. V. 115. P. 9353–9354.
- Zhang B., Breslow R. // J. Am. Chem. Soc. 1997. V. 119. P. 1676–1681.
- 30. *Yan J., Breslow R.* // Tetrahedron Lett. 2000. V. 41. P. 2059–2062.
- Breslow R., Yang Z., Ching R., Trojandt G., Odobel F. // J. Am. Chem. Soc. 1998. V. 120. P. 3536–3537.
- 32. Zutschi R., Brickner M., Chmielewski J. // Current Opinion in Chemical Biology. 1998. V. 2. P. 62–66.
- Chmielewski J. // Biopolymers. 1998. V. 47. P. 277– 283.
- Zutshi R., Shultz M.D., Ulysse L., Lutgring R., Bishop P., Schweitzer B., Vogel K., Franciskovich J., Wilson M., Chmielewski J. // Synlett. 1998. V. 10. P. 1040–1044.
- Zutshi R., Franciskovich M., Shultz M., Schweitzer B., Bishop M., Wilson M., Chmielewski J. // J. Am. Chem. Soc. 1997. V. 119. P. 4841–4845.
- Daugherty D.L., Gellman S.H. // J. Am. Chem. Soc. 1999. V. 121. P. 4325–4333.
- Park H.S., Lin Q., Hamilton A.D. // J. Am. Chem. Soc. 1999. V. 121. P. 8–13.
- Lin Q., Park H.S., Humaro Y., Lee C.S., Hamilton A.D. // Biopolymers. 1998. V. 47. P. 285–297.
- Clackson T., Ultsch M.H., Wells J.A., de Vos A.M. // J. Mol. Biol. 1998. V. 277. P. 1111–1128.
- 40. *Ruebner A., Yang Z., Leung D., Breslow R. //* Proc. U.S. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 14692–14693.
- 41. Liy Y., Chen G.-S., Li L., Zhang H.-Y., Cao D.-X., Yuan Y.-J. // J. Med. Chem. 2003. V. 46. P. 4634–4637.
- Aykaç A., Martos-Maldonado M.C., Casas-Solvas J.M., Garsiá-Fuentes L., Vargas-Berenguel A. // J. Drug Del. Sci. Tech. 2012. V. 22. P. 270–272.
- Kritskiy I., Kumeev R., Volkova T., Shipilov D., Kutysheva N., Grachev M., Terekhova I. // New J. Chem. 2018. V. 42. P. 14559–14567.
- 44. Grachev M.K., Malenkovskaya M.A., Vasyanina L.K. // J. Incl. Phenom. and Macrocyclic Chem. 2015. V. 83. № 3–4. P. 209–214.
- 45. Маленковская М.А., Васянина Л.К., Грачев М.К. // Ж. общ. хим. 2015. Т. 85. Вып. 7. С. 1161–1165. [Malenkovskaya M.A., Vasyanina L.K., Grachev M.K. // Russ. J. Gen. Chem. 2015. V. 85. Р. 1161–1165].
- 46. *Breslow R., Zhang X., Huang Y. //* J. Am. Chem. Soc. 1997. V. 119. P. 4535–4536.
- 47. *Breslow R., Gabriele B., Yang J.* // Tetrahedron Lett. 1998. V. 39. P. 2887–2890.

- 48. Breslow R., Zhang B. // J. Am. Chem. Soc. 1996. V. 118. № 35. P. 8495–8496.
- 49. Leung D.K., Atkins J.H., Breslow R. // Tetrahedron Lett. 2001. V. 42. № 36. P. 6255–6258.
- 50. *Bistri O., Lecourt T., Mallet J.-M., Sollogoub M., Sinaÿ P. //* Chem. and Biodivers. 2004. V. 1. № 1. P. 129–137.
- 51. *Lecourt T., Mallet J.-M., Sinaÿ P.* // Tetrahedron Lett. 2002. V. 43. P. 5533–5536.
- Chen Y., Li L., Liu Y. // Chem. J. Chin. Univ. 2002. V. 23. № 6. P. 1091–1093.
- 53. Zheng X.Q., Wang Y.H., Guo Q.X., Yang L., Liu Y.C. // Chin. Chem. Lett. 2003. V. 14. № 8. P. 848–851.
- 54. Song L.X. // Chin. Chem. Lett. 2002. V. 13. № 10. P. 1005–1006.
- 55. Zhao Y., Liu X.Q., gu Juan., Wang L.-Q., Zhu H.-Y., Huang R., Wang Y.-F., Yang Z.-M. // J. Phys. Org. Chem. 2008. V. 21. № 6. P. 440–448.
- 56. *Pham D.-T., Ngo H.T., Lincoln S.F., May B.L., Easton C.J.* // Tetrahedron. 2010. V. 66. P. 2895–2898.
- Takashima Y., Yuting Y., Otsubo M., Yamaguchi H., Harada A. // Beilstein J. Org. Chem. 2012. V. 8. P. 1594– 1600.
- 58. Маленковская М.А., Левина И.И., Грачев М.К. // Ж. орг. хим. 2014. Т. 50. Вып. 8. С. 1211–1215 [Malenkovskya M.A., Levina I.I., Grachev M.K. // J. Org. Chem. 2014. V. 50. № 8. Р. 1211–1215].
- Shipilov D.A., Kurochkina G.I., Akhlebinin A.K., Kutyasheva N.V., Grachev M.K. // Macroheterocycles. 2019. V. 12. № 1. P. 94–97.
- Tripodo G., Wischke C., Neffe A. T., Lendlein A. // Carbohydr. Res. 2013. V. 381. P. 59–63.
- 61. *Kurlemann M., Kavoo B.J.* // Beilstein J. Org. Chem. 2014. V. 10. P. 2428–2440.
- 62. Hamon F., Blaszkiewicz C., Monflier E., Djedaim-Pilard F. // Beilstein J. Org. Chem. 2014. V. 10. P. 2874–2885.
- 63. Kuad P., Miyawaki A., Takashima Y., Yamaguchi H., Harada A. // J. Am. Chem. Soc. 2007. V. 129. № 42. P. 12630–12631.
- 64. Ohga K., Takashima Y., Takashima Y., Kawaguchi Y., Yamaguchi H., Harada A. // Macromolecules. 2005. V. 38. № 14. P. 5897–5904.

- Städe L.W., Nielsen T.T., Duroux L., Wimmer R., Shimizu K., Larsen K.L. // Beilstein J. Org. Chem. 2015. V. 11. P. 514–523.
- 66. *Trotta F., Zanetti M., Cavelli R. //* Beilstein J. Org. Chem. 2012. V. 8. P. 2091–2099.
- 67. Maurer M., Hapiot F., Monflier E., Menuel S. // Tetrahedron. 2008. V. 64. P. 7159–7163.
- 68. Manuel S., Azaroul N., Landy D., Six N., Hapiot F., Monflier E. // Chem. Eur. J. 2011. V. 17. P. 3949–3955.
- Voskuhl J., Schaepc K., Ravoo B.J. // Int. J. Mol. Sci. 2011. V. 12. P. 4637–4646.
- Terao J., Konoshima Y., Matono A., Masai H., Fujihara T., Tsuji Y. // Beilstein J. Org. Chem. 2014. V. 10. P. 2800– 2808.
- 71. Edwards W.B., Reichert D.E., d'Avignon D.A., Welch M.J. // Chem. Commun. 2001. P. 1312–1313.
- Casas-Solvas J.M., Quesad-Soriano I., Carreno-Gazquez D., Gimenez-Martinez J.J., Garcia-Fuentes L., Vargas-Berenguel // Langmuir. 2011. V. 27. P. 9729– 9737.
- Venema F., Baselier C.M., van Dienst E., Ruel B.H.M., Feiters M.C., Endersen J.F.J., Reinhoudt D.N., Nolte R.J.M. // Tetrahedron Lett. 1994. V. 35. № 11. P. 1773–1776.
- 74. Yan J., Breslow R. // Tetrahedron Lett. 2000. V. 41. № 13. P. 2059–2062.
- 75. vanDienst E., Shellink B.H.M., von Piekartz I., Grote Gansey M.H.B., Venema F., Feiters M.C., Nolte R.J.M., Engbersen J.F.J., Reinhoudt D.N. // J. Org. Chem. 1995. V. 60. P. 6537–6545.
- 76. *Jiang T., Sukumaran D.K., Soni S.-D., Lawrence D.S.* // J. Org. Chem. 1994. V. 59. № 18. P. 5149–5155.
- 77. Chiu S.-H., Myles D.C., Garrell R.L., Stoddart J.F. // J. Org. Chem. 2000. V. 65. № 9. P. 2792–2796.
- De Jong M.R., Engbersen J.F.J., Huskens J., Reinhoudt D.N. // Chem. Eur. J. 2000. V. 6. P. 4034–4040.
- 79. Jia S.-Y., Hao Y.-Q., Li L.-N., Chen K., Wu Y., Liu J., Wu L., Ding Y.-H. // Chem. Lett. 2005. V. 34. № 9. P. 1248–1249.

## Dimeric (Oligomeric) Derivatives of Cyclodextrins as a New Class of Supramolecular Systems. Synthesis and Inclusion Complexes on Their Basis

M. K. Grachev<sup>\*, #</sup>, I. V. Terekhova<sup>\*\*</sup>, D. A. Shipilov<sup>\*</sup>, N. V. Kutyasheva<sup>\*</sup>, and E. Y. Emelianova<sup>\*</sup>

<sup>#</sup>*Phone*: +7 (495) 682-02-45; e-mail: mkgrachev@yandex.ru

\*Moscow State University of Education, Institute of Biology and Chemistry,

ul. Kibal'chicha 6/2, Moscow, 129164 Russia

\*\*Krestov Institute of Solution Chemistry of the Russian Academy of Sciences,

ul. Akademicheskaya 1, Ivanovo, 153045 Russia

We have summarized the works connected with obtaining and application of dimeric (oligomeric) derivatives of cyclodextrins. Due to the presence of two or more internal cyclodextrin cavities, their spatial proximity and other peculiarities, these derivatives possess higher, so-called "cooperative" effect with respect to inclusion of numerous of "guests". It allows us to define them as a new class of supramolecular structures. We have briefly analyzed their opportunities in different fields of organic, analytical and medical chemistry.

Keywords: cyclodextrins, supramolecular chemistry, dimers, inclusion complexes, "guest-host", "cooperative effect", complex formation, ligand



УДК 547.466:577.112.6

## КОНВЕРГЕНТНЫЙ СИНТЕЗ ГАЛАНИНА КРЫСЫ И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

# © 2020 г. М. В. Сидорова<sup>\*, #</sup>, М. Е. Палькеева<sup>\*</sup>, Д. В. Авдеев<sup>\*</sup>, А. С. Молокоедов<sup>\*</sup>, М. В. Овчинников<sup>\*</sup>, А. А. Азьмуко<sup>\*</sup>, Л. И. Серебрякова<sup>\*</sup>, О. М. Веселова<sup>\*</sup>, И. М. Студнева<sup>\*</sup>, О. И. Писаренко<sup>\*</sup>

\*ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии" Минздрава России, Россия, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул. 15а

> Поступила в редакцию 11.04.2019 г. После доработки 19.06.2019 г. Принята к публикации 26.06.2019 г.

Конвергентным твердофазным синтезом с использованием Fmoc-методологии получен полноразмерный галанин крысы GWTLNSAGYLLGPHAIDNHRSFSDKHGLT-NH<sub>2</sub> (G29). Пептидную цепь в ходе синтеза наращивали по одной аминокислоте и фрагментной конденсацией. Фрагменты с *C*-концевым остатком глицина получали твердофазным методом на 2-хлортритилхлоридной смоле или в растворе. После ВЭЖХ-очистки галанин имел корректную молекулярную массу и чистоту 98%. Кардиопротекторные свойства G29 изучали на модели острого инфаркта миокарда у крыс. Введение G29 уменьшало размеры инфаркта миокарда на 40% и снижало активность маркеров некроза MB-креатинкиназы и лактатдегидрогеназы в плазме. Пептид G29 улучшал метаболическое состояние сердца – увеличивал содержание ATP, общего фонда адениннуклеотидов, фосфокреатина, общего креатина и снижал уровень лактата по сравнению с контролем. Результаты указывают на возможность использования пептида G29 в качестве препарата для уменьшения реперфузионных повреждений сердца и необходимость изучения механизмов его действия.

Ключевые слова: галанин крысы, пептидные кардиопротекторы, пептиды, твердофазный синтез, фрагментная конденсация, ишемия и реперфузия сердца, энергетический обмен

DOI: 10.31857/S0132342320010121

#### **ВВЕДЕНИЕ**

Нейропептид галанин (G29), состоящий из 29 аминокислотных остатков (а.о.) (29 а.о. – у большинства млекопитающих, 30 а.о. – у человека), синтезируется преимущественно в головном и спинном мозге и, в меньшей степени, в кишечнике, он широко распространен в центральной и периферической нервной системе [1]. Галанин регулирует ряд важных функций организма: запоминания, потребления пищи, засыпания, алкогольной зависимости, невропатической боли, выработки гормонов и др. Этот пептид участвует в центральной регуляции сердечно-сосудистой системы [2, 3], снижает резистентность к инсулину [4] и улучшает поглощение глюкозы в сердце экспериментальных животных на моделях сахарного диабета [5]. В сердце и периферических органах и тканях галанин действует не только через нейрональные механизмы, но и активируя клеточные рецепторы GalR1-3 [4, 5], которые являются потенциальной мишенью для лечения различных заболеваний [6]. Литературные данные [7, 8] позволяют предположить участие галанина в реализации различных механизмов защиты сердца от ишемического и реперфузионного повреждения. Однако до настоящего времени эти механизмы мало изучены и данных о влиянии галанина на сердечно-сосудистую систему немного [9].

Настоящая работа является продолжением наших исследований по поиску и изучению пептидов, обладающих кардиопротекторными свойствами. Ранее нами было показано, что *N*-концевые фраг-

Сокращения: Вос - *трет*-бутилоксикарбонил; Bzl - бензил; DCM – дихлорметан; DIEA – N, N-диизопропилэтиламин; DIC – N,N'-диизопропилкарбодиимид; Fmoc – 9-флуоренилметоксикарбонил; GalR – рецептор галанина; MALDI - масс-спектрометрия методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации; 4-МеРір – 4-метилпиперидин; NMM – *N*-метилморфолин; NMP – *N*-метилпирролидон; HONSu – N-гидроксисукцинимид; Pbf – 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил; ТІЅ – триизопропилсилан; ТFA – трифторуксусная кислота; Tos – тозил; Trt – тритил; ЗР – зона риска; Ž – бензилоксикарбонил; ИМ – инфаркт миокарда; Кр – креатин; МВ-КК – креатинкиназа МВ; ЛЖ – левый желудочек; ПНА – правая нисходящая артерия; САД – систолическое артериальное давление; ТФС – твердофазный синтез; ФКр – фосфокреатин; ЧСС – частота сердечных сокращений.

<sup>&</sup>lt;sup>#</sup> Автор для связи: (тел. +7 (495) 414-67-16; эл. почта: peptidecardio@yandex.ru).


Рис. 1. Аминокислотная последовательность галанина крысы (G29). Стрелками показаны места разбиения на фрагменты.

менты галанина улучшают восстановление функции изолированного сердца крысы после тотальной ишемии и ограничивают размеры инфаркта миокарда (ИМ) *in vivo* после региональной ишемии и реперфузии сердца крыс [10]. Эти эффекты обусловлены снижением образования активных форм кислорода, ингибированием апоптоза и связаны с улучшением энергетического состояния сердца [11]. Данная работа посвящена синтезу полноразмерного галанина крысы и изучению его биологической активности.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Выбор стратегии синтеза

Последовательность 29-членного галанина, приведенная на рис. 1, представляется достаточно сложной для ступенчатого твердофазного синтеза (ТФС). При многостадийном ТФС длинных пептидов за счет неколичественных выходов на стадиях деблокирования α-аминогрупп и последующего создания амидных связей образуются "ложные" пептиды с пропуском (делецией) отдельных аминокислотных остатков или их сочетаний. Последовательность галанина содержит ряд трифункциональных аминокислот (таких как Trp, Asp, Ser, Thr, Arg), легко вступающих в побочные реакции в ходе ТФС или постсинтетических процедур. Так, например, при синтезе аспартилпептидов на стадиях отщепления Fmocзащит действием вторичных аминов происходит образование циклического аспартимида, результатом чего является  $\alpha \rightarrow \beta$ -перегруппировка амидной связи с образованием изомерного побочного продукта.

Образование аспартимида, катализируемое кислотой или основанием, является одной из наиболее серьезных побочных реакций в ТФС пептидов, содержащих аспарагиновую кислоту, и до сих пор не разработана экономически эффективная стратегия ее подавления [12, 13]. Степень протекания транспептидации главным образом определяется конкретной аминокислотной последовательностью. Наиболее подвержены этой побочной реакции последовательности Asp-Gly, Asp-Asn, Asp-Asp [14, 15]. Для подавления транспептидации применяют различные методические приемы (использование объемных, стерически затрудненных защитных групп для β-карбоксильной функции аспарагиновой кислоты, модификации деблокирующего реагента для отщепления Fmoc-защиты, сокращение суммарного времени воздействия основных реагентов), однако полностью исключить эту побочную реакцию до сих пор не удается. В связи с вышесказанным очистка продукта ТФС, содержащего близкие по составу и свойствам примеси, — сложный многостадийный процесс.

Для преодоления перечисленных проблем был разработан конвергентный, или блочный [16–18] синтез полипептидов. В соответствии с этой стратегией последовательность пептида разбивается на относительно короткие фрагменты, которые получают на твердой фазе или в растворе и, после соответствующей очистки, конденсируют на полимерном носителе или в растворе. Этот метод был успешно применен при синтезе ряда полипептидов, насчитывающих от 24 до 100 а.о. [19-21]. В нашей лаборатории этот подход был использован в синтезе последовательности 1-42-В-амилоида [22] и 26-членного фрагмента, соответствующего иммунодоминантной последовательности 197–222 β<sub>1</sub>-адренорецептора [23]. Сравнительная оценка ступенчатого и фрагментного синтеза этих двух пептидов убедительно показала преимущества последнего подхода [22-24].

В этой связи для получения галанина был выбран комбинированный способ наращивания пептидной цепи: на отдельный участках пошагово, а на других – конденсацией фрагментов. Последовательность пептида была разбита на фрагменты по остаткам глицина (разбиение показано стрелками на рис. 1), соответствующие последовательностям 23-27 (ФІ), 9-12 (ФІІ) и 1-8 (ФІІІ). На участке 13-22, не содержащем "удобных" для фрагментации (нерацемизующихся при конденсации) аминокислотных остатков, было решено наращивать пептидную цепь ступенчато по одной аминокислоте. В сочетании с Fmoc-защитой α-аминогруппы для блокирования боковых функций аминокислот использовали Bu<sup>t</sup> – для гидроксильных групп Ser, Thr, Tyr и карбоксильной группы Asp; Вос – для ε-аминогруппы Lys и индольного кольца Trp; Pbf – для гуанидиновой группы Arg; Trt – для карбоксамидной группы Asn и имидазола His.

#### Синтез защищенных фрагментов

Синтез фрагментов  $\Phi I$  и  $\Phi III$  был проведен с использованием Fmoc-методологии на полимерном носителе с 2-хлортритил-хлоридной якорной группой [24], которая обеспечивает получение защищенных пептидных блоков со свободной *C*-концевой карбоксильной группой благодаря возможности "мягкого" расщепления якорной сложноэфирной связи (например, действием смеси уксусной кислоты и трифторэтанола в дихлорметане), при котором сохраняются защитные группы боковых цепей аминокислот.

Фрагмент **ФІІ** был получен классическими методами пептидной химии в растворе по схеме 1, исходя из бензилового эфира глицина. Пептидную цепь наращивали с использованием Вос- и Z-производных соответствующих аминокислот последовательным синтезом с использованием избытков смешанных ангидридов [25]. Полупродукты синтеза выделяли из реакционных смесей путем экстракции и промывок с последующей кристаллизацией из подходящих растворителей. Индивидуальность полупродуктов получения фрагмента **ФІІ** контролировали с помощью TCX. Вос-группу удаляли действием трифторуксусной кислоты, а Z-защиту отщепляли каталитическим гидрогенолизом над 5% палладием на угле (Pd/C). На заключительной стадии синтеза **ФІІ** после отщепления Z-группы в пептид вводили Fmoc-защитную группу действием Fmoc-ONSu по известной методике [26].



3) H<sub>2</sub>, Pd/C, EtOH

4) Fmoc-ONSu

Схема 1. Синтез пептидного фрагмента Fmoc-Tyr( $Bu^{t}$ )-Leu-Leu-Gly-OH ( $\Phi II$ ).

Индивидуальность полученных фрагментов **ФІ**–**ФІІІ** анализировали с помощью ТСХ и ВЭЖХ (после полного деблокирования соответствующих образцов). По данным аналитической ВЭЖХ чистота полученных фрагментов была не менее 90%. Структура пептидных фрагментов **ФІ**–**ФІІІ** подтверждена данными <sup>1</sup>Н-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. Характеристики фрагментов приведены в эксп. части.

#### Синтез галанина G29

ТФС G29 проводили с *С*-конца (см. схему 2) с использованием 3-кратных избытков N<sup>α</sup>-Fmoc-защищенных аминокислот и пептидных фрагментов на амидном полимере Ринка. На первом этапе синтеза ступенчато присоединяли остатки Thr<sup>29</sup> и Leu<sup>28</sup>, затем к дипептидилполимеру **PI** присоединяли пептапептид **ФI** и получали гептапептидилполимер **PII**. Начиная с Phe<sup>22</sup> и до Pro<sup>13</sup> (в течение 10 циклов TФС) синтез вели ступенчато, присоединяя по одной аминокислоте DIC/HOBt-методом. На завершающем этапе к пептидилполимеру **PIII** последовательно присоединяли блоки **ФII** и **ФIII**. Для конденсации пептидных фрагментов мы использовали комплекс F (аддукт *N*,*N*'-дициклогексилкарбодиимида и пентафторфенола в мольном соотношении 1 : 3) [21], хорошо зарекомендовавший себя в блочном ТФС [27]. Полноту протекания фрагментных конденсаций контролировали тестом Кайзера с нингидрином [28].



Схема 2. Конвергентный синтез галанина крысы G29. (Комплекс F – аддукт *N*, *N*-дициклогексилкарбодиимида и пентафторфенола в мольном отношении 1 : 3.)

Деблокирование α-аминогруппы в ходе синтеза G29 проводили 25% раствором 4-МеРір в DMF. Выше уже говорилось о том, что последовательность Asp-Asn, присутствующая в молекуле галанина, склонна к образованию аспартимида и последующей  $\alpha \rightarrow \beta$ -перегруппировке амидной связи в условиях ТФС с использованием Fmocметодологии [15]. Для минимизации этой побочной реакции, начиная со стадии деблокирования остатка Asn<sup>18</sup>, для отщепления Fmoc-защиты мы

использовали модифицированный деблокирующий реагент – 25% раствор 4-метилпиперидина с добавкой 0.1 М 1-гидроксибензотриазола, как было предложено в работе [29]. В результате конвергентного синтеза, проведенного в соответствии со схемой 2, был получен пептидилполимер **Р**V. после удаления N<sup>α</sup>-Fmoc-зашиты целевой продукт был отщеплен от полимера и полностью деблокирован действием трифторуксусной кислоты со специальными добавками. Неочищенный продукт G29 содержал по данным аналитической ВЭЖХ 77.1% основного вещества (рис. 2*a*). Для дополнительной оценки содержания аспартимидов в неочищенном продукте ТФС галанина G29 образец N<sup>α</sup> – свободного пептидилполимера **PV** был обработан деблокирующей смесью, не содержащей воды. Масс-спектрометрия полученного продукта показала, что, наряду с целевым пептидом G29 (m/z 3165.48), в его состав входит вещество с молекулярной массой на 18 Да меньше (m/z, 3147.306), которое может быть побочным аспартимидом (продуктом дегидратации) по остатку аспарагиновой кислоты, участвующей в образовании связи Asp-Asn. Соотношение интенсивностей целевого и побочного продуктов в масс-спектре составило 100 : 4.6 ( $\Delta$  – 18). Галанин был очищен с помощью ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой (рис. 26). Полученный пептид имел корректную молекулярную массу (по данным масс-спектрометрии) и оказался идентичен коммерческому образцу галанина крысы (GeneCust, Люксембург).

Таким образом, использованные нами конвергентный подход и модифицированный реагент для отщепления Fmoc-защит обеспечили получение неочищенного галанина крысы с хорошей чистотой и относительно низким содержанием побочных продуктов транспептидации (менее 2.5%); продукт, как видно на рис. 2*a*, не содержал трудноотделимых примесей с близкими временами удерживания. Выбранные для фрагментной конденсации пептидные блоки были хорошо растворимы в NMP, реакции образования амидной связи в присутствии комплекса F протекали достаточно быстро (в течение 4 ч) и с высокими выходами.

#### Оценка биологической активности пептида G29 у крыс in vivo

Нами была использована модель региональной ишемии и реперфузии сердца крыс Вистар. На начальном этапе было изучено дозозависимое влияние внутривенного введения G29 в начале реперфузии (после периода региональной ишемии) на размеры инфаркта миокарда (ИМ). Гистохимический анализ срезов левого желудочка (ЛЖ) сердца в конце реперфузии не выявил различий между экспериментальными группами в зоне



**Рис. 2.** Профили ВЭЖХ неочищенного (*a*) и очищенного (*б*) галанина крысы. Колонка Kromasil C18-100-5  $4.6 \times 250$  мм, размер частиц сорбента 5 мкм; пептиды элюировали со скоростью 1 мл/мин градиентом буфера Б в буфере А от 20 до 80% за 30 мин, буфер А – 0.05 М KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 3.0, буфер Б 70% ацетонитрил в буфере А, детекция при 220 нм (условия 1).

риска (ЗР). Величина ЗР/ЛЖ, % в контроле, в группе G29 и растворителя пептида G29 (0.2% DMSO) была близкой и составляла в среднем 41.1 ± 0.9%. Это означает, что повреждение сердца было стандартно моделировано у всех животных. В контроле величина инфаркта миокарда, выраженная отношением ИМ/ЗР, составила  $43.0 \pm 2.0\%$ . Введение 0.2% DMSO не влияло на этот показатель. Любая из изученных доз G29 достоверно ограничивала размеры ИМ (*P* < 0.005-0.001 (рис. 3а). В наибольшей степени отношение ИМ/ЗР (в %) снижалось под действием дозы 0.5 мг/кг – до 60% от величины в контроле. В дальнейшем она была использована в качестве оптимальной для изучения влияния пептида на активность маркеров некроза в плазме и метаболическое состояние ЗР.

Активность маркеров некроза креатинкиназы MB (MB-KK) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в плазме крови в исходном состоянии (перед окклюзией ПНА) составляла 270.2  $\pm$  28.5 и 92.8  $\pm$ 



Рис. 3. Уменьшение повреждения сердца пептидом G29 у крыс *in vivo*. (*a*) Дозозависимое снижение размеров инфаркта миокарда (ИМ/ЗР, %) при внутривенном введении G29 после региональной ишемии. Данные представлены как  $M \pm m$  для серий из 8 опытов. К – контроль. \* P < 0.001 от K, # P < 0.005 от K. ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ) Влияние внутривенного введения оптимальной дозы G29 (0.5 мг/кг) на активность креатинкиназы-МВ (-МВ- КК) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в плазме в конце реперфузии. Данные представлены как  $M \pm m$  для серий из 8 опытов. ИС – исходное состояние; К – контроль; DMSO – введение 0.2% DMSO. \* P < 0.05 от K и DMSO.

± 18.5 МЕ/л соответственно. Развитие ИМ в контроле сопровождалось увеличением активности обоих ферментов в конце реперфузии по сравнению с исходным состоянием – до 2350.1 ± ± 80.7 и 1415.0 ± 112.6 МЕ/л для МВ-КК и ЛДГ соответственно (рис. *36*, *36*). Введение оптимальной дозы G29 перед началом реперфузии достоверно снижало активность МВ-КК и ЛДГ на 25 и 30% соответственно, по сравнению с контролем.

Влияние введения пептида G29 на показатели метаболического состояния ЗР в конце реперфузии представлено в табл. 1. Ишемическое и реперфузионное повреждение вызывало значительные изменения в содержании метаболитов энергетического обмена и лактата в сердце. В контроле в конце реперфузии содержание АТР было снижено в 4.5 раза, а общий пул адениннуклеотидов (ΣАН) за счет уменьшения ADP – в 3 раза по сравнению с исходным состоянием. Содержание ФКр снижалось до 35%, что вызывало уменьшение общего креатина (ΣКр) до 64% от исходных значений при практически неизменном уровне Кр. Недостаточное восстановление аэробного обмена в ЗР к окончанию реперфузии сопровождалось активацией гликолиза/гликогенолиза. Это приводило к накоплению лактата, содержание которого увеличивалось почти на порядок по сравнению с исходным значением. Введение пептида G29 увеличивало содержание ATP (P = 0.088) и достоверно ADP и AMP ( $P \le 0.01$ ) по сравнению с контролем. В результате ΣАН был увеличен в 1.7 раза. Одновременно отмечено лучшее восстановление ФКр (на 48% по сравнению с контролем), что сопровождалось сохранением более высокого содержания ΣКр и отношения ΦКр/Кр, отражающего фосфорилирование Кр. Эти данные свидетельствуют о более эффективном энергообеспечении ЗР под действием G29, одновременно наблюдалось снижение содержания лактата в ткани сердца до значения, близкого к исходному.

Полученные результаты однозначно указывают на способность пептида G29 уменьшать летальные повреждения кардиомиоцитов при ишемии и реперфузии сердца *in vivo*. Кардиозащитное действие пептида проявляется в ограничении размеров острого инфаркта, уменьшении активности маркеров некроза в кровотоке и в улучшении энергетического состояния инфарцированного миокарда.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы производные *L*-аминокислот (Novabiochem, Швейцария), DIEA, HOBt, TBTU, TIS, DMF, *N*-метилпирролидон, дихлорметан и трифторуксусная кислота (Fluka, Швейцария), ацетонитрил и изопропиловый спирт (Panreac, Испания).

Для TCX пептидных фрагментов использовали пластинки Kieselgel 60 F254 (Merck, ФРГ) и системы растворителей хлороформ-метанол-AcOH (90 : 8 : 2) (система 1), хлороформ-метанол-AcOH (9 : 1 : 0.5) (система 2), пептиды проявляли в УФ-свете и парами Cl<sub>2</sub>-бензидин [30].

ВЭЖХ проводили на хроматографах Gilson (Франция) и Knauer (ФРГ). Аналитическую ВЭЖХ галанина выполняли на колонке Kromasil 100-5 С18 с сорбентом С18, размер пор 100 Å, на хроматографе Gilson (Франция). Элюенты: буфер А – 0.05 М КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, рН 3.0, буфер Б – 70% ацетонитрила в буфере А. элюния гралиентом концентрации буфера Б в буфере А от 20 до 80% за 30 мин. Детекция при 220 нм (условия 1). Для аналитической ВЭЖХ пептидных фрагментов использовали буфер A – 0.1% TFA, буфер Б – 80% ацетонитрила в буфере А, градиент от 10 до 70% буфера Б в А (условия 2). Препаративная ВЭЖХ проводилась на колонке Kromasil C18 ( $30 \times 250$  мм), размер частиц сорбента 10 мкм. Элюенты: буфер А – 0.1% ТFA, буфер Б – 80% ацетонитрила в буфере А. Элюцию проводили градиентом 0.5% в минуту буфера Б в буфере А от 100% буфера А со скоростью 10 мл/мин. Детекция при длине волны 220 нм. Фракции, соответствующие целевому веществу, объединяли, концентрировали в вакууме и лиофилизовали.

<sup>1</sup>Н-ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре WH-500 Bruker 500 МГц ( $\Phi$ РГ) в DMSO- $d_6$ при 300 К, концентрация пептидов составляла 2-3 мг/мл, химические сдвиги (δ, м.д.) измеряли относительно тетраметилсилана, константы спинспинового взаимодействия (Л) – в герцах. Отнесение сигналов к определенным группам протонов аминокислотных остатков проводилось с помощью метода дифференциального двойного резонанса. Масс-спектры регистрировали на массспектрометре Bruker Autoflex speed (Bruker Daltonics Inc.,  $\Phi P \Gamma$ ), оснащенном твердотельным УФ-лазером с  $\lambda$  355 нм и рефлектроном, в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Для регистрации масс-спектров MALDI использовали стальную мишень MTP 384 ground steel. Энергия лазера подбиралась индивидуально для каждого образца, частота облучения 50 Гц, при регистрации масс-спектра суммировались данные, полученные при 10 последовательных облучениях.

### Синтез пептидных фрагментов (общие методики)

Пептидные фрагменты **ФІ** и **ФІІІ** получали на 2-хлортритилхлоридной смоле (Iris Biotech, ФРГ), содержащей 1.2 экв. Cl/г. К 3.0 г (3.6 ммоль) смолы прибавляли раствор 3.2 г (10.8 ммоль) Fmoc-Gly-OH в 30 мл DCM, в полученную суспензию приливали 4.25 мл (15.0 ммоль)

Таблица 1. Влияние внутривенного введения пептида G29 на метаболическое состояние зоны риска сердца крысы в конце реперфузии

	Исходное	Конец реперфузии			
	состояние	контроль	G29, 0.5 мг/кг		
ATP	$21.35\pm1.18$	$4.73 \pm 0.73^{*}$	$6.25 \pm 0.39^{*}$		
ADP	$5.52\pm0.43$	$3.38\pm0.16^*$	$7.62 \pm 0.28 ^{*\#}$		
AMP	$1.36\pm0.25$	$1.24\pm0.18$	$2.25 \pm 0.18 ^{*\#}$		
ΣΑΗ	$28.24 \pm 1.24$	$9.35\pm0.74^*$	$16.12 \pm 0.43 ^{*\#}$		
ФКр	$23.56 \pm 1.78$	$8.18\pm1.38^*$	$12.18 \pm 0.97 ^{*\#}$		
Кр	$46.43\pm4.52$	$37.53 \pm 4.17$	$40.12\pm5.05$		
ΣΚρ	$69.98 \pm 4.27$	$44.91\pm3.34^*$	$52.31 \pm 4.17*$		
ФКр/Кр	$0.51\pm0.04$	$0.21\pm0.02^*$	$0.30 \pm 0.03 * #$		
Лактат	$1.15\pm0.11$	$10.82\pm0.93^*$	$2.14 \pm 0.17$ *#		

Данные представлены как  $M \pm m$  для серий из 8 опытов.  $\Sigma AH =$ = ATP + ADP + AMP.  $\Sigma Kp = \Phi Kp + Kp$ . P < 0.05 от: \* исходного состояния, # от контроля.

DIEA и перемешивали 30 мин при 25°С, полимер отфильтровывали, промывали DCM 2 × 30 мл, DMF 2× 30 мл, DCM 2 × 30 мл. Остаточный хлор отщепляли смесью DCM-MeOH-DIEA (32:6: : 2 v/v), промывали DCM  $2 \times \times 30$  мл и DMF  $2 \times$ × 30 мл. Содержание стартовой аминокислоты составило 0.46 ммоль Fmoc-Gly/г аминоацилполимера. При синтезе фрагментов **ФІ** и **ФІІІ**, исходили из 3 г (1.4 ммоль) Fmoc-Gly-аминоацилполимера. Цикл ТФС включал следующие основные стадии: 1) деблокирование α-аминогрупп 25% 4-Ме Pip/DMF в течение 10 мин, 2) промывка DMF, конденсация 4-кратного избытка Fmoc-AA/ DIC/HOBt в смеси DMF/NMP (1:1) в течение 2 ч, 4) промывка DMF. Защищенные пептиды отщепляли от полимерного носителя смесью (40 мл) АсОН-трифторэтанол-DCM (1:2:7) в течение 40 мин. Полимер отфильтровывали, промывали 2 × 30 мл деблокирующей смеси, фильтрат упаривали, продукт осаждали сухим эфиром и после высушивания кристаллизовали из подходящего растворителя.

Фрагмент (ФІІ) Fmoc-Tyr(Bu')-Leu-Leu-Gly-ОН получали, исходя из 6.74 г (20 ммоль) H-Gly-OBzl · Tos-OH, методом смешанных ангидридов по приведенной ниже методике.

К охлажденному до  $-15^{\circ}$ С раствору 24.0 ммоль карбоксильного компонента в 80 мл DMF прибавляли 2.66 мл (24 ммоль) NMM и 3.12 мл (24 ммоль) изо-бутилхлорформиата, выдерживали 5 мин и приливали охлажденный до  $-15^{\circ}$ С раствор 20 ммоль аминокомпонента и 2.22 мл (20.0 ммоль) NMM в 30 мл DMF. Реакционную смесь выдерживали 20 мин при  $-15^{\circ}$ С и 1 ч при 0°С. Ход реакции контролировали с помощью TCX в системе 1. В реакционную смесь прибавляли раствор КНСО<sub>3</sub> до начала слабого выделения углекислого газа и перемешивали 30 мин. Реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в 200 мл этилацетата и промывали 2% раствором  $H_2SO_4$  (3 × 50 мл), водой (3 × 50 мл), 5% раствором NaHCO<sub>3</sub> (3 × 50 мл) и водой до нейтральной реакции. Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, осушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали. Остаток обрабатывали трифторуксусной кислотой в течение 1 ч, реакционную смесь упаривали, трифторацетат пептида осаждали диэтиловым эфиром, осадок отфильтровывали, промывали на фильтре диэтиловым эфиром, высушивали и вводили в конденсацию с новым карбоксильным компонентом.

К раствору 10.7 г (14.4 ммоль) тетрапептида Z-Туг(Bu')-Leu-Leu-Gly-OBzl в 300 мл этанола прибавляли 1.4 г 5% Pd/C и в эту суспензию при перемешивании пропускали ток водорода в течение 2 ч, затем в реакционную смесь приливали 14 мл 1 М NaOH. По окончании реакции катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали. В полученный пептид H-Tyr(Bu')-Leu-Leu-Gly-OH вводили №-Fmoc-защиту по описанной методике [26]. Фрагмент ФII кристаллизовали из смеси изо-пропиловый спирт—гексан.

Ниже приведены выходы и характеристики фрагментов **ФІ**–**ФІІІ**. Кроме этого образцы полученных фрагментов были полностью деблокированы, после чего их чистоту анализировали с помощью ВЭЖХ. Содержание основного вещества в полученных образцах составило 90–95%.

Fmoc-Ser(Bu')-Asp(OBu')-Lys(Boc)-His(Trt)-Gly-**ОН (ФІ).** Получено 1.3 г (74.0% в расчете на стартовую аминокислоту, присоединенную к полимеру), *R*<sub>f</sub> 0.23 (система 1), 0.62 (система 2). MS, *m/z*  $(I_{\text{отн}}, \%)$ : 1241.756 (100)  $[M + \text{Na}]^+$ , 1257.777 (38)  $[M + K]^+$ , 1263.772 (14)  $[M + 2Na-H]^+$ . Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР: 1.21 (с, 9H, –Ser(<u>Bu</u><sup>*t*</sup>)), 1.32–1.37 (м, 1 H, γ'CH<sub>2</sub>, Lys), 1.37–1.42 (м, 19 H, –Аsp(O<u>Bu<sup>t</sup></u>), –Вос, γCH<sub>2</sub>, Lys), 1.41–1.60 (m, 2 H, δCH<sub>2</sub>, Lys), 1.64–1.74 (м, 2 H, βC<u>H</u><sub>2</sub>, Lys), 2.45 (дд, 1H, *J* 16.5, 7.3, β'C<u>H</u><sub>2</sub>, Asp), 2.69 (дд, 1H, J 16.5, 7.4, β"C<u>H</u><sub>2</sub>, Asp), 2.74– 2.96 (м, 4 H, εC<u>H</u><sub>2</sub>, Lys; βC<u>H</u><sub>2</sub>, His), 3.72 (дд, 2 H, J 6.0, 3.0, βCH<sub>2</sub>, Ser), 3.69 (д, 2 H, J 5.8, αCH<sub>2</sub>, Gly), 4.11–4.21 (M, 1 H, αC<u>H</u>, Lys), 4.24–4.28 (M, 1 H, αCH, Ser), 4.22–4.27 (м, 3 H, O(CH<sub>2</sub>), CH, Fmoc), 4.46–4.51 (м, 1 H, αC<u>H</u>, His), 4.60–4.66 (м, 1 H, αС<u>H</u>, Asp), 6.69–6.75 (м, 1 H, εN<u>H</u>, Lys), 6.92–7.05 (M, 5 H, -C<u>H</u>, Trt), 7.16-7.21 (M, 1 H, αN<u>H</u>, Ser), 7.23-7.47 (м, 19 H, C<u>H</u>, Trt, Fmoc; C(4)<u>H</u>, His), 7.59–7.62 (м, 1 H, C2H, His), 7.82 (д, 1 H, J 9.3, αN<u>H</u>, Lys), 7.98 (д, 1 H, J 9.3, αN<u>H</u>, Gly), 8.1 (д, 1 H, J9.4, αN<u>H</u>, His), 8.23 (τ, 1 H, J5.8, αN<u>H</u>, Asp).

**Fmoc-Tyr(Bu')-Leu-Leu-Gly-OH (ФІІ).** Получено 10.7 г (71.5% в расчете на исходный бензиловый эфир глицина), R<sub>f</sub> 0.19 (система 1), 0.50 (система 2). MS, m/z ( $I_{0TH}$ , %): 765.471 (100) [M + Na]<sup>+</sup>, 781.455 (16)  $[M + K]^+$ , 787.456 (10)  $[M + 2Na-H]^+$ . Спектр <sup>1</sup>Н-ЯМР: 0.86 (дд, 12Н, *J* 9.2, 6.8,  $\delta(CH_3)_2$ , Leu), 1.18 (c, 9H, Bu<sup>t</sup>), 1.46–1.53 (M, 4H, βCH<sub>2</sub>) Leu), 1.59–1.61 (м, 2H, γC<u>H</u>, Leu), 2.71 (т, 1H, J1.0, β'C<u>H</u>, Tyr), 2.93 (τ, 1H, J 1.0, β"C<u>H</u>, Tyr), 3.69–3.74  $(M, 2H, \alpha CH_2, Gly), 4.16-4.21 (M, 3H, O(CH_2), CH,$ Fmoc), 4.25 (дт, 1H, J9.1, 7.5, αCH, Tyr), 4.30–4.37 (м, 2H, αC<u>H</u>, Leu), 6.77–6.90 (м, 2H, C (3,5) H, Туг), 7.12–7.19 (м, 2Н, С (2.6) Н, Туг), 7.23–7.34 (м, 2Н, СН, Fmoc), 7.37–7.42 (м, 2Н, СН, Fmoc), 7.56 (д, 1H, J 3.5, αNH, Туг), 7.59–7.65 (м, 2H, CH, Fmoc), 7.82–7.90 (м, 3H, CH, Fmoc, αNH, Leu), 8.08 (д, 1H, J 7.7, αNH, Leu), <u>8.13 (т, 1H, J 5.8</u>,  $\alpha NH, Gly$ ).

Fmoc-Gly-Trp(Boc)-Thr(Bu<sup>t</sup>)-Leu-Asn(Trt)-Ser(Bu')-Ala-Gly-OH (ФШ). Получено 1.7 г (81.8% в расчете на стартовую аминокислоту, присоединенную к полимеру),  $R_f 0.42$  (система 1), 0.69 (система 2). MS, *m/z* (*I*<sub>отн</sub>, %): 1458.627 (100)  $[(M-Bu') + CH_3OH + H]^+, 1504.030 (27) [M + Na]^+.$ Спектр <sup>1</sup>Н-ЯМР: 0.88 (дд, 6Н, *J* 20.0, 6.7,  $\delta(CH_3)_2$ , Leu), 0.97 (д, 3H, J 5.8, үС<u>Н</u><sub>3</sub>, Thr), 1.06-1.18 (м, 21H, Bu<sup>t</sup>; βCH<sub>3</sub>, Ala), 1.49–1.54 (M, 2H, βCH<sub>2</sub>, Leu), 1.58 (с, 9H, -Вос), 1.60-1.62 (м, 1H, үС<u>H</u>, Leu), 2.49–2.53 (м, 1H, β'C<u>H</u>, Asn), 2.71–2.78 (м, 1H, β"С<u>Н</u>, Asn), 2.91–2.97 (м, 1Н, β'С<u>Н</u>, Тгр), 2.99– 3.12 (м, 1Н, β"С<u>Н</u>, Тгр), 3.29–3.36 (м, 1Н, β'С<u>Н</u>, Ser), 3.38–3.44 (м, 1H, β"C<u>H</u>, Ser), 3.68 (дд, 4H, J 9.0, 6.6, αC<u>H</u><sub>2</sub>, Gly), 3.75–3.93 (м, 1H, β C<u>H</u>, Thr), 3.99–4.14 (M, 3H, αCH, Ala; -CH, Fmoc; αCH, Ser), 4.19 (д, 2H, J 5.4, O(CH<sub>2</sub>), Fmoc), 4.28–4.40 (м, 2H, αC<u>H</u>, Thr; αC<u>H</u>, Leu), 4.60 (дт, 1H, J 9.3, 7.3, αC<u>H</u>, Asn), 4.78 (дд, 1H, J 9.0, 6.6, αC<u>H</u>, Trp), 7.05–7.47 (M, 18H, C5H, C6H, Trp; CH, Trt; αNH, Gly), 7.50–7.64 (M, 7H, C2H, Trp; C<u>H</u>, Fmoc; αN<u>H</u>, Ser), 7.66–7.75 (M, 4H, C<u>H</u>, Fmoc; αN<u>H</u>, Leu; C4H, C7H, Trp); 7.79–8.00 (м, 4H, C<u>H</u>, –Fmoc; αN<u>H</u>, Gly; αNH, Thr), 8.01 (д, 1H, J 9.2, αNH, Ala), 8.13 (д, 1H, J 9.3, αNH, Trp), 8.32 (т, 1H, J 5.8, αNH, Asn).

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-His-Ala-Ile-Asp-Asn-His-Arg-Ser-Phe-Ser-Asp-Lys-His-Gly-Leu-Thr-NH<sub>2</sub> (G29). Синтез галанина крысы проводили с *C*-конца (см. схему 2) исходя из 0.53 г (0.25 ммоль) полимера Ринка с содержанием аминогрупп 0.47 ммоль/г. Цикл ТФС включал следующие стадии: 1) деблокирование  $\alpha$ -аминогрупп 25% 4-Ме Рір/DMF (2 × 5 мл в течение 5 мин); начиная со стадии пептидилполимера РІІІ деблокирование проводили смесью 25% 4-МеРір/0.1 М НОВt в DMF (2 раза по 5 мл в течение 5 мин); 2) промывка DMF, 3) конденсация 0.75 ммоль (3-кратного избытка) Fmoc-AA/ DIC/HOBt в 3 мл смеси DMF/NMP (1 : 1) в течение 2 ч; конденсацию 0.75 ммоль фрагментов

**ФІ–ФІІІ** в присутствии 0.75 ммоль комплекса F проводили в 3-4 мл NMP в течение 4 ч; 4) промывка DMF. Заключительное отщепление от носителя и деблокирование галанина осуществляли действием 10 мл смеси TFA-вода-триизопропилсилан-дитиотреитол-1,3-диметоксибензол (80:5:5:5:5) в течение 1.5 ч. По окончании реакции полимер отфильтровывали, промывали 2 × × 2 мл деблокирующей смеси, фильтрат упаривали, продукт осаждали сухим диэтиловым эфиром, отфильтровывали, промывали на фильтре эфиром и DCM. Неочищенный продукт ТФС лиофилизовали из 2% АсОН для полного отщепления Trp(Boc) [31]. Было получено 0.52 г неочищенного продукта с чистотой 77.1%, затем пептид очищали методом ВЭЖХ, как описано выше, до 98% чистоты. Получено 0.22 г соединения G29 (28% в расчете на стартовую аминокислоту). G29 MS, m/z: 3163.474 ( $M_{\text{pacyer}} = 3164.45$ ).

Для дополнительной оценки содержания аспартимидов в неочищенном продукте ТФС G29 50 мг N<sup> $\alpha$ </sup> – свободного пептидилполимера **PV** обрабатывали 3 мл смеси TFA–TIS–дитиотреитол–1,3-диметоксибензол (85 : 5 : 5 : 5) в течение 1.5 ч. Продукт (16 мг) выделяли, как описано выше. MS, m/z ( $I_{\text{отн}}$ , %): 3165.480 (100) [M + H]<sup>+</sup>, 3147.306 (4.6) [M – H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 3221.481 (8.0) [M + Bu<sup>r</sup>], 2690.148 (5.8).

Изучение пептида G29 на модели региональной ишемии и реперфузии сердца у крыс *in vivo* проведено на самцах крыс Wistar (300—350 г) в соответствии с "Международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с использованием животных", принятым Международным советом медицинских научных обществ в Женеве в 1985 г.

У наркотизированных 20% уретаном (1200 мг/кг веса, внутрибрюшинно) животных в условиях торакотомии осуществляли искусственную вентиляцию легких комнатным воздухом с помощью аппарата KTR-5 (Hugo Sacks Electronik, Германия). Яремную вену катетеризировали для окрашивания сердца 1% раствором Эванса в конце опыта. Сонную артерию катетеризировали для регистрации артериального давления. После присоединения артериального катетера к тензометрическому датчику регистрировали систолическое артериальное давление (САД) и ЧСС на полиграфе Biograph-4 (Санкт-Петербургский госуниверситет аэрокосмического приборостроения). Запись на компьютер выполнена с помощью аналого-цифрового преобразователя USB 6210 (National Instruments, США) и программы в системе Lab-VIEW 7 (National Instruments, США) [10]. После препарирования животного следовал 30-минутный период стабилизации гемодинамических показателей (исходное состояние), затем окклюзия передней нисходящей коронарной артерии (ПНА) в течение 40 мин, продолжительность последующей реперфузии составляла 60 мин. Пептид G29 вводили внутривенно болюсом в дозах 0.25; 0.5; 1.0 или 2.0 мг/кг веса одновременно с началом реперфузии. В контрольной серии опытов – такой же объем физиологического раствора (0.5 мл).

В отдельной серии опытов было изучено влияние растворителя пептида G29 (0.2% раствора DMSO). В конце опыта для идентификации зоны риска (3P) и интактной области миокарда реокклюдировали ПНА и в яремную вену вводили болюсно 2% раствор Эванса (2 мл). Затем вырезали сердце и выделяли левый желудочек (ЛЖ) для последующего определения размеров инфаркта миокарда (ИМ). Замороженный ЛЖ разрезали перпендикулярно длинной оси сердца на 4-5 срезов толщиной около 1.5–2.0 мм, которые затем инкубировали 10 мин в 1% растворе 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида в 0.1 М калий фосфатном буфере (рН 7.4 при 37°С). Полученные образцы сканировали, площади ИМ и ЗР определяли методом компьютерной планиметрии, используя программу Imagecal. После этого срезы взвешивали для определения массы ЛЖ. В каждой группе рассчитывали отношения зона риска/вес левого желудочка (ЗР/ЛЖ) и инфаркт миокарда/зона риска (ИМ/ЗР) в %.

Повреждение мембран кардиомиоцитов оценивали по увеличению активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и МВ-фракции креатинкиназы (МВ-КК) в плазме крови. Около 0.5 мл крови собирали в гепаринизированные пробирки из венозного катетера в исходном состоянии (перед окклюзией ПНА) и после 1 ч реперфузии. Активность ферментов в плазме определяли на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония) при  $\lambda$  340 нм, используя наборы фирмы BioSystems.

В отдельной серии опытов оценивали влияние внутривенного введения оптимальной дозы пептида (0.5 мг/кг) на энергетическое состояние ЗР. По окончании реперфузии ЗР быстро выделяли из ЛЖ и замораживали щипцами Волленбергера, охлажденными в жидком азоте. Замороженную ткань гомогенизировали в холодной 6% НСЮ4 (10 мл/г ткани) в гомогенизаторе Ultra-Turrax T-25 (IKA-Labortechnik, Германия). Белки осаждали центрифугированием (центрифуга Sorvall RT1, Thermo Fisher Scientific, США) при 2800 g в течение 10 мин при 4°С. Супернатанты нейтрализовали 5 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> до pH 7.4. Осадок KClO<sub>4</sub> отделяли центрифугированием в тех же условиях. Безбелковые экстракты хранили при -20°C до определения метаболитов. Сухой вес гомогенизированной ткани определяли после высушивания образцов в течение 1 сут при 110°С. Содержание адениннуклеотидов, фосфокреатина (ФКр), креатина (Кр) и лактата в тканевых экстрактах определяли энзиматическими методами [32], используя спектрофотометр Shimadzu UV-1800 (Япония). Таким же

образом оценивали метаболическое состояние ЗР в конце реперфузии в контроле (в опытах с внутривенным введением физиологического раствора) и в исходном состоянии (до окклюзии ПНА).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Конвергентный подход был успешно применен для получения 29-членного галанина крысы на твердой фазе. Использование очищенных пептидных блоков для наращивания пептидной цепи исключило возможность образования в синтезе трудноотделимых "ложных" пептидов с близкими к целевому пептиду свойствами, благодаря этому пептид G29 был получен с высокими выходом и чистотой. Введение G29 уменьшало размеры инфаркта миокарда на 40% и снижало активность маркеров некроза МВ-креатинкиназы и лактатдегидрогеназы в плазме к концу реперфузии по сравнению с контролем. Пептид G29 (0.5 мг/кг) улучшал метаболическое состояние сердца – увеличивал содержание АТР, общего фонда адениннуклеотидов, фосфокреатина, общего креатина и снижал уровень лактата по сравнению с контролем. Результаты указывают на возможность использования пептида G в качестве препарата для уменьшения реперфузионных повреждений сердца и необходимость изучения механизмов его действия.

#### ФИНАНСОВАЯ ПОДДРЕЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант 18-015-00009).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Seta Y., Kataoka S., Toyono T., Toyoshima K. // Arch. Histol. Cytol. 2006. V. 69(4). P. 273–280.
- Diaz-Cabiale Z., Parrado C., Vela C., Razani H., Covenas R., Fuxe K., Narvaez J.A. // Neuropeptides. 2005. V. 39. P. 185–190.
- Abbott S., Pilowsky P. // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2009. V. 296(4). R1019–1026.

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 46 № 1 2020

- He B., Shi M., Zhang L., Li G., Zhang L., Shao H., Li J., Fang P., Ma Y., Shi Q., Sui Y. // Physiol. Behav. 2011. V. 103(3–4). P. 284–289.
- Fang P., Sun J., Wang X., Zhang Z., Bo P., Shi M. // Life Sciences. 2013. V. 92. P. 628–632.
- 6. *Lang R., Gundlach A. L., Kofler B.* // Pharmacology & Therapeutics. 2007. V. 115. P. 177–207.
- Alston E.N., Parrish D.C., Hasan W., Tharp K., Pahlmeyer L., Habecker B.A. // Neuropeptides. 2011. V. 45(1) P. 33–42.
- Kocic I. // J. Pharm. Pharmacol. 1998. V. 50(12). P. 1361–1364.
- Wang J., Gareri C., Rockman H.A. // Circulation Research. 2018. V. 123(6). P. 716–735.
- Шульженко В.С., Серебрякова Л.И., Студнева И.М., Пелогейкина Ю.А., Веселова О.М., Молокоедов А.С., Овчинников М.В., Палькеева М.Е., Сидорова М.В., Писаренко О.И. // Кардиологический вестник. 2016. Т. 11(3). С 12–21.
- Timotin A., Pisarenko O., Sidorova M., Studneva I., Shulzhenko V., Palkeeva M., Serebryakova L., Molokoedov A., Veselova O., Cinato M., Tronchere H., Boall F., Kunduzova O. // Oncotarget. 2017. V. 8(13). P. 21241– 21252.
- Stathopoulos P., Papas S., Kostidis S., Tsikaris V. // J. Peptide Sci. 2005. V. 11(10). P. 658–664.
- Subirós-Funosas R., El-Faham A., Albericio F. // Tetrahedron. 2011. V. 67(45). P. 8585–8593.
- 14. Mergler M., Dick F., Sax B., Staehelin C., Vorherr T. // J. Pept. Sci. 2003. V. 9. P. 518–526.
- 15. *Behrendt R., Huber S., Martí R., White P. //* J. Pept. Sci. 2015. V. 21. P. 680–687.
- Weber U., André M. // Hoppe-Seyler Z. Phys. Chem. 1975. V. 356(s1). P. 701–714.
- Lloyd-Williams P., Albericio F., Giralt E. // Tetrahedron. 1993. V. 49(48). P. 11065–11133.
- 18. Вольпина О.М., Михалева И.И., Иванов В.Т. // Биорганич. химия. 1982. Т. 8(1). С. 5–49.
- Vasileiou Z., Barlos K., Gatos D. // J. Pept. Sci. 2009. V.15. P. 824–831.
- Barlos K., Gatos D. // Biopolymers (Peptide Science). 1999. V. 51. P. 266–278.
- 21. Goulas S., Gatos D., Barlos K. // J. Pept. Sci. 2006. V. 12. P. 116-123.
- Сидорова М.В., Молокоедов А.С., Овчинников М.В., Беспалова Ж.Д., Бушуев В.Н. // Биоорганич. химия. 1997. Т. 23. № 1. С. 41-50. [Sidorova M.V. Molokoedov A.S., Ovchinnikov M.V., Bespalova Zh.D., Bushuev V.N. // Russ. J. Bioorgan. Chem. V. 23. № 1. P. 46-55.]
- Сидорова М.В., Палькеева М.Е., Азьмуко А А., Овчинников М.В., Молокоедов А.С., Шарф Т.В., Ефремов Е.Е., Голицын С.П. // Биоорганич. химия. 2017. Т. 43(4). С. 339–346. [Sidorova M.V., Palkeeva M.E., Az'muko A.A., Ovchinnikov M.V., Molokoedov A.S., Sharf T.V., Efremov E.E, Golitsyn S.P. // Russ. J. Bioorgan. Chem. 2017. V. 43(4). P. 351–358.]
- Barlos K., Gatos D. // Convergent peptide synthesis // Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach. Ed. by Chan W.C., White P.D. Oxford Univ. Press, 2001. P. 215–228.

- Van Zon A., Beyerman H.C.// Helv. Chim. Acta. 1973. V. 56. P. 1729–1740.
- 26. Гершкович А.А., Кибирев В.К. Химический синтез пептидов. Киев: Наукова думка, 1992.
- Kovacs J., Kisfaludy L., Ceprini M.Q. // J. Am. Chem. Soc. 1967. V. 89(1). P. 184–184.
- 28. Kaiser E., Colescott R.L., Bossinger C.D., Cook P.I. // Anal. Biochem. 1970. V. 34. P. 595–598.
- 29. Michels T., Dölling R., Haberkorn U., Mier W. // Org. Lett. 2012. V. 14(20). P. 5218–5221.
- Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс.К. Справочник биохимика. 1991. М.: Мир. С. 391.
- Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach. Ed. Chan W.C., White P.D. Oxford Univ. Press, 2001. P. 65–67.
- Bergmeyer H.U. Methods of Enzymatic Analysis. New York: Academic Press, 1974. P. 1464–1467, 1772–1776, 1777–17781, 2127–2131.

## Convergent Synthesis of the Rat Galanin and Study of Its Biological Activity

M. V. Sidorova<sup>\*,#</sup>, M. E. Palkeeva<sup>\*</sup>, D. V. Avdeev<sup>\*</sup>, A. S. Molokoedov<sup>\*</sup>, M. V. Ovchinnikov<sup>\*</sup>, A. A. Azmuko<sup>\*</sup>, L. I. Serebryakova<sup>\*</sup>, O. M. Veselova<sup>\*</sup>, I. M. Studneva<sup>\*</sup>, and O. I. Pisarenko<sup>\*</sup>

\*Phone +7(495)4146716; e-mail: peptide-cardio@yandex.ru \*National Medical Research Cardiological Center of Russian Health Ministry, 3-ya Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia

This work is devoted to synthesis of the full-lenth rat galanin and study of its biological activity. Galanin (G29) sequence GWTLNSAGYLLGPHAIDNHRSFSDKHGLT-NH<sub>2</sub> is seems to be difficult for stepwise SPS. Impurities similar in composition and properties that accumulate during stepwise synthesis of long peptides, significantly complicate the selection of the target product. Conserning, solid phase - fragmentary (convergent) method of synthesis was choosen for preparation of peptide G29.  $N^{\alpha}$ -Fmoc, C-Gly-terminated fragments were prepared by solid phase synthesis on 2-chlorotrityl cloride resin or by mix anhydride method in solution and then purified fragments are condensed on polymer in the presence of complex "F". Crude product of synthesis had 77.1% of major substance. Galanin was purified by reversed phase HPLC, the peptide was identical to the commercial sample, it had the correct molecular weight and 98% of purity. We studied cardioprotective properties of G29 in a model of acute myocardial infarction in anesthetized Wistar rats in vivo. Peptide G29 was administered intravenously after a period of regional ischemia in the dose range from 0.5 to 3.0 mg/kg. G29 administration reduced infarct size by 40% and decreased the activity of necrosis markers (CK-MB and LDH) in plasma by the end of reperfusion compared to control. Peptide improved metabolic state of infarcted heart, increased ATP content, total adenine nucleotide pool, phosphocreatine and total creatine, and decreased lactate level compared to control. These results indicate the possibility of using G29 as a drug to reduce myocardial reperfusion injury and the need to study the mechanisms of its action.

Keywords: rat galanin, peptide cardioprotectors, peptides, solid phase synthesis, fragment condensation, ischemia and reperfusion of the heart, energy metabolism

46



УДК 616-092.4:612-07:577.112.083.3

## ПРИМЕНЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ И ТЕХНОЛОГИИ ФАГОВОГО ДИСПЛЕЯ ДЛЯ АНАЛИЗА БЕЛКА YB-1

© 2020 г. А. Г. Ламан<sup>\*, 1</sup>, А. О. Шепеляковская<sup>\*, 1, #</sup>, Ф. А. Бровко<sup>\*</sup>, С. В. Сизова<sup>\*</sup>, М. В. Артемьев<sup>\*\*</sup>, В. А. Олейников<sup>\*</sup>

\*Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 117997, ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая 16/10 \*\*НИИ физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Беларусь, 220030, Минск, ул. Ленинградская 14

Поступила в редакцию 28.07.2019 г. После доработки 19.08.2019 г. Принята к публикации 11.09.2019 г.

Получены и охарактеризованы моноклональные антитела против рекомбинантного белка YB-1. Полученные антитела специфично выявляют белок YB-1 в твердофазном иммуноферментном анализе, вестерн-блотт-анализе и иммуноцитохимии. С применением технологии фагового дисплея найден пептид, взаимодействующий с белком YB-1. На основе моноклональных антител MA<sub>YB-1</sub>-2 и пептида в составе структурного белка бактериофага разработана тест-система для количественного определения белка YB-1 в сыворотке крови. Предел детекции разработанной тест-системы составляет 0.3 нг/мл.

Ключевые слова: моноклональные антитела, фаговый дисплей, YB-1 DOI: 10.31857/S0132342320010030

### **ВВЕДЕНИЕ**

Мультифункциональный белок ҮВ-1 (Ү-бокссвязывающий белок) входит в обширное семейство белков, содержащих эволюционно консервативный домен холодового шока. Впервые белки этого семейства были описаны как ДНК-связывающие белки, взаимодействующие с У-боксмотивом промоторных участков генов главного комплекса гистосовместимости второго класса [1]. С точки зрения функциональности – это ДНК- и РНК-связывающий белок, который проявляет свойства шаперона нуклеиновых кислот, а также взаимодействует с большим количеством других белков. Связываясь с нуклеиновыми кислотами, YB-1 принимает участие практически во всех ДНК- и мРНК-зависимых процессах, включая репликацию и репарацию ДНК, транскрипцию, сплайсинг и трансляцию мРНК, реконструкцию хроматина, также он осуществляет глобальную и

специфическую регуляцию экспрессии генов на разных уровнях [2–5].

УВ-1 человека состоит из 324 а.о., среди которых преобладают Arg (11.7%), Gly (12.0%), Pro (11.0%) и Glu (8.3%). Рассчитанная по аминокислотной последовательности молекулярная масса белка равна ~35.9 кДа, однако при SDS-гель-электрофорезе YB-1 мигрирует как белок с массой около 50 кДа, то есть ведет себя аномально. Характерной особенностью YB-1 является очень высокая изоэлектрическая точка — около 9.5 [6]. Известно, что YB-1 подвергается фосфорилированию [7–10], ограниченному протеолизу 20S-протеасомой, убиквитинилированию [11] и ацетилированию [12].

Белок YB-1 регулирует транскрипцию и трансляцию многих генов, участвующих в клеточном делении и дифференцировке [13]. В процессе регуляции экспрессии генов YB-1 взаимодействует с другими транскрипционными факторами и коактиваторами, а именно, с p53 [14], YY1 [15], CBP/p300 [16], Smad3 и AP-1 [17]. В *N*-концевой области белка YB-1 имеется фрагмент, который обеспечивает белок-белковые взаимодействия с гетерогенными рибонуклеопротеинами (hnRNP) [18] и белком сплайсинга SRp30c [19]. В ответ на клеточные стрессовые сигналы, в том числе на понижение температуры, воздействие ДНК-мо-

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Равный вклад авторов.

Сокращения: FITC — флуоресцеин изотиоцианат (fluorescein isothiocyanate); МА<sub>YB-1</sub> — моноклональные антитела против YB-1; scFv — одноцепочечный вариабельный фрагмент; PBS — фосфатно-солевой буфер; PBS-T — PBS, содержащий 0.1% Tween-20.

<sup>&</sup>lt;sup>#</sup> Автор для связи: (тел.: +7(4967)73-08-53; эл. почта: shepelyakovskaya@rambler.ru).

дифицирующих препаратов, активных форм кислорода и УФ-облучение, YB-1 изменяет свою внутриклеточную локализацию: из цитоплазмы он перемещается в ядро, где участвует в регуляции экспрессии генов. YB-1 опосредует про-митогенную реакцию, положительно воздействуя на развитие эмбриона [20], однако в процессе онкогенеза про-митогенная реакция оказывает отрицательное воздействие на организм, так как способствует разрастанию опухоли и ее метастазированию [21–23].

Экспрессия самого YB-1 активно регулируется в ходе воспалительных заболеваний и инфекций [24]. В экспериментальной мышиной модели уровень экспрессии белка YB-1 в активированных лейкоцитах увеличивался в ответ на введение эндотоксина, а в активированных эозинофилах – после воздействия аллергена. Подобно таким воспалительным медиаторам, как IL-1, тиоредоксин-1 и фактор роста фибробластов, ҮВ-1 реализует неклассической путь секреции [25]. Внеклеточный белок ҮВ-1 обладает хемотаксическими и митогенными свойствами [26]. Показано участие белка ҮВ-1 в отрицательной регуляции ряда генов, вовлеченных в протекание воспалительных реакций, в частности, гена фактора роста эндотелия сосудов [27], гена рецептора тиротропина [28], генов главного комплекса гистосовместимости класса II [29] и хемокина CCL5 [30-32].

Повышение концентрации УВ-1 в цитоплазме препятствует онкогенной трансформации клеток по PI3K/Akt-киназному сигнальному пути, и, вместе с тем, оно может способствовать превращению дифференцированных эпителиальных клеток в мезенхимальные, обладающие повышенной миграционной активностью [33, 34]. Это благоприятствует распространению клеток по организму и метастазированию опухолей. Таким образом, YB-1 может служить в качестве маркера метастазирования раковых опухолей в отдаленные органы. Белок ҮВ-1 снижает чувствительность клеток к химиопрепаратам разных классов, применяемым при лечении раковых заболеваний [35-37]. Механизм этого процесса до конца не ясен. Предполагается, что его действие либо осуществляется через белки, обеспечивающие множественную лекарственную устойчивость, либо он сам принимает непосредственное участие в репарации ДНК. Известно, что вероятность излечения различных видов рака без рецидивов после химиотерапии ниже, если ҮВ-1 был оверэкспрессирован в опухоли и/или он локализован в ядре [38].

Наши последние исследования продемонстрировали исключительную важность белка YB-1 в развитии и регуляции реакций врожденного иммунитета [39—41]. Описанные в литературе свойства YB-1 и полученные нами данные делают его возможным кандидатом на роль белка посредника между эффекторными молекулами и NOD2 – одним из внутриклеточных рецепторов патогенассоциированных молекулярных паттеронов в процессе развития реакций врожденного иммунного ответа.

Такое многообразие выполняемых функций и чрезвычайная эволюционная консервативность белка [42] делает его приоритетным объектом исследований в области молекулярной, физико-химической и медицинской биологии. В связи с этим, актуальной является задача создания высокочувствительной тест-системы для количественного анализа белка YB-1 в различных биологических средах.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

## Моноклональные антитела против YB-1 (MA<sub>YB-1</sub>)

В качестве иммуногена при получении моноклональных антител был использован рекомбинантный белок ҮВ-1, любезно предоставленный Л.П. Овчинниковым (институт белка РАН). Для получения иммунного ответа было сделано четыре инъекции мышам линии Balb/c препаратом белка в различных дозировках. Первую инъекцию проводили совместно с полным адъювантом Фрейнда (FCA), две последующие – с неполным адъювантом Фрейнда (FIA). После третьей инъекции анализировали иммунореактивность сывороток методами непрямого твердофазного иммуноферментного анализа и вестерн-блотт-анализа. По данным этих анализов было выбрано животное с наилучшим иммунным ответом, с титром сыворотки 1:32000.

При проведении твердофазного иммуноферментного анализа нами были оптимизированы условия сорбирования белка YB-1 на иммунопланшет. Известно, что при физиологических значениях концентрации солей белок YB-1 в очищенном состоянии склонен к образованию агрегатов, что отрицательно сказывается на результатах его иммунохимического выявления, а именно – сокращается разница между фоновым и специфическим взаимодействием белка с антителами. Нами было обнаружено, что добавление к буферу для сорбирования антигена NaCl до концентрации 0.5 М существенно улучшает соотношение сигнал-фон при иммунохимическом выявлении белка YB-1.

В результате гибридизации лимфоцитов из иммунизированной мыши с клетками плазмоцитомы Sp2/0 было получено восемь клонов гибридом, продуцирующих антитела к белку YB-1. Все гибридомы были дважды реклонированы методом предельных разведений. Для препаративного выделения моноклональных антител в чистом виде гибридомы выращивали в виде асцитных опухолей мышей. Предварительную оценку содержания иммуноглобулинов в асцитных жидкостях



Рис. 1. Определение константы аффинности МА<sub>УВ-1</sub>-2 по методу Бити.

делали путем определения их титров методом непрямого твердофазного ИФА, который был на уровне 1 : 500000–1 : 1000000.

Полученные гибридомы продуцировали моноклональные антитела, принадлежащие к классу иммуноглобулинов G подклассов G<sub>2a</sub> и G<sub>2b</sub> и имеющие легкие цепи к-типа. Определение констант аффинности проводили по методу Бити [43] и рассчитывали по формуле:  $K_{aff} = 1/(2(2[mAb'] - [mAb]))$ , где [mAb] – концентрация антитела, соответствующая точке перегиба на кривой титрования при концентрации антигена [YB-1]<sub>0</sub>, равной 0.5 мкг/мл, [mAb'] – концентрация антитела, соответствующая точке перегиба на кривой титрования при концентрации антигена [YB-1]<sub>0/2</sub>, равной 0.25 мкг/мл. На рис. 1 представлены графики титрования для  $MA_{YB-1}$ -2.

Для определения специфичности полученных моноклональных антител проводили вестерн-иммуноблотт-анализ суммарных лизатов, получен-

**Таблица 1.** Характеристика моноклональных антител против YB-1 (MA<sub>YB-1</sub>-1–MA<sub>YB-1</sub>-8)

MA <sub>YB-1</sub>	Субкласс антител, L.c.	$K_{\rm aff} \times 10^{-9},  {\rm M}^{-1}$
1	Ig $G_{2a}$ , $\kappa$	2.8
2	$IgG_{2b}, \kappa$	1.83
3	Ig $G_{2a}$ , $\kappa$	4.25
4	Ig $G_{2a}$ , $\kappa$	1.5
5	$IgG_{2b}, \kappa$	0.65
6	Ig $G_{2a}$ , $\kappa$	3.2
7	Ig $G_{2a}$ , $\kappa$	2.1
8	IgG <sub>2a</sub> , κ	0.16

ных из клеточной линии J774. Результат анализа представлен на рис. 2.

Оказалось, что наиболее специфично белок YB-1 узнают  $MA_{YB-1}$ -1, -2 и -4. На автографе видно, что эти антитела выявляют полосу, соответствующую размеру белка YB-1.  $MA_{YB-1}$ -3 и  $MA_{YB-1}$ -6 выявляли полосу, соответствующую белку большей молекулярной массы, чем YB-1, возможно, эпитопы для этих антител имеют сходное строение с участками неких других белков.

## Выявление белка YB-1 в клетках методом флуоресцентной микроскопии

В экспериментах по иммунофлуоресцентному выявлению белка YB-1 использовали клетки моноцитарного ряда линии J774, которые культивировали во флаконах в среде DMEM High glucose с 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Поскольку белок YB-1 локализован внутри клеток, перед окрашиванием необходимо было провести процедуры фиксации и пермеабилизации цитоплазматической мембраны. Выбор моноклональных антител для проведения этой работы основывался на данных об их специфичности, полученных в результате вестерн-иммуноблотт-анализа суммарных лизатов клеток. Моноклональные антитела МА<sub>УВ-1</sub>-2 были конъюгированы с флуоресцеин изотиоцианатом (FITC) и использовались для визуализации белка YB-1 в концентрации 1 мкг/мл. Для визуализации ядер применяли флуоресцентный краситель, имеющий специфическое сродство к ДНК Hoechst 33258. На рис. 3 представлена микрофотография клеток, окрашенных при помощи FITC-MA<sub>YB-1</sub>-2. Из рисунка



**Рис. 2.** Вестерн-иммуноблотт-анализ суммарных лизатов, полученных из клеточной линии J774. Электрофорез в 12% ПААГ в восстанавливающих условиях. Обработка реплик МА<sub>YB-1</sub>-2 и антимышиными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. Выявление иммунных комплексов с помощью набора иммунохемилюминесцентного анализа (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Fisher Scientific).



**Рис. 3.** Внутриклеточная локализация YB-1, выявленная с помощью FITC-MA<sub>YB-1</sub>-2 (*b*). (*a*) –Визуализация ядер с помощью Hoechst 33258.

видно, что белок YB-1 в большом количестве локализован в цитоплазме клеток.

## Получение мини-антител в формате одноцепочечных вариабельных фрагментов scFv против белка YB-1

Для получения scFv-фрагментов против белка YB-1 было проведено два раунда аффинного обогащения комбинаторной библиотеки scFv-фрагментов человека в формате фагового дисплея. В работе была использована библиотека с репертуаром 10<sup>9</sup>, полученная ранее в нашей лаборатории [44]. Было проведено три раунда аффинной селекции, после которых специфичными бактериофагами заражали культуру *E. coli*, клетки рассевали с плотностью 300 колоний на чашку Петри диаметром 85 мм. Колонии были протестированы на предмет продукции scFv-фрагментов, специфичных к YB-1, экспонируемых в составе структурного белка pIII бактериофага M13. Для данного иммуноанализа YB-1 сорбировали в лунки иммунопланшета из раствора с концентрацией 1 мкг/мл, после инкубации с клеточными супернатантами связывание с антигеном выявляли при помощи кроличьих антител против бактериофагов M13, конъюгированных с пероксидазой хрена. Было отобрано 10 клонов, однако последующий анализ последовательностей ДНК этих клонов показал, что все они идентичны. Полученные в результате проведенной работы scFv-фрагменты были использованы для выявления белка YB-1 методом вестерн-иммуноблоттинга (рис. 4).

На рисунке видно, что полученные мини-антитела в формате одноцепочечных вариабельных фрагментов scFv хорошо выявляют рекомбинантный белок YB-1, в препарате клеточного лизата обнаруживаются три близко расположенные по-

50

лосы, которые, по нашим предположениям, могут соответствовать YB-1 в разных вариантах модификации (фосфорилирования), а также полоса, соответствующая размеру полипептида 30 кДа. Поскольку у нас нет полной уверенности, имеет ли данный полипептид отношение к каким-либо формам YB-1, полученные scFv нежелательно использовать для определения внутриклеточной локализации белка.

### Селекция специфичных к YB-1 клонов из библиотеки двенадцатичленных пептидов и создание тестсистемы для определения YB-1 в сыворотке крови

Белок ҮВ-1 способен секретироваться клетками в окружающую среду, поэтому для исследования его роли в конкретных биохимических процессах полезно иметь инструмент для количественного определения этого белка в различных биологических жидкостях (например. в сыворотке крови). Таким инструментом может быть тестсистема в формате сэндвич-иммуноанализа. Мы проверили все полученные нами моноклональные антитела и их комбинации с scFv на способность образовывать сэндвич-пары, однако таких пар не было найдено. Мы решили создать тестсистему в формате сэндвич-иммуноанализа, в которой в качестве антител захвата используются МАув-1-2, наиболее аффинные и специфичные из полученных нами моноклональных антител, а в качестве детектирующего компонента – бактериофаг, содержащий в составе одного из структурных белков пептид, взаимодействующий с неперекрывающимся участком белка YB-1 (рис. 5). Для поиска такого пептида мы использовали комбинаторную библиотеку двенадцатичленных пептидов в формате фагового дисплея.

Моноклональные антитела были иммобилизованы на иммунопланшете, после чего был добавлен ҮВ-1. Образовавшийся комплекс являлся мишенью для аффинной селекции с использованием библиотеки додекапептидов, экспрессированных на поверхности бактериофага M13 (New England Biolab). После 3 раундов аффинной селекции, проведенной в соответствии с рекомендациями производителя библиотеки, было проанализировано 25 клонов бактериофагов методом непрямого иммуноферментного анализа. Четыре из них показали наибольший сигнал по отношению к ҮВ-1 и не проявляли перекрестного взаимодействия с МА<sub>УВ-1</sub>-2. Секвенирование ДНК этих бактериофагов показало, что все они содержали в N-концевой области белка pIII пептид следующей структуры: HLTHPHFSKSKS. Использование этих бактериофагов в варианте сэндвич-иммуноферментного анализа в системе антитела МА<sub>УВ-1</sub>-2-белок ҮВ-1-фаговые частицыанти-М13-конъюгат с пероксидазой хрена и детекции с помощью орто-фенилендиамина позво-



**Рис. 4.** Вестерн-иммуноблотт-анализ очищенного рекомбинантного белка YB-1 (*1*) и суммарного лизата клеток линии Sp2/0 (*2*). Электрофорез в 12% ПААГ в восстанавливающих условиях. Обработка реплик специфичными к YB-1 scFv-фрагментами в составе бактериофагов и кроличьими антителами против бактериофага M13, конъюгированными с пероксидазой хрена. Окрашивание иммунных комплексов раствором, содержащим 3 мг диаминобензидина (DAB) и 10 мкл 30% перекиси водорода в 10 мл 0.1 М Трис-HCl, pH 7.6.



Рис. 5. Принципиальная схема, лежащая в основе обнаружения и количественного анализа белка YB-1. Моноклональные антитела  $M_{YB-1}$ -2 (*a*) сорбировали на поверхность иммунопланшета, содержащийся в растворе белок YB-1 (*б*) связывался с антителами, затем в лунки иммунопланшета вносили отобранные бактериофаги, экспонирующие двенадцатичленный пептид (*в*), специфичный к другому участку белка YB-1. Сформированный комплекс выявляли с помощью антимышиных антител (*г*), конъюгированных с пероксидазой хрена (*д*).



**Рис. 6.** График зависимости оптической плотности от концентрации белка YB-1 в растворе при проведении сэндвич иммуноанализа YB-1. В качестве отрицательного контроля использовали 1% сухое молоко в PBS-T.

ляет выявлять YB-1 в концентрации вплоть до 300 пг/мл (рис. 6). Для построения концентрационной зависимости были использованы растворы YB-1 в 1% сухом молоке и буфер PBS-T.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. В работе использовали среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM), фетальную телячью сыворотку (FCS), глутамин, раствор гипоксантин-аминоптерин-тимидин (HAT) (Gibco-Invitrogen, США); неполный адъювант Фрейнда, пристан, бычий сывороточный альбумин (BSA), DMSO, орто-фенилендиамин, Твин-20, полиакриламид – Amresco (США); нитроцеллюлозную мембрану BA-85 – Schleicher & Schuell (Германия); и Bind Silane – GE-Healthcare (США); конъюгат кроличьих антител с пероксидазой хрена, тип Goat Anti-Mouse-HRP ThermoFisher Scientific; набор для изотипирования иммуноглобулинов (mouse immunoglobulin isotyping ELISA kit) – BD; Biosciences Pharmingen (США); культуральный пластик и планшеты для ИФА (Costar, США). Рентгеновскую пленку CL-XPosure Film (Thermo scientific); набор для иммунохепилюминесцентного анализа (Pierce ECL Western Blotting Substrate - Thermo Fisher Scientific). Остальные химические реактивы получены из коммерческих источников и использованы без предварительной очистки. Растворы готовили на деионизованной воде MilliQ.

Иммунизация. Для иммунизации использовали самок мышей инбредной линии BALB/с в возрасте 7—8 недель. Иммуноген вводили мышам в трех дозировках: 5, 10 и 20 мкг/животное. Каждая дозировка применялась в двух повторностях. Антиген разводили в 100 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS) и смешивали с 100 мкл FCA до получения однородной эмульсии. Полученный препарат вводили подкожно в подушечки задних лап. Вторую и третью инъекции проводили аналогично, с интервалом 10 дней, но использовали FIA. Через 3 дня после второй и третьей иммунизации у животных брали кровь для анализа иммунного ответа. Последнюю инъекцию (бустирование) делали без адъюванта. Через четыре дня животные, у которых был выявлен наибольший титр антител в сыворотке, подвергались эвтаназии, после чего у них извлекали селезенку, выделяли спленоциты, которые далее использовали для гибридизации с клетками плазмоцитомы Sp2/0.

Определение титра сыворотки. Кровь для анализа брали из хвостовой вены. При помощи остро заточенных ножниц у исследуемых мышей отрезали кончик (0.5 см) хвоста, кровь (30-50 мкл) собирали в микропробирку, оставляли при комнатной температуре на 30 мин и отделяли сыворотку центрифугированием в течение 15 мин при 300 g и комнатной температуре. Далее проводили ИФА, используя в качестве исследуемого препарата сыворотку в разведении 1 : 1000 и ее двоичные разведения. Титр антител в сыворотке определяли как величину, обратную ее разведению, при котором в ИФА оптическая плотность в два раза превышала фоновый сигнал, полученный при использовании сыворотки неиммунизированных животных.

Гибридизацию проводили по методу Келлера и Мильштейна [45].

Наработка моноклональных антител в асцитной жидкости мышей. За 7—30 дней перед введением гибридомных клеток мышам линии BALB/c

внутриперитонеально вводили по 0.2 мл пристана (2,6,10,14-тетраметилпентадекана (Sigma)). Клетки гибридом в логарифмической фазе роста суспендировали в 0.5 мл PBS и вводили в перитонеальную полость мыши (из расчета  $6-30 \times 10^5$  кл/мышь). Рост асцита наблюдался через 10-15 дней примерно в 95% случаев. Асцитную жидкость собирали при помощи инъекционной иглы, прокалывая брюшину в паховой области и собирая имеющееся количество асцита в пробирку. Полученную асцитную жидкость центрифугировали в течение 15 мин при 500 *g*. Супернатант переливали во флакон и хранили при температуре  $-20^{\circ}$ С до

дальнейшего использования.

Вылеление моноклональных антител из асшитной жидкости. Асцитную жидкость центрифугировали 30 мин при 12000 g и 4°С. Надосадочную жидкость разбавляли PBS-буфером в 2-3 раза и добавляли равный объем насыщенного раствора сульфата аммония при постоянном перемешивании. Полученную смесь инкубировали в течение 30 мин во льду, затем центрифугировали 15 мин при 8000 g и 4°C. Осадок растворяли в PBS-буфере в объеме, равном исходному объему асцитной жидкости. Цикл высаливания и центрифугирования повторяли трижды. Затем осадок растворяли в небольшом количестве PBS и диализовали в течение ночи против буфера A (0.02 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, рН 8.0). По окончании диализа белковые агрегаты удаляли центрифугированием в течение 40 мин при 12000 g и 4°С. Супернатант фильтровали через мембраны с диаметром пор 0.22 мкм. Далее проводили ионообменную хроматографию на колонке Mono Q HR 10/10, предварительно уравновешенной буфером А, с использованием хроматографической системы FPLC. Подготовленный, как описано выше, препарат белка наносили на колонку со скоростью 1 мл/мин, используя устройство "super loop". Процесс хроматографии вели под контролем проточного спектрофотометра "UV control unit" и регистрировали при помощи самописца. Элюцию белков с колонки осуществляли линейным градиентом концентрации NaCl (0-0.3 M) со скоростью подачи буфера 3 мл/мин и скоростью увеличения концентрации NaCl -10 мМ/мин.

Получение конъюгатов моноклональных антител с флуоресцеин изотиоцианатом (FITC). Для визуализации белка YB-1 в клетках методом флуоресцентной микроскопии полученные моноклональные антитела (MA) конъюгировали с FITC (Isomer I, Sigma, F4274). Путем диализа очищенные антитела с концентрацией 2 мг/мл переводили в 0.1 М натрий-карбонат-бикарбонатный буфер pH 7.6. FITC растворяли в безводном DMSO в концентрации 1 мг/мл. Непосредственно перед внесением FITC pH раствора антител доводили до 9.0 добавлением нескольких микролитров 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Раствор FITC медленно, порциями по 5 мкл добавляли к антителам из расчета 50 мкл на 2 мг белка. После внесения необходимого коли-

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 46 № 1 2020

чества FITC-реагента полученную смесь оставляли на 8 ч в темноте при 4°С. Далее к реакционной смеси добавляли  $NH_4Cl$  до конечной концентрации 50 мМ и инкубировали еще 2 ч при аналогичных условиях. Несвязавшийся FITC-реагент удаляли из раствора путем диализа против PBS. Соотношение FITC-белок в полученных конъюгатах определяли спектрофотометрически путем измерения поглощения при 495 и 280 нм и

вычисляли по формуле: 
$$\frac{[FITC]}{[MA]} = \frac{2.77A_{495}}{A_{280}(0.35A_{495})}.$$

Для всех полученных конъюгатов молярное соотношение FITC/MA лежало в диапазоне от 2 до 4.

Выявление белка ҮВ-1 в клетках методом флуореспентной микроскопии. Клетки J774 культивировали во флаконах в среде DMEM High glucose с 10% FBS. Для проведения экспериментов по окрашиванию клетки осаждали центрифугированием при 200 g в течение 5 мин при комнатной температуре. Клетки фиксировали 4% раствором формальдегида в фосфатно-солевом буфере (PBS) при 4°С в течение 30 мин. Затем клетки трижды отмывали PBS, после чего суспендировали в пермеабилизующем растворе (0.1% Triton X-100) и инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Снова трижды отмывали клетки PBS, затем суспендировали в буфере для окрашивания (0.5% бычий сывороточный альбумин (BSA) в PBS), подсчитывали количество в камере Горяева, после чего распределяли по отдельным пробиркам порциями по  $1-2 \times 10^6$  клеток в объеме по 100 мкл. Добавляли в каждую пробирку антитела, конъюгированные с FITC до конечной концентрации 1 мкг/мл и инкубировали в течение 2 ч при 4°С в темноте. Для визуализации ядер клеток за 15 мин до истечения времени инкубации с антителами к суспензии клеток добавляли раствор Hoechst 33258 до конечной концентрации 0.5 мкг/мл. После этого клетки трижды отмывали буфером для окрашивания, после последней отмывки осадок клеток суспендировали в минимальном объеме буфера для окрашивания (10 мкл) и переносили на предметное стекло, накрывали покровным стеклом и исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа. На рис. 3 представлена микрофотография клеток, окрашенных при помощи FITC-MA<sub>YB-1</sub>-2.

Получение мини-антител в формате одноцепочечных фрагментов (scFv) против YB-1. YB-1 в концентрации 10 мкг/мл сорбировали на поверхность иммунопланшета, затем инкубировали с  $10^{12}$  фаговых частиц в объеме 100 мкл библиотеки scFv человека в течение ночи при 4°C. Неспецифически сорбировавшиеся фаговые частицы отмывали 15 раз PBS-T, оставшимися фагами заражали культуру клеток *E. coli* штамма TG-1. Для второго раунда селекции инфицированные клетки растили до OD<sub>600</sub>, равного 0.6, заражали фагом-помощником M13-K07 и инкубировали в течение ночи при интенсивной аэрации. Клеточ-

ный супернантант, содержаший 10<sup>12</sup> фаговых частиц в 1 мл, использовали для второго раунда. В этом случае на поверхность планшета сорбировали YB-1 в концентрации 1 мкг/мл, а инкубацию с фаговыми частицами проводили в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее специфичными фагами заражали культуру E. coli и клетки рассевали до плотности 300 колоний на чашку Петри диаметром 85 мм. Отдельные колонии использовали для дальнейшего анализа. Клетки E. coli наращивали и заражали согласно описанной выше процедуре. Супернатанты использовали в иммуноферментном анализе. ҮВ-1 наносили в концентрации 1 мкг/мл и после инкубации с клеточными супернатантами проявляли с помощью конъюгата кроличьих анти-М13-антител с пероксидазой хрена. Положительные колонии использовали для дальнейшей работы.

Селекция специфичных к ҮВ-1 клонов из библиотеки двенадцатичленных пептидов. В работе была использована библиотека Ph.D.<sup>™</sup>-12 Phage Display Peptide Library or New England BioLabs, имеющая репертуар 10<sup>9</sup>. Процедуру селекции специфичных клонов бактериофагов проводили в соответствии с инструкцией производителя с некоторыми модификациями. Вкратце, она была следующей: моноклональные антитела клона МАув.1-2 сорбировали на поверхности иммунопланшета из раствора с концентрацией 10 мкг/мл. Затем в лунки вносили раствор, содержащий белок ҮВ-1 с концентрацией 10 мкг/мл и инкубировали в течение ночи при 4°С для формирования иммунного комплекса. В отдельной пробирке смешивали моноклональные антитела клона МА<sub>ув-1</sub>-2 (50 мкг/мл) и 10<sup>12</sup> фаговых частиц библиотеки Ph.D.<sup>™</sup>-12 в объеме 1 мл, инкубировали в течение ночи при 4°С. После этого для отделения сформировавшихся агрегатов раствор центрифугировали 30 мин при 12000 g и 4°С. Супернатант переносили в лунки иммунопланшетов с предформированными иммунными комплексами моноклональных антител с белком ҮВ-1. Дальнейшие процедуры элюции и амплификации аффинных клонов бактериофагов проводили в соответствии с инструкцией к библиотеке. Всего было проведено 3 раунда аффинной селекции, время инкубации библиотеки с иммунным комплексом на третьем раунде уменьшали до 2 ч, а количество фаговых частиц — до 10<sup>10</sup>.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 18-54-00033 Бел\_а и 17-00-00394 КОМФИ.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей в качестве объектов. У животных все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Didier D.K., Schiffenbauer J., Woulfe S.L., Zacheis M., Schwartz B.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 7322–7326.
- Ladomery M., Sommerville J. // Nucleic Acids Res. 1994. V. 22(25). P. 5582–5589.
- Chernov K.G., Mechulam A., Popova N.V., Pastre D., Nadezhdina E.S., Skabkina O.V., Shanina N.A, Vasiliev V.D., Tarrade A., Melki J., Joshi V., Baconnais S., Toma F., Ovchinnikov L.P., Curmi P.A. // BMC Biochemistry. 2008. V. 9(23). P. 1471–2091.
- Evdokimova V., Ovchinnikov L.P., Sorensen P.H.B. // Cell Cycle. 2006. V. 5(11). P. 1143–1147.
- Kim E.R., Selyutina A.A., Buldakov I.A., Evdokimova V., Ovchinnikov L.P., Sorokin A.V. // Cell Cycle. 2013. V. 12(24). P. 3791–803.
- Minich W.B., Maidebura I.P., Ovchinnikov L.P. // Eur. J. Biochem. 1993. V. 212. P. 633–638.
- Rush J., Moritz A., Lee K.A., Guo A., Goss V.L., Spek E.J., Zhang H., Zha X., Polakiewicz R.D., Comb M.J. // Nat. Biotechnol. 2005. V. 23. P. 94–101.
- 8. Olsen J.V., Blagoev B., Gnad F., Macek B., Kumar C., Mortensen P., Mann M. // Cell. 2006. V. 127. P. 635–648.
- Molina H., Horn D.M., Tang N., Mathivanan S., Pandey A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 2199–2204.
- Dephoure N., Zhou C., Villén J., Beausoleil S.A., Bakalarski C.E., Elledge S.J., Gygi S.P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. P. 10762–10767.
- 11. Lutz M., Wempe F, Bahr I., Zopf D., von Melchner H. // FEBS Lett. 2006. V. 580. P. 3921–3930.
- Frye B.C., Halfter S., Djudjaj S., Muehlen berg P., Weber S., Raffetseder U., En-Nia A., Knott H., Baron J.M., Dooley S., Bernhagen J., Mertens P.R. // EMBO Rep. 2009. V. 10. P. 783–789.
- Eliseeva I.A., Kim E.R., Guryanov S.G., Ovchinnikov L.P., Lyabin D.N. // Biochemistry. 2011. V. 76(13). P. 1402– 1433.
- Okamoto T., Izumi H., Imamura T., Takano H., Ise T., Uchiumi T., Kuwano M., Kohno K. // Oncogene. 2000. V. 19. P. 6194–6202.
- Li W.W., Hsiung Y., Wong V., Galvin K., Zhou Y., Shi Y., Lee A.S. // Mol. Cell. Biol. 1997. V. 17. P. 61–68.
- Higashi K., Inagaki Y., Fujimori K., Nakao A., Kaneko H., Nakatsuka I. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 43470– 43479.
- Lasham A., Lindridge E., Rudert F., Onrust R., Watson J. // Gene. 2000. V. 252. P. 1–13.
- Shnyreva M., Schullery D.S., Suzuki H., Higaki Y., Bomsztyk K. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 15498– 15503.
- Raffetseder U., Frye B., Rauen T., Jurchott K., Royer H.D., Jansen P.L., Mertens P.R. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 18241–18248.

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 46 № 1 2020

- Lu Z.H., Books J.T., Ley T.J. // Mol. Cell. Biol. 2005. V. 25 P. 4625–4637.
- Schittek B., Psenner K., Sauer B., Meier F., Iftner T., Garbe C. // Int. J. Cancer. 2007. V. 120. P. 2110–2118.
- Bargou R.C., Jurchott K., Wagener C., Bergmann S., Metzner S., Bommert K., Mapara M.Y., Winzer K.J., Dietel M., Dorken B., Royer H.D. // Nat. Med. 1997. V. 3. P. 447–450.
- Basaki Y., Hosoi F., Oda Y., Fotovati A., Maruyama Y., Oie S., Ono M., Izumi H., Kohno K., Sakai K., Shimoyama T., Nishio K., Kuwano M. // Oncogene. 2007. V. 26. P. 2736–2746.
- Liverman C.S., Kaftan H.A., Cui L., Hersperger S.G., Taboada E., Klein R.M., Berman N.E. // Neurosci. Lett. 2006. V. 399. P. 220–225.
- Frye B.C., Halfter S., Djudjaj S., Muehlenberg P., Weber S., Raffetseder U., En-Nia A., Knott H., Baron J.M., Dooley S., Bernhagen J., Mertens P.R. // EMBO Rep. 2009. V. 10. P. 783–789.
- Hassoun P.M., Mouthon L., Barbera J.A., Eddahibi S., Flores S.C., Grimminger F., Jones P.L., Maitland M.L., Michelakis E.D., Morrell N.W., Newman J.H., Rabinovitch M., Schermuly R., Stenmark K.R., Voelkel N.F., Yuan J.X., Humbert M. // J. Am. Coll. Cardiol. 2009. V. 54. P. S10–S19.
- Coles L.S., Lambrusco L., Burrows J., Hunter J., Diamond P., Bert A.G., Vadas M.A., Goodall G.J. // FEBS Lett. 2005. V. 579. P. 5372–5378.
- 28. Ohmori M., Shimura H., Shimura Y., Kohn L.D. // Mol. Endocrinol. 1996. V. 10. P. 76–89.
- 29. *MacDonald G.H., Itoh-Lindstrom Y., Ting J.P.* // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 3527–3533.
- Cavusoglu E., Eng C., Chopra V., Clark L.T., Pinsky D.J., Marmur J.D. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2007. V. 27. P. 929–935.
- Rothenbacher D., Muller-Scholze S., Herder C., Koenig W., Kolb H. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2006. V. 26. P. 194–199.
- von Hundelshausen P., Weber K.S., Huo Y., Proudfoot A.E., Nelson P.J., Ley K., Weber C. // Circulation. 2001. V. 103. P. 1772–1777.

- Evdokimova V., Ruzanov P., Anglesio M.S., Sorokin A.V., Ovchinnikov L.P., Buckley J., Triche T.J., Sonenberg N., Sorensen P.H.B. // Mol. Cell. Biol. 2006. V. 26. P. 277–292.
- Bader A.G., Vogt P.K. // Mol. Cell. Biol. 2005. V. 25. P. 2095–2106.
- Ohga T., Koike K., Ono M., Makino Y., Itagaki Y., Tanimoto M., Kuwano M., Kohno K. // Cancer Res. 1996. V. 56. P. 4224–4228.
- Shibahara K., Uchiumi T., Fukuda T., Kura S., Tominaga Y., Maehara Y., Kohno K., Nakabeppu Y., Tsuzuki T., Kuwano M. // Cancer Sci. 2004. V. 95. P. 348–353.
- Goldsmith M.E., Madden M.J., Morrow C.S., Cowan K.H. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 5856–5860.
- Shibahara K., Sugio K., Osaki T., Uchiumi T., Maehara Y., Kohno K., Yasumoto K., Sugimachi K., Kuwano M. // Clin. Cancer Res. 2001. V. 7. P. 3151–3155.
- Laman A.G., Lathe R., Shepelyakovskaya A.O., Gartseva A., Brovko F.A., Guryanova S., Alekseeva L., Meshcheryakova E.A., Ivanov V.T. // Innate Immun. 2016. V. 22(8). P. 666–673.
- Laman A.G., Lathe R., Savinov G.V., Shepelyakovskaya A.O., Boziev Kh.M., Baidakova L.K., Chulin A.N., Brovko F.A., Svirshchevskaya E.V., Kotelevtsev Y., Eliseeva I.A., Guryanov S.G., Lyabin D.N., Ovchinnikov L.P., Ivanov V.T. // FEBS Lett. 2015. V. 589(15). P. 1819–1824.
- Savinov G.V., Shepelyakovskaya A.O., Boziev Kh.M., Brovko F.A., Laman A.G. // Biochemistry. 2014. V. 79(2). P. 131–138.
- 42. Wolffe A.P., Tafuri S., Ranjan M., Familari M. // New Biol. 1992. V. 4(4). P. 290–298.
- Beatty J.D., Beatty B.G., Vlahos W.G. // J. Immunol. Methods. 1987. V. 100. P. 173–179.
- 44. Ulitin A.B., Kapralova M.V., Laman A.G., Shepelyakovskaya A.O., Bulgakova E.V., Fursova K.K., Abbasova S.G., Volkov S.K., Brovko F.A., Nesmeyanov V.A. // Dokl. Biochem. Biophys. 2005. P. 405:437–440.
- 45. Kohler G., Milstein C. // Nature. 1975. V. 256. P. 495–499.

## Application of Monoclonal Antibodies and Phage Display Technology for Analysis of Protein YB-1

A. G. Laman<sup>\*</sup>, A. O. Shepelyakovskaya<sup>\*, #</sup>, F. A. Brovko<sup>\*</sup>, S. V. Sizova<sup>\*</sup>, M. V. Artemyev<sup>\*\*</sup>, and V. A. Oleinikov<sup>\*</sup>

<sup>#</sup>*Phone:* +7(4967)73-08-53; e-mail: shepelyakovskaya@rambler.ru

\*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, V-437, ul. Mikluho-Maklaya 16/10, GSP, Moscow, 117997 Russia

\*\*Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University, ul. Leningradskaya 14, Minsk, 220006 Belarus

Monoclonal antibodies against the recombinant protein YB-1 were obtained and characterized. The obtained antibodies are capable of specific detection of YB-1 protein by the method of Western blot analysis, as well as using immunocytochemical methods. A peptide interacting with the YB-1 protein was found using phage display technology. On the basis of monoclonal antibodies YB-1-2 and a peptide as part of the bacteriophage structural protein, a test system has been developed for the quantitative determination of YB-1 protein in blood serum. The detection limit of the developed test system was 0.3 ng/mL.

Keywords: monoclonal antibodies, phage display, YB-1

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 46 № 1 2020



УДК 577.2.08

# УСТРАНЕНИЕ МУЛЬТИМЕРИЗАЦИИ ДНК, ВОЗНИКАЮЩЕЙ ПРИ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ В ПРИСУТСТВИИ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ BST EXO-

© 2020 г. А. Р. Сахабутдинова<sup>\*, #</sup>, Л. Р. Мирсаева<sup>\*</sup>, И. П. Оскорбин<sup>\*\*</sup>, М. Л. Филипенко<sup>\*\*</sup>, Р. Р. Гарафутдинов<sup>\*</sup>

\*Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Россия, 450054, Уфа, просп. Октября, 71 \*\*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Россия, 630090, Новосибирск, Новосибирская обл., пр. Академика Лаврентьева, 8 Поступила в редакцию 02.08.2019 г. После доработки 06.09.2019 г. Принята к публикации 10.09.2019 г.

В последние годы все большее распространение для обнаружения специфических нуклеотидных последовательностей приобретают методы изотермической амплификации нуклеиновых кислот, которые требуют использования полимераз с цепь-вытесняющей активностью. Среди подобных полимераз наиболее популярной является Bst exo-, однако она склонна к неспецифической амплификации — мультимеризации, приводящей к образованию продуктов, состоящих из тандемных нуклеотидных последовательностей. В данной работе оценена эффективность протекания мультимеризации в зависимости от условий проведения амплификации и предложены способы ее устранения. Обнаружено, что максимальная эффективность мультимеризации характерна для полимеразы Bst 2.0 в буфере Isothermal, а Bst-подобная полимераза Gss обеспечивает образование продуктов мультимеризации только в буфере Isothermal и на поздних этапах реакции. Оптимальным способом устранения мультимеризации является использование: полимеразы Gss с буфером Thermopol, или полимеразы Bst 3.0 с буфером Isothermal II, или полимеразы Bst 3.0 с буфером Thermopol, или полимеразы Bst 3.0 с буфером Isothermal и ионами  $Mn^{2+}$  в качестве кофактора. В перечисленных случаях возможна специфическая амплификация исследуемой ДНК-мишени и получение достоверного результата амплификации.

Ключевые слова: ДНК-полимераза Bst exo-, амплификация "катящимся кольцом" (АКК), мультимеризация, ДНК-полимераза Gss, специфичность

DOI: 10.31857/S0132342320010091

## введение

В последнее время для обнаружения специфических нуклеотидных последовательностей все большее применение находят изотермические методы, такие как амплификация "катящимся кольцом" (AKK; rolling circle amplification, RCA) [1–3], "петлевая изотермическая амплификация" (loop mediated amplification, LAMP) [4, 5], метод NASBA (nucleic acid sequence based amplification) [6], амплификация смещением цепи (strand displacement amplification, SDA) [7] и другие [8–12]. Их несомненным преимуществом является возможность проведения реакций в порта-

тивных термостатирующих устройствах или в формате биосенсоров, то есть без использования дорогостоящих термоциклеров [13–16]. Реакции изотермической амплификации характеризуются в отдельных случаях более стабильной работой ферментов по сравнению с реакциями амплификации, протекающими при термоциклировании (например, полимеразная и лигазная цепные реакции) [2, 8, 9].

Проведение амплификации в изотермическом режиме требует использования полимераз с цепьвытесняющей активностью (как правило, не имеют 5' $\rightarrow$ 3'-экзонуклеазной активности), способных обеспечить эффективное расхождение цепей нуклеиновых кислот при постоянной температуре. К ним относятся, например, коммерческие ДНК-полимеразы Bst exo-, Bsu exo-, фрагмент Кленова, phi29, Vent exo- и другие. Полимераза Bst exo-, представляющая собой большой фраг-

Сокращения: АКК – амплификация "катящимся кольцом"; FAM – 5'-карбоксифлуоресцеин; DMTr – диметокситритильная группа; MC – кольцевые ДНК-матрицы; ML – линейные одноцепочечные ДНК-матрицы.

<sup>&</sup>lt;sup>#</sup> Автор для связи: (тел.: +7 (347) 235-60-88; факс: +7 (347) 235-60-88; эл. почта: sakhabutdinova.a.r@gmail.com).

мент ДНК-полимеразы I из Geobacillus stearothermophilus, используется наиболее часто ввиду сильной цепь-вытесняющей активности, относительной термостабильности (оптимум при 65°С) и высокой процессивности. Доступны несколько форм полимеразы Bst exo-: Bst LF (собственно Bst exo-), Bst 2.0, Bst 2.0 WarmStart, Bst 3.0. Описано также несколько Bst-подобных полимераз [17– 19], в частности, Gss-полимераза и ее химерные формы, обладающие высокими процессивностью, точностью и стойкостью к ингибиторам

[20, 21].

Однако полимераза Bst ехо- в изотермических условиях часто дает неспецифические продукты. которые могут нарабатываться даже в отсутствие матрицы и праймеров, т.е. путем ab initio-синтеза [22]. Было показано, что при амплификации короткой линейной матрицы и двух праймеров к ней происходит мультимеризация, заключающаяся в образовании набора ДНК-продуктов кратной длины — мультимеров, представляющих собой тандемно расположенные повторы нуклеотидной последовательности матрицы [23]. Их невозможно дифференцировать от продуктов амплификации "катящимся кольцом", результатом которой также является набор ДНК кратной длины, называемых конкатемерами. Мультимеры и конкатемеры проявляются на электрофореграмме в виде лестницы полос, что затрудняет или делает невозможным интерпретацию результатов АКК, которая благодаря высокой чувствительности и универсальности стала на сегодняшний день мощным инструментом в биомедицинских и бионанотехнологических исследованиях [2, 3, 16, 24].

Недавно была предложена гипотеза, объясняющая мультимеризацию ДНК под действием полимеразы Bst exo- [25], согласно которой мультимеризация запускается за счет гибридизации одного из свободных З'-концов двуцепочечного ампликона на комплементарной цепи с противоположной стороны дуплекса и последующей элонгации. Это приводит к появлению дополнительных сайтов отжига для праймеров, и далее амплификация удлиненных матриц обеспечивает экспоненциальное накопление мультимерных продуктов. Авторы не указывают причин, по которым происходит образование подобного инициаторного компекса, поэтому детальный механизм мультимеризации до сих пор не ясен. Очевидно, что для повышения специфичности изотермической амплификации с полимеразой Bst exo- необходимо выявление условий, которые способствовали бы устранению мультимеризации, то есть подавляли бы образование неспецифических продуктов. Целью данной работы стал поиск факторов, устраняющих мультимеризацию ДНК под действием полимеразы Bst exo- или снижающих ее эффективность.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку точный механизм мультимеризации ДНК под действием полимеразы Bst exoостается дискуссионным и требует дальнейшего изучения, важным является поиск условий, при которых мультимеризация была бы минимизирована. Без решения данной проблемы достоверность результатов, получаемых в реакции АКК, будет оставаться сомнительной. Ранее мы обнаружили, что краситель SYBR Green I, используемый для амплификации в режиме реального времени, ингибирующее действие которого в отношении ДНК-полимераз достаточно хорошо изучено [26], в определенном концентрационном диапазоне способен предотвратить образование мультимерных продуктов, практически не влияя при этом на амплификацию кольцевых матриц [27]. Однако использование ингибирующей концентрации указанного красителя в качестве единственного способа предотвращения мультимеризации может оказаться малоэффективным.

В настоящей работе на модельной молекулярной системе, состоящей из линейных одноцепочечных ДНК-матриц (ML) длиной 50 нт и праймеров F и R (табл. 1) к ним, было изучено влияние ряда условий на эффективность мультимеризации и осуществлен поиск способов ее устранения. В качестве положительного контроля протекания амплификации (специфическая амплификация) выступали образцы, содержащие кольцевые матрицы (MC), которые получали циклизацией (внутримолекулярным лигированием) ML на поддерживающих пробах S (табл. 1, рис. 1). В случае ML праймер R отжигается на 3'-конце матрицы и далее удлиняется полимеразой, давая короткий двуцепочечный продукт, при расхождении цепей которого возможен отжиг праймера F на синтезированной цепи. Для системы "линейная матрица-праймеры" в присутствии полимеразы Bst ехо- происходит мультимеризация - неспецифическая амплификация ДНК, приводящая к образованию мультимеров (схема представлена ниже на рис. 3). В случае МС также происходит отжиг праймера R на части кольцевой ДНК, и в ходе его удлинения образуется длинный одноцепочечный продукт с многократно повторяющейся последовательностью, имеющей множество сайтов для отжига праймера F. В результате протекает АКК, приводящая к образованию конкатемеров. Мультимеры и конкатемеры проявляются на электрофореграмме в виде практически идентичных лестниц полос.

Амплификацию проводили в реальном времени при неингибирующей концентрации SYBR Green I ( $0.1^{\times}$ ) с использованием ступенчатого температурного протокола. Поскольку праймеры, использованные в работе, имеют расчетную температуру отжига около  $60^{\circ}$ С, именно эта тем-



**Рис. 1.** Упрощенная схема получения кольцевых ДНК и изотермической амплификации линейных (ML) и кольцевых (MC) матриц. F/R – праймеры, S – поддерживающая проба, nL – размеры продуктов амплификации.

пература задавалась в качестве рабочей. Дополнительно задавали температуру начальной денатурации (70°С) для разрушения возможных димеров праймеров. Более высокую температуру не задавали, поскольку Bst-полимераза инактивируется при 80°С в течение 10 мин. Во всех опытах параллельно ставили образцы, содержащие линейные или кольцевые матрицы.

В экспериментах с полимеразами Bst exo- мы заметили, что при варьировании ряда параметров мультимеризация протекает с разной эффектив-

ностью. По-видимому, непосредственный старт мультимеризации является случайным и очень редким событием, вероятность возникновения которого зависит от условий проведения реакции. Интересным оказалось то, что максимальная эффективность мультимеризации наблюдалась для свежих фасовок полимеразы, а затем по мере работы происходило ослабление нежелательной активности фермента при сохранении специфической активности. Учитывая данное обстоятельство, все эксперименты проводились с

Название	Последовательность, 5'→3'	Длина, нт
ML1	ACTGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTGTCGTCGTACAGCCTACATTGTCAGT	50
F1	ACTGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTG	25
R1	ACTGACAATGTAGGCTGTACGACGA	25
ML1B	DMTr-ACTGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTGTCGTCGTACAGCCTACATTGTCAGT-FAM	50
F1B	DMTr-ACTGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTG	25
R1B	DMTr-ACTGACAATGTAGGCTGTACGACGA	25
ML2	CCCGTCCGTCCTGTAGTGCTCAGTGTCGTCGTACAGCCTACACTGCCCGC	50
F2	CCCGTCCGTCCTGTAGTGCTCAGTG	25
R2	GCGGGCAGTGTAGGCTGTACGACGA	25
ML3	ACTTTCAGTCCTGTAGTGCTCAGGGCCCTCGTACAGCCTACATTGTTAGT	50
F3	ACTTTCAGTCCTGTAGTGCTCAGGG	25
R3	ACTAACAATGTAGGCTGTACGAGGG	25
<b>S</b> 1	GGACTGACAGTACTGACAATGT	22
S2	ACGGACGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	18
S3	CAGGACTGAAAGTACTAACAATGTAG	26

Таблица1. Олигонуклеотиды, использованные в работе

		Полимераза					
Буфер*	Матрица	Bst LF	Bst 2.0/ Bst 2.0 WarmStart	Bst 3.0	Gss		
Thermopol	ML1	83.7 ± 17.3	66.7 ± 11.7	_	_		
	MC1	$26.8\pm1.2$	$29.7\pm0.9$	$55.0\pm2.4$	$30.4\pm0.8$		
Isothermal	ML1	$51.7 \pm 12.5$	$45.5\pm7.1$	$56.7 \pm 13.5$	$110.8\pm8.4$		
	MC1	$16.7 \pm 1.2$	$15.5 \pm 1.0$	$33.3\pm1.7$	$25.1\pm1.2$		
Isothermal II	ML1	_	$69.2\pm14.2$	$74.5\pm16.4$	_		
	MC1	$31.7\pm2.4$	$27.0\pm0.9$	$24.2\pm1.2$	$31.7 \pm 1.1$		

Таблица 2. Среднее значение порогового времени *Tt* (мин) при изотермической амплификации линейной (ML1) и кольцевой (MC1) матриц в системах "полимераза-буфер"

\* Состав буферов: 20 мМ Tris-HCl (pH 8.8), 10 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 мМ MgSO<sub>4</sub>, 0.1% Tween 20 с добавлением 10 мМ KCl (Thermopol); 50 мМ KCl (Isothermal); 150 мМ KCl (Isothermal II).

препаратами полимераз, предварительно обработанными дитиотреитолом (DTT), который часто используется как компонент буферных растворов, повышающий/сохраняющий активность ферментов. Для этого непосредственно перед постановкой амплификационных экспериментов препарат полимеразы смешивался с равным объемом 20 мМ водного раствора DTT, и смесь выдерживалась 1 ч при 4°C.

Для выявления условий, обеспечивающих максимальную эффективность мультимеризации, мы сначала на простой матрице ML1 и праймерах F1 и R1 протестировали активность несколько полимераз: Bst LF, Bst 2.0, Bst 2.0 WarmStart и Bst 3.0, a также полимеразу Gss. Применение полимеразы Bst 2.0 WarmStart, активирующейся при температуре выше 45°C, рекомендуется производителем для снижения вероятности образования побочных продуктов. Gss-полимераза, описанная нами ранее [20, 21], представляет собой Bst-подобную ДНК-полимеразу с повышенной процессивностью и стойкостью к ингибиторам. Аналогично полимеразе Bst exo-, она обладают цепь-вытесняющей активностью с оптимумом при 65°С. Амплификацию проводили в буферах Thermopol (рекомендован для Bst LF), Isothermal (для Bst 2.0 и Bst 2.0 WS) и Isothermal II (для Bst 3.0) и находили значения порогового времени Tt (time-to-threshold), соответствующего началу фазы экспоненциального роста кривых амплификации (табл. 2).

Буферы Thermopol, Isothermal и Isothermal II имеют практически идентичный состав за исключением концентрации KCl, которая резко возрастает от 10 мМ в Thermopol до 150 мМ Isothermal II. Несмотря на это, все четыре полимеразы Bst ехоприводили к накоплению мультимерных продуктов за исключением двух вариантов сочетания полимераз и буферов — Bst LF в буфере Isothermal II и Bst 3.0 в буфере Thermopol. Максимальная скорость накопления продуктов амплификации в большинстве случаев наблюдалась при проведении реакций в буфере Isothermal. который за счет KCl (50 мМ) создает, очевидно, наиболее оптимальные условия для проявления полимеразой Bst exo- своей полимеразной активности. Это, в свою очередь, обусловливает повышенную эффективность как специфической, так и неспецифической амплификации. Наибольшую склонность к мультимеризации показала полимераза Bst 2.0 в буфере Isothermal, а наименьшую – полимераза Gss, которая привела к позднему накоплению мультимерных продуктов исключительно в буфере Isothermal. Таким образом, избежать мультимеризации можно при использовании полимеразы Gss, или Bst LF совместно с буфером Isothermal II, или Bst 3.0 совместно с буфером Thermopol. В этих случаях возможна специфическая амплификация исследуемой ДНК-мишени и, соответственно, получение достоверного результата при проведении ДНК-диагностических процедур.

Следует отметить, что образцы, содержащие линейную матрицу, всегда имели значительный разброс в величине *Tt* (рис. 2*a*, кривые 4–6) в отличие от образцов с кольцевой матрицей (рис. 2*a*, кривые 1–3), что связано, очевидно, со случайным характером непосредственного старта мультимеризации. В отдельных случаях, например, при значительном различии в величинах *Tt* ( $\Delta Tt = Tt_{лин} - Tt_{кольц}$ ) для опытных образцов и образцов образцов контроля (в нашем случае содержащих линейную матрицу), можно пренебречь протеканием неспецифической амплификации.

Однако гель-электрофоретический анализ все равно не позволяет дискриминировать продукты специфической и неспецифической амплификации, поскольку для обеих матриц наблюдается образование набора продуктов кратной длины (рис. 26). Единственным признаком, неявно указывающим на мультимерный характер продуктов амплификации, является несоответствие длины



**Рис. 2.** Результаты изотермической амплификации линейной (ML1) и кольцевой (MC1) ДНК-матриц в присутствии полимеразы Bst LF. (*a*) Профили амплификации в буфере Thermopol для матрицы MC1 (кривые 1-3) и ML1 (4-6), 7- условная кривая амплификации матрицы ML1 с усредненным значением Tt; ( $\delta$ ) электрофореграмма образцов после амплификации в разных буферах (маркер 50 bp DNA ladder, New England Biolabs).

мультимеров ожидаемым и варьирование длины для разных образцов.

Согласно предположению Ванга и сотр. [25], мультимеризация ДНК происходит за счет отжига на противоположной стороне дуплекса и последующей элонгации свободных 3'-концов двуцепочечного ампликона, что приводит к появлению дополнительных сайтов отжига для праймера и к экспоненциальному накоплению мультимерных продуктов. Однако авторы использовали в своем исследовании наряду с олигонуклеотидной матрицей только один праймер и при анализе результатов мультимеризации методом гельэлектрофореза наблюдали шмер. В нашей работе использовались два праймера, поэтому на гелях визуализировались дискретные продукты амплификации. Поскольку максимальная эффективность мультимеризации наблюдалась при использовании полимеразы Bst 2.0 и буфера Isothermal, все дальнейшие эксперименты были проведены в данной системе.

Гипотетическая схема мультимеризации для системы "линейная матрица-праймеры" представлена на рис. 3. На первом этапе происходит отжиг и удлинение праймера R, приводящее к образованию простого (мономерного) двуцепочечного продукта длиной 1L. Затем, согласно работе [25], свободный З'-конец одной из цепей дуплекса по какой-то причине отжигается на комплементарной цепи с противоположной стороны и удлиняется (этапы 2 и 3). Удлинение одной из цепей обеспечивает увеличение количества мест отжига праймера F (этап 4a), и после многократного повтора событий отжига и элонгации праймеров происходит накопление мультимерных продуктов длиной *n*L (этапы 5, ..., *i*).

Ключевым в представленной схеме является этап 2, когда генерируется инициаторный комплекс и запускается процесс мультимеризации. Если гипотеза, выдвинутая Вангом [25], верна, то образование инициаторного комплекса можно затруднить с помощью нескольких приемов. Одним из них является использование праймеров и матрицы, несущих объемные группы по 3'- и 5'концам, которые потенциально могут стабилизировать концы дуплекса, препятствуя тем самым "дыханию" цепей, и вызывать стерические затруднения в работе полимеразы, как было показано в работе [28].

Мы синтезировали дополнительно матрицу ML1В и праймеры F1B и R1B, в которых по 5'концам располагалась диметокситритильная группа (DMTr), а по 3'-концу ML1B – флуоресцентный краситель FAM (табл. 1). Обе группы имеют относительно большой размер, устойчивы к отщеплению в условиях ферментативных преврашений, а синтез олигонуклеотидов с такими группами является рутинным. Амплификацию праймерами F1B и R1B проводили как для матрицы ML1B, так и для ML1, а также матрицы ML1B праймерами F1 и R1 в качестве сравнения (системы ML1B/F1B/R1B, ML1/F1B/R1B и ML1B/F1/R1). Оказалось, что введение объемных групп в праймеры действительно несколько затрудняет мультимеризацию, но не предотвращает ее (табл. 3).

Еще одним приемом, затрудняющим протекание мультимеризации, может быть использование GC-богатых по 5'-концам праймеров. Такие праймеры, например с некомплементарными матрице 5'-концами, т.е. содержащими неспецифические нуклеотидные последовательности, могут быть легко сконструированы и использованы в амплификации любых ДНК-мишеней.



**Рис. 3.** Схема (этапы (1)–(6)) протекания мультимеризации при использовании олигонуклеотидных матриц и праймеров с объемными группами по концам (цепи черного цвета соответствуют участку праймера F, серого цвета – праймера R).

В этом случае за счет большей температуры денатурации GC-богатых участков эффективность "дыхания" концов двуцепочечного ампликона будет снижена, что снизит и вероятность образования инициаторного комплекса. Для проверки этого предположения нами были синтезированы матрица ML2 и пара праймеров F2/R2 к ней (табл. 1). Помимо набора ML2/F2/R2, была синтезирована матрица ML3 и пара праймеров F3/R3 с тремя нуклеотидами dG по их 3'-концам. Мы предположили, что участок из шести нуклеотидов dG и dC в центре мономерного двуцепочечного ампликона также будет способствовать стабильности дуплекса и снижать вероятность образования инициаторного комплекса. Как и в предыдущем случае, амплификация матриц ML2 и ML3 показала некоторое снижение эффективности мультимеризации (табл. 3, системы ML2/F2/R2 и ML3/F3/R3), но не полное ее устранение.

**Таблица 3.** Среднее значение порогового времени *Tt* (мин) при изотермической амплификации линейных и кольцевых матриц праймерами с объемными группами\*

Матрица	Молекулярная система*							
	ML1B/F1B/R1B	ML1/F1B/R1B	ML1B/F1/R1	ML2/F2/R2	ML3/F3/R3			
ML1	74.3 ± 19.4	$51.7 \pm 13.8$	$47.8\pm9.4$	$67.2\pm16.5$	59.7 ± 9.2			
MC1	—	$16.8\pm1.4$	—	$18.1\pm0.8$	$16.4 \pm 1.1$			

\* Компоненты систем см. табл. 1.

Fyden	Kodayton	Bst LF		Bst 2.0/Bst 2.0	) WarmStart	Bst 3.0	
Буфер	κοφακτορ	ML1	MC1	ML1	MC1	ML1	MC1
Thermopol-C	Mg <sup>2+</sup>	$81.3\pm15.4$	$28.3\pm1.3$	$68.5\pm10.9$	$26.7\pm1.0$	_	$52.8\pm1.7$
	$Mn^{2+}$	—	—	—	—	—	$100.0\pm4.1$
Isothermal-C	$Mg^{2+}$	$53.6 \pm 11.7$	$14.9\pm1.3$	$44.6\pm12.2$	$17.2\pm2.3$	$55.3 \pm 12.7$	$29.0\pm3.1$
	$Mn^{2+}$	—	$100.0\pm1.5$	—	$93.3\pm2.5$	—	$66.7\pm2.0$
Isothermal II-C	$Mg^{2+}$	_	$33.4\pm0.8$	$59.9 \pm 11.5$	$25.0\pm1.8$	$70.7\pm19.1$	$23.4\pm1.3$
	Mn <sup>2+</sup>	—	—	_	$86.7\pm3.7$	—	$83.3\pm2.4$

**Таблица 4.** Среднее значение порогового времени *Tt* (мин) при изотермической амплификации линейной и кольцевой матриц в системах "полимераза—буфер—кофактор"

Мы также предположили, что устранение мультимеризации возможно путем изменения активности полимеразы, например при замене кофактора. Известно, что в качестве таковых у ДНК полимераз выступают преимущественно ионы Mg<sup>2+</sup>. Однако неоднократно сообщалось о способности полимераз использовать другие катионы, например Mn<sup>2+</sup>, при этом в отдельных случаях происхолит изменение типов ферментативной активности [29-31]. Для проверки данного предположения нами были приготовлены буферные растворы Thermopol-C, Isothermal-C и Isothermal II-C, полностью соответствующие составу поставляемых вместе с использованными в работе полимеразами, но не содержащие солей магния. В качестве нетипичных кофакторов использовали Mn<sup>2+</sup>,  $Cd^{2+}$  и  $Co^{2+}$  в концентрации 2.5 мМ, для которых ранее была показана возможность активации полноразмерной Bst-полимеразы [32, 33]. Найденные после амплификации значения *Tt* приведены в табл. 4.

Согласно полученным результатам, среди трех нетипичных катионов в качестве кофактора полимеразы Bst exo<sup>-</sup> может выступать только  $Mn^{2+}$ . При этом мультимеризация в присутствии ионов  $Mn^{2+}$  не протекает ни в одном из вариантов сочетания буферов и полимераз, а AKK протекает в большинстве случаев, хотя и со значительно меньшей эффективностью, чем при использовании  $Mg^{2+}$ . Специфическая амплификация с  $Mn^{2+}$  для всех четырех полимераз Bst exo<sup>-</sup> наблюдалась в буфере Isothermal-C.

Таким образом, в работе показано, что в изотермических условиях коммерческие полимеразы Bst exo- обеспечивают протекание неспецифической амплификации — мультимеризации, приводящей к накоплению мультимерных продуктов практически для всех вариантов сочетания полимераз (4 вида) и поставляемых с ними буферов. Максимальная эффективность мультимеризации наблюдалась при проведении амплификации в буфере Isothermal, который обусловливает наилучшие условия для проявления полимеразой Bst exo- своей полимеразной активности. Наибольшую склонность к мультимеризации продемонстрировала полимераза Bst 2.0 в буфере Isothermal, a Bst-подобная полимераза Gss обеспечивает образование продуктов мультимеризации только в буфере Isothermal и на поздних этапах реакции. Эффективность мультимеризации может быть несколько снижена при использовании праймеров с GC-богатыми 5'-концевыми последовательностями, некомплементарными матрице, а также с объемными 5'-концевыми группами, такими как FAM или DMTr. Использование ионов Mn<sup>2+</sup> в качестве кофактора полимеразы способно устранить мультимеризацию в большинстве случаев, однако при этом снижается эффективность и специфической амплификации. Оптимальным условием устранения мультимеризации представляется один из вариантов: 1) использование полимеразы Gss совместно с буфером Thermopol, 2) использование полимераз Bst LF совместно с буфером Isothermal II или Bst 3.0 совместно с буфером Thermopol, 3) использование полимеразы Bst 3.0 совместно с буфером Isothermal и ионами Mn<sup>2+</sup> в качестве кофактора. В перечисленных случаях возможна специфическая амплификация исследуемой ДНК мишени и, соответственно, получение максимально достоверного результата ДНК-диагностических процедур.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы следующие реактивы: ДНК-полимеразы Bst LF, Bst 2.0, Bst 2.0 WarmStart и Bst 3.0. буферы Thermopol. Isothermal и Isothermal II (New England Biolabs, США); экзонуклеаза I (Exo I), Т4-полинуклеотидкиназа (Fermentas, Литва); Т4-ДНК-лигаза, dNTP (СибЭнзим, Россия); дитиотреитол, акриламид, N.N'-метиленбисакриламид, Tris, персульфат аммония, динатриевая соль N.N.N'.N'этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамин (AppliChem, Германия): SYBR Green I (Биотех-Индустрия. Россия); 5-(этилтио)-1Н-тетразол, 2-цианоэтиламидофосфиты (dA-CE, dC-CE, dG-CE, dT-CE), носители для синтеза олигонуклеотидов (dA-CPG, dC-CPG, dG-CPG, dT-CPG) (Glen Research, США); абсолютные ацетонитрил и тетрагидрофуран квалификации "для синтеза ДНК"

(Panreac, Испания). ДНК-полимераза Gss была получена как описано в работе [21]. Буферные растворы Thermopol-C (20 мМ Tris-HCl (pH 8.8), 10 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 мМ KCl, 0.1% Triton X-100), Isothermal-C (20 мМ Tris-HCl (pH 8.8), 10 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50 мМ KCl, 0.1% Tween 20) и Isothermal II-C (20 MM Tris-HCl (pH 8.8), 10 MM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 150 мМ KCl, 0.1% Tween 20) были приготовлены в соответствии с составом оригинальных буферов Thermopol. Isothermal. Isothermal II (New England Biolabs, США), поставляемых вместе с соответствующими полимеразами, но без ионов Mg<sup>2+</sup>. Растворы солей MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub> и Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> добавляли непосредственно в реакционные смеси для амплификации в конечной концентрации катиона 2.5 мМ. Для приготовления всех растворов использовали воду высшей категории качества (>18 МОм, Millipore, Франция), все растворы перед применением фильтровали через шприцевые насадки Chromafil Xtra PET-20/25 (Macherey-Nagel, Германия) с размером пор 0.2 мкм.

Олигонуклеотидные матрицы и праймеры конструировали с использованием онлайн-утилиты OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies, США) и проверены с помощью инструментов BLAST на отсутствие гомологии с известными нуклеотидными последовательностями, депонированными в базе данных GenBank на сайте NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Праймеры синтезировали на автоматическом ДНК-синтезаторе ASM-800 (Биоссет, Россия) амидофосфитным способом, их очистку проводили методом гельэлектрофореза в 15% ПААГ. Концентрацию всех нуклеиновых кислот определяли по оптическому поглощению водного раствора при 260 нм на спектрофотометре BioSpec-Mini (Shimadzu, Япония) и выражали как число оптических единиц в 1 мл (ОЕ/мл). Последовательности олигонуклеотидов представлены в табл. 1.

Кольшевые матрицы МС1-МС3. Олигонуклеотилы ML1-ML3 сначала фосфорилировали с помощью Т4-полинуклеотидкиназы согласно протоколу производителя, а затем в приборе Т100 (Bio-Rad Laboratories, США) проводили отжиг в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1 пмоль ML1, 5 пмоль поддерживающей пробы S1 или S2, буфер Т4-ДНК-лигазы, плавно снижая температуру с 80 до 25°С в течение 1 ч. После окончания отжига добавляли 2 мкл 10 мМ АТР и 5 ед. акт. Т4-ДНК-лигазы. Смесь инкубировали 18 ч при 8°С, далее инактивировали лигазу при 75°С в течение 15 мин. Затем к реакционной смеси добавляли 1 ед. акт. экзонуклеазы I и ее буфер, инкубировали 2 ч при 37°С и еще 1 ч при 45°С, после чего инактивировали фермент при 85°С в течение 15 мин. Кольцевую матрицу далее использовали для амплификации без дополнительной очистки, разбавляя водой до концентрации 107 молекул/мкл.

Амплификацию с детекцией результатов по конечной точке проводили в приборе T100 (Bio-Rad Laboratories, США). Образцы готовили в ПЦРбоксе с рециркулятором UVC/T-M-AR (Biosan, Латвия), предварительно облучая рабочее пространство, автоматические дозаторы и пластиковую посуду ультрафиолетом в течение 20 мин. Образцы объемом 10 мкл содержали 10<sup>7</sup> копий мишени, 5 пмоль каждого из праймеров, 1 мкл смеси dNTP с концентрацией 2.5 мМ, 3 ед. акт. ДНК-полимеразы и соответствующий полимеразный буфер.

Протокол амплификации состоял из следующих этапов: 1) "условная" денатурация при 70°С – 30 с; 2) "условный" отжиг при 65°С – 60 с; 3) элонгация при 60°С – 3 ч. Амплификацию в режиме реального времени проводили в приборе iQ5 (Bio-Rad Laboratories, США). В данном случае реакционные смеси содержали дополнительно интеркалирующий краситель SYBR Green I  $(0.1^{\times}-2^{\times})$ , а каждый образец был представлен в трех повторах. В экспериментах с предобработкой полимеразы дитиотреитолом смешивали реагент с 20 мМ водным раствором DTT в соотношении 1:1 и выдерживали 1 ч при 4°С, далее вносили в реакционные смеси для амплификации в объеме, содержащем равное количество единиц активности фермента, при этом концентрация DTT в реакционной смеси составляла 0.6 мМ.

Электрофорез продуктов амплификации проводили в 10–15% полиакриламидных гелях в Трис-ацетатном буфере в камере вертикального типа VE-10 (Хеликон, Россия) при напряжении 90–110 В. Источником питания служил прибор Эльф-4 (ДНК-Технология, Россия). Гели окрашивали бромистым этидием и визуализировали в приборе Gel Camera System (UVP Inc., США).

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования "Биомика" и уникальной научной установки "КОДИНК".

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания (тема № АААА-А16-116020350032-1).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

 Fire A., Xu S.Q. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 4641–4645.

- Ali M.M., Li F., Zhang Zh., Zhang K., Kang D.K., Ankrum J.A., Le X.C., Zhao W. // Chem. Soc. Rev. 2014. V. 43. P. 3324–3341.
- Mohsen M.G., Kool E.T. // Acc. Chem. Res. 2016. V. 49. P. 2540–2550.
- Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. // Nucl. Acids Res. 2000. V. 28. E63.
- Wong Y.P., Othman S., Lau Y.L., Radu S., Chee H.Y. // J. Appl. Microbiol. 2018. V. 124. P. 626–643.
- 6. Compton J. // Nature. 1991. V. 350. P. 91-92.
- Walter N.G., Strunk G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 7937–7941.
- 8. Kim J., Easley C.J. // Bioanalysis. 2011. V. 3. P. 227–239.
- Zhao Y., Chen F., Li Q., Wang L., Fan C. // Chem. Rev. 2015. V. 115. P. 12491–12545.
- Fakruddin M., Mannan K. S., Chowdhury A., Mazumdar R.M., Hossain M. N., Islam S., Chowdhury M.A. // J. Pharm. Bioallied Sci. 2013. V. 5. P. 245–252.
- 11. Deng H., Gao Z. // Anal. Chim. Acta. 2015. V. 853. P. 30–45.
- 12. *Mayboroda O., Katakis I., O'Sullivan C.K.* // Anal. Biochem. 2018. V. 545. P. 20–30.
- Giuffrida M.C., Spoto G. // Biosens. Bioelectron. 2017. V. 90. P. 174–186.
- 14. *Qi H., Yue S., Bi S., Ding C., Song W. //* Biosens. Bioelectron. 2018. V. 110. P. 207–217.
- Cao H., Zhou X., Zeng Y. // Sens. Actuator-B: Chem. 2019. V. 279. P. 447–457.
- Treerattrakoon K., Jiemsakul T., Tansarawiput C., Pinpradup P., Iempridee T., Luksirikul P., Khoothiam K., Dharakul T., Japrung D. // Anal. Biochem. 2019. V. 577. P. 89–97.
- 17. *Ma Y., Zhang B., Wang M., Ou Y., Wang J., Li S. //* Biomed. Res. Int. 2016. 2906484.

- Rastgoo N., Sadeghizadeh M., Bambaei B., Hosseinkhani S. // J. Biotechnol. 2009. V. 144. P. 245–252.
- Çağlayan M., Bilgin N. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2011. V. 165. P. 1188–200.
- Oscorbin I.P., Belousova E.A., Boyarskikh U.A., Zakabunin A.I., Khrapov E.A., Filipenko M.L. // Nucl. Acids Res. 2017. V. 45. P. 9595–9610.
- 21. Oscorbin I.P., Boyarskikh U.A., Filipenko M.L. // Mol. Biotechnol. 2015. V. 57. P. 947–959.
- 22. Zyrina N.V., Antipova V.N., Zheleznaya L.A. // FEMS Microbiol. Lett. 2014. V. 351. P. 1–6.
- Hafner G.J., Yang I.C., Wolter L.C., Stafford M.R., Giffard P.M. // BioTechniques. 2001. V. 30. P. 852–867.
- 24. Gu L., Yan W., Liu L., Wang S., Zhang X., Lyu M. // Pharmaceuticals. 2018. V. 11. P. 35.
- 25. *Wang G., Ding X., Hu J., Wu W., Sun J., Mu. Y. //* Sci. Rep. 2017. V. 7. E13928.
- Oscorbin I.P., Belousova E.A, Zakabunin A.I., Boyarskikh U.A., Filipenko M.L. // Biotechniques. 2016. V. 61. P. 20–25.
- 27. Гильванов А.Р., Сахабутдинова А.Р., Чемерис А.В., Гарафутдинов Р.Р. // Биомика. 2018. Т. 11. С. 268-273.
- Güixens-Gallardo P., Hocek M., Perlíková P. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2016. V. 26. P. 288–291.
- 29. *Hays H., Berdis A.J.* // Biochemistry. 2002. V. 41. P. 4771–4778.
- Frank E.G., Woodgate R. J. // Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 24689–24696.
- Xu W., Zhao W., Morehouse N., Tree M.O., Zhao L. // J. Mol. Biol. 2019. V. 431. P. 673–686.
- 32. *Ralec C., Henry E. Lemor M., Killelea T., Henneke G. //* Nucl. Acids Res. 2017. V. 45. P. 12425–12440.
- 33. Vashishtha A.K., Konigsberg W.H. // Biochemistry. 2018. V. 55. P. 2661–2670.

# Elimination of DNA Multimerization Occurring at Isothermal Amplification with Bst exo- DNA Polymerase

A. R. Sakhabutdinova<sup>\*, #</sup>, L. R. Mirsaeva<sup>\*</sup>, I. P. Oscorbin<sup>\*\*</sup>, M. L. Filipenko<sup>\*\*</sup>, and R. R. Garafutdinov<sup>\*</sup>

<sup>#</sup>*Phone/fax:* +7(347) 235-60-88; e-mail: sakhabutdinova.a.r@gmail.com

\*Institute of Biochemistry and Genetics UFRC RAS, prosp. Octyabrya 71, Ufa, 450054 Russia

\*\*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS,

pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, Novosibirskaya obl., 630090 Russia

Methods for isothermal amplification of nucleic acids have gained more attention in recent decades. For isothermal amplification, polymerases with strand-displacement activity are required, among which Bst exo- is the most popular polymerase. However, Bst exo- polymerase is able to nonspecific amplification (so-called multimerization) that leads to the accumulation of by-products consisting of tandem nucleotide repeats. In this study, the efficiency of multimerization depending on the reaction conditions was evaluated and methods for its elimination were proposed. The maximum efficiency of multimerization products formation only in Isothermal buffer at the later stage of the reaction. The following methods for multimerization elimination are recommended: the use of Gss polymerase with Thermopol buffer, or Bst LF polymerase with Isothermal buffer, or Bst 3.0 polymerase with Thermopol buffer, or Bst 3.0 polymerase with Isothermal buffer and  $Mn^{2+}$  ions as a cofactor. In these cases, specific isothermal amplification of nucleic acids is possible, which provides accurate and reliable results.

Keywords: Bst exo- DNA polymerase, rolling circle amplification (RCA), multimerization, Gss DNA polymerase, specificity



УДК 547.917:579.22

# СТРУКТУРА О-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА И ЛИПИДА А ТИПОВОГО ШТАММА БАКТЕРИЙ *Azospirillum rugosum* DSM-19657

© 2020 г. Е. Н. Сигида<sup>\*, #</sup>, М. С. Кокоулин<sup>\*\*</sup>, П. С. Дмитренок<sup>\*\*</sup>, В. С. Гринёв<sup>\*, \*\*\*</sup>, Ю. П. Федоненко<sup>\*, \*\*\*</sup>. С. А. Коннова<sup>\*, \*\*\*</sup>

> \*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, 410049, Саратов, просп. Энтузиастов, 13 \*\*Тихоокеанский институт биоорганической химии имени Г.Б. Елякова ДВО РАН, Россия, 690022, Владивосток, Проспект 100 лет Владивостоку, 159

\*\*\*Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского,

Россия, 410012, Саратов, ул. Астраханская, 83 Поступила в редакцию 08.07.2019 г. После доработки 28.07.2019 г. Принята к публикации 16.08.2019 г.

Проведены структурные исследования липополисахарида типового штамма азотфиксирующих почвенных бактерий *Azospirillum rugosum*, выделенного из загрязненных нефтью почв. На основании данных химического анализа, 1D- и 2D- <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-ЯМР-спектроскопии установлено, что О-специфический полисахарид состоит из повторяющихся звеньев двух типов, идентичных обнаруженным ранее в О-специфическом полисахариде штамма *Azospirillum brasilense* Jm125A2. Структурный анализ липида A с применением ГЖХ и МАЛДИ-масс-спектрометрии выявил смесь пента-, тетра- и триацильных типов молекул. Первичными жирными кислотами в липиде A являются *N*-связанная 16:0(3-OH)- и *O*-связанная 14:0(3-OH). Микрогетерогенность в пределах каждого типа обусловлена природой вторичных жирных кислот (16:0, 18:1 или 19:0), ацилирующих 16:0(3-OH)-кислоту дистального кольца GlcN.

Ключевые слова: Azospirillum rugosum, липополисахарид, О-специфический полисахарид, липид А, ЯМРспектроскопия, МАЛДИ-масс-спектрометрия

**DOI:** 10.31857/S0132342320010133

#### **ВВЕДЕНИЕ**

Грамотрицательные альфа-протеобактерии рода *Azospirillum* из семейства Rhodospirillaceae являются типичными представителями ризосферы диких и культивируемых злаков [1]. На сегодняшний день род *Azospirillum* включает 21 вид, большинство из которых способны увеличивать урожайность растений, оказывая множественное воздействие на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях [2]. Рост-стимулирующий потенциал азоспирилл реализуется посредством продукции фитогормонов, улучшения минерального питания, фиксации атмосферного азота, снижения биотических и абиотических стрессов, биоконтроля патогенов и других механизмов [3, 4]. В начальные этапы формирования растительно-микробных ассоциаций с участием азоспирилл вовлечены гликополимеры бактериальной поверхности – капсульные полисахариды и липополисахариды (ЛПС) [5]. Стимулирующий эффект, оказываемый азоспириллами на растения, является весомой причиной для изучения молекулярного механизма ассоциативного взаимодействия и требует детального изучения структуры ЛПС.

ЛПС состоит из трех химически, биологически и биосинтетически различающихся компонентов, ковалентно связанных друг с другом: липида А, корового олигосахарида и О-специфического полисахарида (ОПС). ОПС является вариабельным доменом ЛПС; многообразие его возможных структур обусловлено природой, количеством, типом связей и конфигурацией моносахаридных остатков, образующих повторяющиеся звенья, а также наличием заместителей неуглеводной природы [6]. Липиду А, напротив, присуща общая консервативность строения в пределах бактериального рода при наличии мик-

Сокращения: ЛПС – липополисахарид; ЖК – жирные кислоты; МАЛДИ – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация; МС – масс-спектрометрия; ОПС – О-специфический полисахарид; ЯМР – ядерный магнитный резонанс.

<sup>&</sup>lt;sup>#</sup> Автор для связи: (тел.: +7 (8452) 97-04-44; факс: +7 (8452) 97-04-03; эл. почта: si\_elena@mail.ru).



**Рис. 1.** <sup>13</sup>С-ЯМР-спектры ОПС *А. rugosum* DSM-19657 (вверху) и *А. brasilense* Jm125A2 (внизу). Арабские цифры относятся к атомам углерода в моносахаридных остатках, обозначенных в табл. 1 и в тексте.

рогетерогенности, обусловленной разнообразием остатков — вторичных — жирных кислот (ЖК), ацилирующих ЖК, связанные с сахаром, степенью ацилирования и фосфорилирования. Гетерогенность строения липида А может быть связана со многими факторами, в том числе адаптацией бактерий к изменяющимся условиям среды, степенью завершенности биосинтеза и частичной модификацией препарата во время выделения [7].

Считается, что многие фундаментальные свойства бактерий определяются условиями экологической ниши, в которой они обитают. Известно, что азоспириллы хорошо адаптируются к условиям существования, обладают высокой конкурентоспособностью и не имеют строгой специфичности к растению-хозяину [8]. Кроме того, в последнее время описаны "неризосферные" виды, способные заселять нехарактерные для азоспирилл ниши. Из отработанного дорожного покрытия выделен представитель нового вида A. picis [9], из сульфидного источника – A. thiophilum [10], из пресной воды – А. griseum [11], из ферментированных молочных продуктов – А. гаmasamyi [12], из микробной топливной ячейки -А. humicireducens [13]. Культура А. rugosum была выделена из загрязненных нефтью почв [14]. Активность в утилизации нефти в качестве источника углерода и энергии, возрастающая в присутствии малата, одного из компонентов корневых экссудатов растений, была отмечена и для ряда ризосферных штаммов *A. brasilense* и *A. lipoferum* [15], что делает их перспективными агентами для инокуляции при фиторемедиации загрязненных нефтью почв.

В последние годы установлены структуры ОПС для 50 ризосферных штаммов A. brasilense, A. lipoferum [16], A. halopraeferens [17], A. fermentarium [18] и A. dobereinerae [19]. Данные о строении липида A азоспирилл в основном ограничены составом жирных кислот, а полная структура была опубликована для единственного штамма A. lipoferum SpBr17 [20].

В настоящей работе приводятся сведения о строении О-специфического полисахарида и липида А типового штамма ранее не изученной в этом отношении бактерии *А. rugosum* DSM-19657.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из сухой биомассы бактерий *А. rugosum* DSM-19657 водно-фенольной экстракцией был выделен ЛПС, в результате деградации которого в мягких кислых условиях были получены ОПС и липид А. Моносахаридный анализ ОПС в виде ацетатов полиолов методом ГЖХ выявил наличие Rha, Glc, GlcN и Fuc3N в соотношении ~4.9:2.4:1.4:1 (отклик детектора). Анализ продуктов полного гидролиза ОПС методом ГЖХ в виде ацетилированных (S)-2-октигликозидов позволил установить D-конфигурацию Glc и GlcN и L-конфигурацию Rha.

<sup>13</sup>С-ЯМР-спектр ОПС (рис. 1) содержал сигналы различной интенсивности, свидетельствующие о нерегулярности строения полимера. В спектре присутствовали сигналы нескольких аномерных углеродов при δ 98.2–105.6 м.д., двух HOCH<sub>2</sub>-групп остатков Glc и GlcNAc при δ 61.9 и 62.2 м.д., двух углеродов, связанных с азотом (C2 GlcNAc и C3 Fuc3NAc) при δ 52.3 и 56.8 м.д., нескольких <u>С</u>Н<sub>3</sub>-С-групп (отвечающих С6-атомам остатков Fuc3NAc и Rha) при δ 16.6 и 17.4-18.0 м.д., других углеродов моносахаридных колец при δ 67.6-83.1 м.д., двух *N*-ацетильных групп (СН<sub>3</sub> при δ 23.3 и 23.5 м.д., СО при δ 175.1 и 175.6 м.д.). Отсутствие сигналов в диапазоне  $\delta$  83-88 м.д., характеристичных для фуранозидов, свидетельствовало о том, что все моносахариды в составе ОПС являются пиранозидами. Соответственно, в <sup>1</sup>Н-ЯМР-спектре ОПС присутствовали сигналы нескольких аномерных протонов при δ 4.76–5.37 м.д., ряда CH<sub>3</sub>–C-групп (H6 Rha и Fuc3NAc) при  $\delta$  1.23–1.32 м.д., другие протоны моносахаридных колец при δ 3.43-4.50 м.д., двух *N*-ацетильных групп при  $\delta$  2.06 м.д. Учитывая схожесть моносахаридного состава ОПС А. rugosum с составом ОПС A. brasilense Jm125A2, установленным нами ранее [21], мы провели сравнение 1D- и 2D-ЯМР-спектров ОПС этих штаммов. В результате сравнения была выявлена практически полная идентичность мажорных серий сигналов в спектрах, что свидетельствовало об идентичности повторяющихся звеньев ОПС. На основании этих данных сигналы в спектрах <sup>1</sup>Н-и <sup>13</sup>С-ЯМР были отнесены с использованием <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H COSY, TOCSY, ROESY, и <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C HSQC-экспериментов (табл. 1).

Таким образом, ОПС *А. rugosum* состоит из повторяющихся звеньев двух типов, идентичных по структуре *A. brasilense* Jm125A2:



В составе липида А методом ГЖХ метиловых эфиров жирных кислот (ЖК) были выявлены преобладающие 14:0 (3-OH)-, 16:0 (3-OH)- и 18:1кислоты, на долю которых приходилось более 85% от суммы идентифицированных ЖК. Также были обнаружены 16:0- (11%), 16:1- (2%) и 19:0-(1%) кислоты. Природа О-связанных жирных кислот была установлена с применением мягкого щелочного гидролиза в 12.5% NH<sub>4</sub>OH, в условиях которого эфирные ацильные и ацилоксиацильные группы менее устойчивы, по сравнению с ациламидными и ацилоксиациламидными [22]. В результате О-дезацилирования наблюдалось снижение содержания ЖК 14:0 (3-OH) по отношению к другим кислотам, что свидетельствовало о эфирном типе связи этой первичной кислоты, а вторичные кислоты ацилируют амидосвязанную ЖК 16:0 (3-OH). Методом ГЖХ ацетилированных метилгликозидов в составе липида А были идентифицированы GlcN и GalA в соотношении ~2:1. Полученные данные указывали на сходство строения липида А *A. rugosum* и *A. lipoferum* SpBr17 [20], для последнего продемонстрировано наличие трисахаридного остова следующей структуры: GlcpN(1→6)GlcpN(1↔1)GalpA, в котором оба остатка GlcpN ацилированы кислотой 16:0 (3-OH) в

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 46 № 1 2020

тиолици п. данные п. и. с			21. rugosum (C	, м.д.)			
Моносохорилиний остоток	H1	H2	Н3	H4	H5	H6 ( <i>a; b</i> )	NAc
моносахаридный остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6	INAC
Повторяющееся звено 1							
$\rightarrow$ 2,3)- $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ (A)	5.37 102.4	4.20 80.5	4.02 78.0	3.66 73.6	3.88 70.6	1.31 17.8	
$\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ (B)	4.97 103.3	4.17 71.3	3.86 79.3	3.57 72.8	3.75 70.7	1.27 17.8	
$\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ (C)	5.22 102.1	4.08 79.3	3.91 71.5	3.50 73.7	3.79 70.8	1.32 18.0	
$\beta$ -D-Glc <i>p</i> -(1 $\rightarrow$ (D)	4.58 105.6	3.35 74.5	3.50 76.9	3.43 70.7	3.43 77.1	3.74, 3.86 61.9	
Повторяющееся звено 2							
$\rightarrow 2,3$ )- $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ (E)	4.89 99.8	3.98 77.2	3.96 78.1	3.66 72.9	3.99 70.7	1.25 17.4	
$\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ (F)	4.79 103.2	3.82 56.8	3.62 83.1	3.48 70.1	3.43 77.2	3.78, 3.94 62.2	2.06 23.3, 175.1
$\alpha$ -D-Fuc <i>p</i> 3NAc-(1 $\rightarrow$ (G)	4.76 98.2	3.77 67.7	4.15 52.3	3.74 71.8	4.50 68.3	1.23 16.6	2.06 23.5, 175.5

Таблица 1. Данные <sup>1</sup>Н- и <sup>13</sup>С-ЯМР-спектров ОПС А. rugosum (б, м.д.)

положении 2 и кислотой 14:0 (3-OH) в положениях 3 и 3', а остатки вторичных кислот этерифицируют первичную ЖК 16:0 (3-OH) в положении 2'. Учитывая консервативность строения липида А в пределах бактериального рода, мы приняли, что сахарный остов липида А *A. rugosum* идентичен таковому *A. lipoferum*.

МАЛДИ-масс-спектр отрицательных ионов липида А, записанный в режиме рефлектрона, содержал несколько групп сигналов депротонированных молекул  $[M - H]^-$  в диапазоне m/z 1023.7-1756.1, отличающихся природой и количеством остатков жирных кислот (рис. 2). В спектре присутствовали три обособленные группы пиков с наиболее интенсивными сигналами в каждой группе при *m/z* 1287.9, 1514.0 и 1740.1 (рис. 3), которые соответствовали три-, тетра- и пентаацильным типам молекул, содержащих остаток GalA и два остатка GlcN, ацилированных кислотами 16:0 (3-ОН), 14:0 (3-ОН) и 18:1 (табл. 2). Разница в массах 26 и 16 Да между сигналами в группах была обусловлена различной длиной вторичных жирных кислот и соответствовала наличию идентифицированных ГЖХ-анализом остатков насыщенных кислот 16:0 и 19:0 вместо ненасыщенной 18:1 (табл. 2). Разница между наиболее интенсивными сигналами пента-, тетра- и триацильных типов составляла 226 Да, что соответствовало одному остатку первичной кислоты 14:0 (3ОН). Сигнал при m/z 1023.7, отличающийся на 264 Да от наиболее интенсивного сигнала триацильного

липида А, соответствовал диацильному типу, несущему только остатки 16:0 (3-OH) и лишенному остатка вторичной кислоты 18:1. Отсутствие в спектре сигналов с разницей 80 Да свидетельствовало об отсутствии фосфорилирования липида А.

МАЛДИ-масс-спектр положительных ионов липида A, записанный в режиме рефлектрона, содержал соответствующие сигналы натриевых аддуктов  $[M + Na]^+$  и  $[M - H + 2Na]^+$  для три-, тетра- и пентаацильных типов липида A в диапазоне m/z 1285.8–1802.2 (рис. 2, табл. 2).

Для полтверждения строения липида А и доказательства положения вторичных кислот были записаны МС/МС-спектры наиболее интенсивных сигналов в режиме детектирования положительных и отрицательных ионов. Спектры второго порядка [M - H]-иона с m/z 1514.0 (рис. 3) подтверждали предполагаемое строение липида А и содержали сигналы осколочных ионов, указывающие на последовательное элиминирование остатков 14:0(3-ОН)- и 18:1-ЖК. Отщепление вторичной кислоты 18:1 происходило в виде нейтральной молекулы, так как в спектре присутствовали только сигналы с характеристичной разницей масс 282 Да. но не наблюдалось таковых. возникающих в ходе отщепления кетена и альдегида с разницами масс 264 и 222 Да, соответственно [23].

Элиминирование остатка ЖК 14:0(3-OH) происходило различными путями, о чем свидетельствовало присутствие в спектре сигналов с разни-



**Рис. 2.** МАЛДИ-масс-спектры липида А *A. rugosum*, записанные в режиме детектирования отрицательных (вверху) и положительных (внизу) ионов.

цей 244, 226 и 184 Да. Максимальная разница масс 244 Да соответствовала отщеплению кислоты в виде нейтральной молекулы, отличие в 226 Да отвечало потере кетена, а 184 Да – альдегида, протекающему через перегруппировку МакЛафферти. Хотя последний тип фрагментации наиболее часто упоминается для *N*-связанных ЖК [24, 25], он отмечен и для ЖК-остатков, связанных сложноэфирной связью [26].

В средней области MC/MC-спектра  $[M - H]^-$ иона с m/z 1514.0 наблюдались сигналы при m/z 987.8, 1005.6 и 1047.7 (рис. 3), соответствующие отщеплению одного ацильного остатка 18:1 и од-

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 46 № 1 2020

ного остатка 14:0(3-OH) от родительского иона (-(282 + 244), -(282 + 226), -(282 + 184) Да, соответственно). Образование промежуточного продукта фрагментации с m/z 742.3 происходило в результате потери родительским ионом с m/z 1514.0 остатка 18:1 в виде нейтральной молекулы (-282 Да) с образованием осколка с m/z 1232.0 и его последующей диссоциации по пути  $^{0.2}$ А<sub>2</sub> (здесь и далее используется номенклатура фрагментации углеводов Домон и Кастелло [27]). Диацильный фрагмент с m/z 742.3 (рис. 3) в ходе дальнейшего расщепления теряет остаток 14:0(3-OH) в виде



Рис. 3. МАЛДИ-МС/МС иона с *m/z* 1514.0 липида А A. rugosum.

нейтральной ЖК (-244 Да) с образованием иона при m/z 498.3.

Последовательное отщепление остатка *N*-связанной ЖК 16:0(3-OH) в виде кетена и воды от осколка с m/z 1005.6 приводило к образованию фрагмента с m/z 731.7. В результате дегидратации последнего происходило образование иона при m/z 713.7, а его фрагментация по пути <sup>0,4</sup>A<sub>2</sub> приводила к возникновению осколка с m/z 456.2, отщепление гликольальдегида (-60 Да) от которого, предположительно, приводило к образованию иона, детектируемого при m/z 396.2. В области низкомолекулярных продуктов MC/MC-спектра также присутствовали ионы [M - H]<sup>-</sup> депротонированных молекул 14:0(3-OH)- и 18:1-ЖК при m/z 243.3 и 281.2 соответственно.

Предполагаемые структуры и пути фрагментации  $[M - H]^-$ -иона с m/z 1514.1 липида А *A. rugosum* в MC/MC-спектрах приведены на рис. 4. MC/MC-спектр иона  $[M - H]^-$  при m/z 1287.9 содержал характеристичные осколки при m/z 1005.6, 731.7, 456.2, образование которых происходило по аналогии с приведенной схемой.

Таким образом, были отнесены наиболее интенсивные сигналы в MC/MC-спектре  $[M - H]^-$ ионов. Следует отметить, что представленная на рисунке схема фрагментации  $[M - H]^-$ иона тетраацильного липида А при m/z 1514.0, в котором 14:0(3-OH) находится в положении 3 проксимального остатка GlcN будет также справедлива и для липида А, в котором ЖК 14:0(3-OH) замещает положение 3 дистального кольца GlcN. В то же время, о положении вторичной кислоты 18:1, ацилирующей 16:0(3-OH) дистального звена GlcN, однозначно свидетельствовало наличие иона  $[^{0.4}A_2-H]^-$  при *m/z* 456.2, поскольку фрагментация альтернативного по структуре иона, в котором ЖК 18:1 связана с 16:0(3-OH)-кислотой проксимального GlcN, не приводила бы к образованию осколков, наблюдаемых в MC/MCспектрах.

MC/MC-спектр иона  $[M + Na]^+$  при m/z 1738.2 (рис. 5), соответствующего пентаацильному типу липида А, несущего по два остатка 14:0(3-ОН) и 16:0(3-ОН), а также один остаток 16:0, содержал характеристичные сигналы осколков, образующихся в результате последовательного отщепления GalA по путям  $C_2$  и  $B_2$  [27] с разницей масс 176 и 194 Да соответственно, остатка 14:0(3-ОН) в виде кислоты или кетена (-244 или -226 Да), остатка 16:0 (-256 Да) и фрагмента 16:0(3-ОН) в виде альдегида (-212 Да) в диапазоне *m/z* 605.0-1562.1. Серия наиболее интенсивных сигналов осколочных ионов, получающихся в ходе данного пути фрагментации, присутствовали в рассматриваемом спектре в диапазоне m/z 1073.5–1562.1 и соответствовали потере одного, двух или трех вышеуказанных фрагментов. Менее интенсивные сигналы [*M* + Na]<sup>+</sup> при *m/z* 817.4, 831.2 и 861.3 соответствовали отщеплению четырех фрагментов, а ион при m/z 605.0 отвечал элиминированию GalA, двух остатков 14:0(3-ОН), а также по одному остатку 16:0(3-ОН) и 16:0 от родительского иона.

В средней области MC/MC-спектра присутствовали интенсивные сигналы осколка  $[^{0.4}A_2 + Na]^+$ при *m/z* 962.4, дальнейшая фрагментация которого сопровождалась последовательным элиминированием остатков 16:0 и 14:0(3-OH) с образованием осколка с *m/z* 461.8. MC/MC-спектр также содержал менее интенсивный сигнал иона при

[ <i>M</i> – Н] <sup>−</sup> эксп. (Да)	[ <i>M</i> – H] <sup>−</sup> расч. (Да)	[ <i>M</i> + Na] <sup>+</sup> эксп. (Да)	[ <i>M</i> + Na] <sup>+</sup> расч. (Да)	$[M - H + 2Na]^+$ эксп. Да)	$[M - H + 2Na]^+$ расч. (Да)	Состав ЖК		
Триацильные типы								
1261.919	1261.8518	1285.816	1285.8483	H.o.	1307.8303	2 × 16:0 (3OH) 1 × 16:0		
1287.942	1287.8675	1311.794	1311.8640	H.o.	1333.8459	2 × 16:0 (3OH) 1 × 18:1		
1303.913	1303.88988	1327.850	1327.8953	H.o.	1349.8772	2 × 16:0 (3OH) 1 × 19:0		
	ı	Te	траацильные ти	пы	,			
1488.064	1488.0451	1511.993	1512.0416	H.o.	1534.0235	2 × 16:0 (3OH) 1 × 14:0 (3OH) 1 × 16:0		
1514.041	1514.0607	1538.007	1538.0572	1559.987	1560.0392	2 × 16:0 (3OH) 1 × 14:0 (3OH) 1 × 18:1		
1530.037	1530.0920	1554.010	1554.0885	1576.006	1577.1080	2 × 16:0 (3OH) 1 × 14:0 (3OH) 1 × 19:0		
	ļ	Пе	нтаацильные ти	пы	I			
1714.101	1714.2384	1738.201	1738.2349	1760.199	1761.2246	2 × 16:0 (3OH) 2 × 14:0 (3OH) 1 × 16:0		
1740.108	1740.2540	1764.225	1764.2505	1786.207	1787.2403	2 × 16:0 (3OH) 2 × 14:0 (3OH) 1 × 18:1		
1756.082	1756.2853	1780.209	1780.2818	1802.187	1803.2716	2 × 16:0 (3OH) 2 × 14:0 (3OH) 1 × 19:0		

Таблица 2. Результаты масс-спектрометрии и предполагаемый состав жирных кислот липида А А. rugosum

Примечание. Н.о. – не обнаружено.

m/z 902.5, соответствующего продукту В<sub>1</sub> фрагментации по гликозидной связи. В результате отрыва от этого фрагмента остатков 14:0(3-OH) (-226 и -244 Да) и 16:0 (-256 Да) наблюдалось образование ионов [M + Na]<sup>+</sup> при m/z 646.2, 658.2 и 676.2 соответственно (рис. 6).

На основании комплексного анализа химического состава и МАЛДИ-масс-спектров была установлена структура липида А *А. rugosum* (рис. 7), который представляет собой смесь молекул пента-, тетра- и триацильных типов, отличающихся друг от друга количеством остатков первичной О-связанной 14:0(3-OH). Микрогетерогенность в пределах каждого из типов липида А с разной степенью ацилирования, обусловлена природой вторичных жирных кислот, ацилирующих остаток *N*-связанной 16:0(3-OH) кольца дистального GlcN. Анализ масс-спектров второго порядка при установлении структуры липида A*A. rugosum* продемонстрировал распределение вторичных жирных кислот, аналогичное таковому для *A. lipoferum* SpBr17, предложенному ранее на основе данных масс-спектрометрии первого порядка. Отличительной особенностью липида A*A. rugosum* является присутствие остатков вторичной ЖК 19:0, не идентифицированной в липиде A штамма SpBr17.

Таким образом, на основании данных химического анализа, спектроскопии ЯМР и МАЛДИмасс-спектрометрии для типового штамма нового вида бактерий *A. rugosum* было установлено сходство строения ОПС и липида A с таковыми компонентами изученных ранее видов *A. brasilense* и *A. lipoferum*. Межвидовая распространенность близких



**Рис. 4.** Предполагаемые структуры и пути фрагментации [*M* – H]-иона липида A с *m*/*z* 1514.0. Структуры изображены в виде нейтральных молекул.

по строению повторяющихся звеньев ОПС продемонстрирована ранее и для других представителей рода *Azospirillum* [15] и может свидетельствовать об отсутствии видовой приуроченности в отношении структуры этих традиционно вариабельных компонентов ЛПС, которая, скорее всего, определяется особенностями экологической ниши обитания. Сходство строения липида А *A. rugosum* и *A. lipoferum*




**Рис. 5.** МАЛДИ-МС/МС иона при *m/z* 1738.2 липида А *A. rugosum*.

позволяет предположить наличие близкородственных структур у других представителей данного рода.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование бактерий. Штамм Azospirillum rugosum DSM-19657 (IBPPM 629) предоставлен Коллекцией ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (г. Саратов). Культивирование бактерий проводили в жидкой малатно-солевой среде с витаминами [28] до окончания экспоненциальной фазы роста при температуре 30°С и перемешивании на вибростенде. Клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали в 0.15 М растворе NaCl и смывали с поверхности капсульный материал механическим перемешиванием в течение 5 сут с ежедневной сменой отмывающего раствора.

Выделение ЛПС, ОПС и липида А. ЛПС выделяли из высушенных ацетоном бескапсульных клеток горячим 45% водным раствором фенола без разделения слоев [29]. Примеси белков осаждали из раствора ЛПС добавлением 40% CCl<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H до конечного значения pH 2.7. Деградацию ЛПС проводили 2% CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H при 100°C в течение 4 ч. Осадок липида А отделяли центрифугированием, промывали водой и трижды обрабатывали смесью CHCl<sub>3</sub> : CH<sub>3</sub>OH : H<sub>2</sub>O (10 : 10 : 9, v/v) [30]. Супернатант, содержащий ОПС, разделяли гельхроматографией на колонке с Тоуореаrl TSK HW-50 (Тоуоsoda, Япония) в 1% АсOH, контролируя элюцию с помощью дифференциального проточного рефрактометра Кпаuer (Германия). Фракцию высокомолекулярного О-специфического полисахарида концентрировали и лиофилизовали.

**О-Дезацилированние** ЛПС проводили в 12.5%  $NH_4OH$  при 37°C в течение 16 ч. Модифицированный ЛПС выделяли гель-фильтрацией на колонке с Toyopearl TSK HW-40 (Toyosoda, Япония) в 1% AcOH.

Моносахаридный анализ. Анализ моносахаридного состава и абсолютных конфигураций сахаров проводили методом ГЖХ ацетатов полиолов [31], ацетилированных метилгликозидов и ацетилированных 2-(S)-октилгликозидов [32] на хроматографе Hewlett-Packard 7820A с капиллярной колонкой HP-5 (Hewlett-Packard, США). Градиент температуры от 160°С (1 мин) до 290°С, скорость нагрева 7°С/мин.

Состав жирных кислот. Состав жирных кислот ЛПС в виде метиловых эфиров жирных кислот определяли с помощью ГЖХ на хроматографе GC-2010 (Shimadzu, Япония), снабженном колонкой DB-5 (Agilent, США). Метилирование выполняли методом, описанным в работе [33].

**ЯМР-спектроскопия.** Спектры ЯМР записывали на спектрометре DRX-700 ("Bruker", Германия) в растворе 99.96%  $D_2O$  при 30°С (внутренний стандарт – ацетон,  $\delta_C$  31.45, и 3-триметилсилилпропаноат- $d_4$ ,  $\delta_H$  0.0. Образцы предварительно лиофилизовали дважды из 99.9%  $D_2O$ . Двумерные спектры записывали с использованием стандартного математического обеспечения (компании "Bruker", Германия); для сбора и обработки данных использовали программу TOPSPIN 2.1. В экспериментах TOCSY и NOESY время смешивания составляло 150 и 200 мс соответственно.



**Рис. 6.** Предполагаемые структуры и пути фрагментации [*M* + Na]<sup>+</sup>-иона при *m*/*z* 1738.2. Структуры изображены в виде натриевых аддуктов нейтральных молекул.



Рис. 7. Структура липида А А. rugosum.

МАЛДИ-масс-спектрометрия. К 1 мкл раствора липида А (1 мг/мл) добавляли 3 мкл раствора 2,5-дигидроксиацетофенона (10 мг/мл, CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O, 1 : 1 по объему), 1 мкл полученной смеси точечно наносили на стандартные планшеты для МАЛДИ и высушивали на воздухе. Масс-спектрометрию осуществляли на времяпролетном МАЛДИ-масс-спектрометре Autoflex speed компании "Bruker Daltonics" (Германия), снабженном азотным лазером (337 нм), в режиме рефлектрона с использованием программного обеспечения FlexControl (версия 3.4: Bruker Daltonics). Спектры записывали в режиме детектирования положительных и отрицательных ионов. МС/МС-спектры записывали в режиме диссоциации, индуцированной соударениями (CID). Для внешней калибровки масс использовали смесь сульфатированных олигосахаридов [34]. Обработку полученных результатов проводили с использованием программного обеспечения Flexanalysis (версия 3.4; Bruker Daltonics). МС-спектры получали аккумуляцией 1500 выстрелов лазера, МС/МС-спектры – 6000–7000 выстрелов при минимальной энергии лазера, требующейся для ионизации образца.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность центру коллективного пользования "Симбиоз" при ИБФРМ РАН за проведение ГЖХ.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследования поддержаны грантом Российского научного фонда (проект 18-74-00060).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Steenhoudt O., Vanderleyden J.* // FEMS Microbiol. Rev. 2000. V. 24. P. 487–506.
- Bashan Y., de-Bashan L.E. // Adv. Agron. 2010. V. 108. P. 77–136.
- Fukami J., Cerezini P., Hungria M. // AMB Express. 2018. V. 8. P. 73.
- Fibach-Paldi S., Burdman S., Okon Y. // FEMS Microbiol. Lett. 2012. V. 326. P. 99–108.
- Skvortsov I.M., Ignatov V.V. // FEMS Microbiol. Lett. 1998. V. 165. P. 223–229.
- Knirel Y.A. // Bacterial Lipopolysaccharides / Eds. Knirel Y.A., Valvano M.A. Wien: SpringerWien-NewYork, 2011. P. 41–115.
- Molinaro A., Holst O., Di Lorenzo F., Callaghan M., Nurisso A., D'Errico G., Zamyatina A., Peri F., Berisio R., Jerala R., Jiménez-Barbero J., Silipo A., Martín-Santamaría S. // Chemistry. 2015. V. 21. P. 500–519.
- Pereg L., Luz E., Bashan Y. // Plant Soil. 2016. V. 399. P. 389–414.
- Lin S.Y., Young C.C., Hupfer H., Siering C., Arun A.B., Chen W.M., Lai W.A., Shen F.T., Rekha P.D., Yassin A.F. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. V. 59. P. 761–765.
- Lavrinenko K., Chernousova E., Gridneva E., Dubinina G., Akimov V., Kuever J., Lysenko A., Grabovich M. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. P. 2832–2837.
- 11. Yang Y., Zhang R., Feng J., Wang C., Chen J. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2019.
- Anandham R., Heo J., Krishnamoorthy R., SenthilKumar M., Gopal N.O., Kim S.J., Kwon S.W. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2019. V. 69. P. 1369–1375.
- Zhou S., Han L., Wang Y., Yang G., Zhuang L., Hu P. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013. V. 63. P. 2618–2624.
- Young C.C, Hupfer H., Siering C., Ho M.J., Arun A.B., Lai W.A., Rekha P.D., Shen F.T., Hung M.H., Chen W.M., Yassin A.F. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008. V. 58. P. 959–963.
- Муратова А.Ю., Турковская О.В., Антонюк Л.П., Макаров О.Е., Позднякова Л.И., Игнатов В.В. // Микробиология. 2005. Т. 74. № 2. С. 248–254.
- Федоненко Ю.П., Сигида Е.Н., Коннова С.А., Игнатов В.В // Изв. АН. Сер. хим. 2015. Т. 64. № 5. С. 1024–1031.

- Sigida E.N., Fedonenko Y.P., Shashkov A.S., Arbatsky N.P., Zdorovenko E.L., Konnova S.A., Ignatov V.V., Knirel Y.A // Beilstein J. Org. Chem. 2016. V. 12. P. 636–642.
- Sigida E.N., Fedonenko Y.P., Shashkov A.S., Zdorovenko E.L., Konnova S.A., Knirel Y.A. // Carbohydr. Res. 2019. V. 478. P. 54–57.
- 19. Sigida E.N., Fedonenko Y.P., Shashkov A.S., Konnova S.A., Ignatov V.V. // Carbohydr. Res. 2018. V. 465. P. 40–43.
- Choma A., Komaniecka I. // Carbohydr. Res. 2008.
  V. 343. P. 799–804.
- Sigida E.N., Fedonenko Y.P., Shashkov A.S., Zdorovenko E.L., Konnova S.A., Ignatov V.V., Knirel Y.A. // Carbohydr. Res. 2015. V. 416. P. 37–40.
- 22. Silipo A., Lanzetta R., Amoresano A., Parrilli M., Molinaro A. // J. Lipid Res. 2002. V. 43. P. 2188–2195.
- Murphy R.C., Axelsen P.H. // Mass Spectrom. Rev. 2011. V. 30. P. 579–599.
- Phillips N.J., Schilling B., McLendon M.K., Apicella M.A., Gibson B.W. // Infect. Immun. 2004. V. 72. P. 5340– 5348.

- 25. Schilling B., McLendon M.K., Phillips N.J., Apicella M. A., Gibson B.W. // Anal. Chem. 2007. V. 79. P. 1034–1042.
- 26. *Shaffer S.A., Harvey M.D., Goodlett D.R., Ernst R.K. //* J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2007. V. 18. P. 1080–1092.
- 27. Domon B, Costello C. // Glycoconjugate J. 1988. V. 5. P. 397–409.
- Konnova S.A., Makarov O.E., Skvortsov I.M., Ignatov V.V. // FEMS Microbiol. Lett. 1994. V. 118. P. 93–99.
- 29. Westphal O., Jann K. // Methods Carbohydr. Chem. 1965. V. 5. P. 83–91.
- Que N.L.S., Ribeiro A.A., Raetz C.R.H. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 28017–28027.
- 31. Sawardeker J.S., Sloneker J.H., Jeanes A. // Anal. Chem. 1965. V. 37. P. 1602–1603.
- Leontein K., Lindberg B., Lönngren J. // Carbohydr. Res. 1978. V. 62. P. 359–362.
- Mayer H., Merkofer T., Warth C., Weckesser J. // J. Endotox. Res. 1996. V. 3. P. 345–352.
- 34. Шевченко Н.М., Анастюк С.Д., Герасименко Н.И., Дмитренок П.С., Исаков В.В., Звягинцева Т.Н. // Биоорг. хим. 2007. Т. 33. № 1. С. 96-107.

# Structure of the O-specific Polysaccharide and Lipid A of the Type Strain *Azospirillum rugosum* DSM-19657

E. N. Sigida<sup>\*, #</sup>, M. S. Kokoulin<sup>\*\*</sup>, P. S. Dmitrenok<sup>\*\*</sup>, V. S. Grinev<sup>\*, \*\*\*</sup>, Y. P. Fedonenko<sup>\*, \*\*\*</sup>, and S. A. Konnova<sup>\*, \*\*\*</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (8452) 97-04-44; fax: +7 (8452) 97-04-03; e-mail: si\_elena@mail.ru

\*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms Russian Academy of Sciences, pr. Entuziastov 13, Saratov, 410049 Russia

\*\*Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences, pr. 100 let Vladivostoku 159, Vladivostok, 690022 Russia

\*\*\* Chernyshevsky Saratov State University, ul. Astrahanskaya 83, Saratov, Saratovskaya obl., 410012 Russia

Structure of the lipopolysaccharide from the type strain of soil nitrogen-fixing bacteria *Azospirillum rugosum* isolated from oil contaminated soil was studied. On the basis of chemical analyses, 1D and 2D <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy data it was determined that the O-specific polysaccharide consists of two types of repeating units identical those reported earlier for *Azospirillum brasilense* Jm125A2. Structural analysis of the lipid A using GLC and MALDI mass spectroscopy revealed the presence of penta-, tetra- and triacylated species. Primary fatty acids are N-linked 16:0(3-OH) and O-linked14:0(3-OH). Microheterogeneity within each species arises from the presence of different secondary fatty acids (16:0, 18:1 и 19:0) that acylate 16:0(3-OH) of distal GlcN.

Keywords: Azospirillum rugosum, lipopolysaccharide, O-specific polysaccharide, lipid A, NMR spectroscopy, MALDI mass-spectrometry



## ИНГИБИРОВАНИЕ ЧУВСТВА КВОРУМА: УСПЕХИ В ПРИМЕНЕНИИ ПРИРОДНЫХ ПРОТИВОМИКРОБНЫХ АГЕНТОВ<sup>1</sup>

© 2020 M. Asif\*, # and M. Imran\*\*

\*Department of Pharmaceutical Chemistry, Himalayan Institute of Pharmacy Research, Dehradun, 248009 India \*\*Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Northern Border University, PO Box 840, Rafha, 91911 Saudi Arabia

> Поступила в редакцию 02.10.2018 г. После доработки 29.04.2019 г. Принята к публикации 09.07.2019 г.

Злоупотребление противомикробными препаратами при лечении инфекционных заболеваний привело к прогрессированию устойчивости инфекционных организмов. Неспособность противомикробных препаратов сдерживать инфекции приводит к необходимости поиска альтернатив существующим лекарствам. Связь с инфекционными агентами и природная способность повышать устойчивость к микробам привела к созданию исследовательских платформ, направленных на изучения механизмов регуляции численности бактерий. Так, патогенность многих бактерий регулируется, в частности, чувством кворума. Ингибирование систем чувства кворума может привести к снижению вирулентности и защитить от бактериальных инфекций. Зависимость бактерий от чувства кворума сделала сигнальные системы бактерий привлекательной мишенью для создания новых противоинфекционных агентов. Соединения, которые способны вмешиваться в процессы передачи сигналов, известны как ингибиторы чувства кворума. Чувство кворума является ключевым регулятором вирулентности разнообразных бактерий. Различные экстракты растений и их составляющие показали способность влиять на бактериальные факторы вирулентности посредством ингибирования генов системы чувства кворума и факторов, которые контролируются чувством кворума, а также на бактериальный рост. Подход, основанный на ингибировании системы чувства кворума. представляет собой многообешающий путь борьбы с инфекционными патогенами, который также делает их более чувствительными к традиционным противомикробным препаратам. Ингибиторы чувства кворума могут предоставить новейшее оружие против инфекций, вызываемых антибиотико-резистентными штаммами. Источники ингибиторов чувства кворума и их структуры многообразны.

Ключевые слова: ингибирование чувства кворума, коммуникация бактерий, противомикробные агенты **DOI:** 10.31857/S0132342319060058

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Полный текст статьи печатается в английской версии журнала.

<sup>&</sup>lt;sup>#</sup>Автор для связи: (тел.: +91 (989) 708-89-10; эл. почта: aasif321@gmail.com).



## ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ СЕКВЕСТОСОМЫ-1/р62 НА АУТОФАГИЮ ФИБРОБЛАСТОВ НАДКОСТНИЦЫ ЗУБА ЧЕЛОВЕКА, ВЫЗВАННУЮ *Porphyromonas gingivalis*<sup>1</sup>

© 2020 Han Su<sup>\*, \*\*</sup>, Yibo Zhang<sup>\*\*\*</sup>, Yongju Chen<sup>\*, \*\*</sup>, Bingjun Fan<sup>\*, \*\*</sup>, Bo Hao<sup>\*\*\*\*</sup>, and Xin Li<sup>\*\*,#</sup>

\*School of Stomatology, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning, 121000 China \*\*The Second Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning, 121000 China \*\*\*Department of Pathogeny Biology, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning, 121000 China \*\*\*93263 Troops of the Chinese People's Liberation Army, Jinzhou, Liaoning, 121012 China Поступила в редакцию 18.03.2019 г. После доработки 10.04.2019 г.

После доработки 10.04.2019 г. Принята к публикации 27.05.2019 г.

*Porphyromonas gingivalis* является основным патогеном при воспалении периодонта. Цель нашего исследования состояла в анализе влияния белка p62 на аутофагию фибробластов надкостницы зуба человека (ФНЗЧ), вызванную *P. gingivalis*. Клетки ФНЗЧ инфицировали *P. gingivalis*; затем уровни аутофагии и экспрессии p62 наблюдали в разные промежутки времени (0, 12, 18 и 24 ч), чтобы обнаружить взаимосвязь между p62 и аутофагией во времени. Аутофагию и апоптоз клеток ФНЗЧ, инфицированных *P. gingivalis*, детектировали с помощью миРНК, подавляющей экспрессию p62. Флуоресцентная и электронная микроскопия показали наличие аутофагичных вакуолей в клетках ФНЗЧ, инфицированных *P. gingivalis*. Иммуноблоттинг показал, что экспрессия p62 подавлялась миРНК по сравнению с контролем; соотношение LC3-II/LC3-I значительно уменьшалось, тогда как уровень экспрессии каспазы-3 значительно повышался. Анализ выживаемости клеток ССК-8 показал, что подавление экспрессии p62 снижало выживаемость *P. gingivalis* в ФНЗЧ. Таким образом, исследования *in vitro* показали, что присутствие p62 выгодно для поддержания уровня аутофагии в ФНЗЧ, вызванной *P. gingivalis*, и ингибирования апоптоза. p62 облегчает удаление инвазивных *P. gingivalis*.

*Ключевые слова: Porphyromonas gingivalis, аутофагия, p62, миРНК, LC3, anonmos* **DOI:** 10.31857/S0132342319060216

<sup>1</sup> Полный текст статьи печатается в английской версии журнала.

<sup>&</sup>lt;sup>#</sup> Автор для связи: эл. почта: httplixin@163.com.



УДК 547.917

## АМФИФИЛЬНЫЕ КАТИОННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ β-ЦИКЛОДЕКСТРИНА, СОДЕРЖАЩИЕ ОСТАТКИ 2-(4-ИЗОБУТИЛФЕНИЛ)- И 2-(3-БЕНЗОИЛФЕНИЛ)ПРОПИОНОЙ КИСЛОТЫ

© 2020 г. М.А. Маленковская\*, Д.А. Шипилов\*, #, М.К. Грачев\*

\*Московский педагогический государственный университет, Институт биологии и химии Россия, 129164, Москва, ул. Кибальчича 6/2 Поступила в редакцию 08.07.2019 г. После доработки 29.07.2019 г. Принята к публикации 27.08.2019 г.

Предложен синтез амфифильных катионных производных β-циклодекстрина, содержащих остатки некоторых фармакологически важных кислот, присоединенные на "ножке" разной длины по первичным гидроксильным группам. При этом гидрофобные фрагменты пальмитиновой кислоты находятся как по первичным, так и по вторичным группам.

Ключевые слова:  $\beta$ -циклодекстрин, амфифильные катионные производные, регионаправленный синтез, спектроскопия ЯМР  $^{1}$ Н и  $^{13}$ С

DOI: 10.31857/S0132342320010042

Ковалентное присоединение лекарственного соединения к циклодекстрину (конъюгирование) в ряду случаев дает возможность получать препараты пролонгированного и целенаправленного действия (targeting drug delivery) [1-7]. В ряду производных циклодекстринов (рис. 1) особое внимание уделяется его амфифильным соединениям, содержащим ковалентно связанные с первичными гидроксильными группами циклодекстрина гидрофобные фрагменты [8]. В медицинском аспекте важно, что конъюгирование (то есть ковалентное связывание) амфифильных циклодекстринов с лекарственными соединениями может приводить к повышению их способности проходить биологические барьеры, например гематоэнцефалический [9]. Поэтому, с целью создания фрагментов, близких по строению и природе находящейся в мембранах клетки липидной матрицы, были получены первые представители нового класса амфифильных циклодекстринов – β-циклодекстрин, ковалентно связанный с холестерином [9–11], фосфолипидоциклодекстрины [9–12], а также амфифильные производные α-циклодекстрина, содержащие остатки некоторых фармакологически важных кислот [13].

Другая группа производных циклодекстринов представляет собой их катионные соединения, несущие положительный заряд на циклодекстриновой матрице. Благодаря повышенной растворимости и положительному заряду алкиламмониевые ("заряженные") амфифильные циклодекстрины могут встраиваться и проникать через биологические барьеры, а также служить переносчиками для доставки (векторизации) ДНК при генной терапии [8]. Такие амфифильные катионные циклодекстрины, как гептакис[2-(шамино-олигоэтиленгликоль)-6-дезокси-6гексилтио]-β-циклодекстрин и гептакис[2-(ωамино-олигоэтиленгликоль)-6-дезокси-6-гексадецилтио]-β-циклодекстрин оценивали на предмет конденсации с плазмидной ДНК и трансфекции клеток [14]. Эти производные могут самоорганизовываться в катионные везикулы или наночастицы и, в отличие от их амфифильных неаминированных аналогов, образуют липоплексы с ДНК, которые эффективно трансфицируют клетки COS-7.

Кроме этого известно, что для структур на основе циклодекстринов эффективность доставки лекарств в биологических системах может быть повышена регулированием длины спейсера, соединяющего циклодекстрин и остаток лекарственного средства, за счет лучшего встраивания в липидную матрицу (так называемый "мембранный якорь"), что вызывает еt меньшие структурные изменения [9, 11].

Цель настоящей работы заключается в синтезе амфифильных катионных производных  $\beta$ -циклодекстрина, содержащих присоединенные на "ножке" (линкере) разной длины остатки некоторых фармакологически важных кис-

<sup>&</sup>lt;sup>#</sup> Автор для связи: (тел.: +7 (495) 682-02-45; эл. почта: shda90@mail.ru).



Рис. 1. Структурная формула циклодекстринов.

лот: 2-(4-изобутилфенил)пропионовой кислоты (HO–Y) (лекарственное соединение препарата "Ибупрофен") и 2-(3-бензоилфенил)пропионовой кислоты (HO–Z) (лекарственное соединение препарата "Кетопрофен"). В качестве линкеров разной длины были выбраны остатки 2-(диметиламино)этанола, 3-(диметиламино)пропан-1ола и 2-(метиламино)этанола. Ранее мы показали принципиальную возможность получения такого рода катионных производных [15]. Преимущества предложенной нами схемы синтеза заключаются в отсутствии необходимости постановки на вторичные гидроксильные группы защит и последующего их удаления. Исходные катионные производные (I)–(IV) (рис. 2) получены, как описано нами в работе [16] алкилированием 6-монойод-6-дезокси-β-циклодекстрина и терминального диметиламиноалкиленпроизводного, несущего остаток лекарственного средства.

Для получения амфифильных катионных производных (V)–(VIII), содержащих гидрофобный остаток пальмитиновой кислоты при первичных гидроксильных группах, катионные производные (I)–(IV) мы обрабатывали 3.3 моль-экв. хлорангидрида пальмитиновой кислоты (IX) в DMF в присутствии триэтиламина в условиях регионаправленного ацилирования, приведенных нами в работе [17] (схема 1).



Схема 1. Получение амфифильных производных с гидрофобными фрагментами пальмитиновой кислоты по первичным гидроксильным группам β-циклодекстрина.



Степень замещения определяли, сравнивая интегральные интенсивности сигналов метильных протонов в спектрах ЯМР <sup>1</sup>Н ( $\delta$  0.80–0.81 м.д.) и сигналов циклодекстриновых протонов H2–H6 ( $\delta$  3.25–3.70 м.д.). Как и ранее [13, 18, 19], ацилирование в этих условиях проходило только по первичным гидроксильным группам, что подтверждают данные ЯМР <sup>13</sup>С. В спектрах ЯМР <sup>13</sup>С соединений (V)–(VIII) присутствуют сигналы ядер незамещенных атомов С6 при  $\delta$  60.4 м.д. и характерный [18–23] слабопольный сигнал ядер Сб' и Сб", СН<sub>2</sub>-групп, замещенных ацильными остатками, при  $\delta$  63.8 м.д. Смещения сигналов ядер С2 и С3 не наблюдалось, т.е. вторичные гидроксильные группы при ацилировании не затрагивались.

На следующем этапе нашей работы мы получили амфифильные катионные производные (Х)-

(XIII), содержащие гидрофобный остаток пальмитиновой кислоты при вторичных гидроксильных группах (схема 2). Для этого мы использовали схему синтеза, основанную на депротонировании вторичных гидроксильных групп в положении С2 гидридом натрия. Гидроксигруппы при С2 циклодекстринового остова имеют большую кислотность вследствие стабилизации гидроксил-аниона водородной связью с гидроксильной группой при СЗ, а также из-за электроноакцепторного влияния ацетальной функции [24]. Соединения (I)-(IV) в присутствии гидрида натрия в диметилформамиде по стандартной схеме [25] регионаправленно ацилировали 3.3 моль-экв. хлорангидрида пальмитиновой кислоты (ІХ) по вторичным гидроксильным группам с образованием соответствующих производных (**X**)–(**XIII**) с ацильными группами при C2.



Схема 2. Получение амфифильных производных с гидрофобными фрагментами пальмитиновой кислоты на стороне вторичных гидроксильных групп β-циклодекстрина.

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 46 № 1 2020

Степень замещения остатком пальмитиновой кислоты у соединений (**X**)–(**XIII**) определяли из анализа спектров ЯМР <sup>1</sup>Н, а регионаправленность замещения пальмитиновой кислотой по вторичным гидроксильным группам подтверждали, как описано выше для соединений (**V**)–(**VIII**). Замещение остатком кислоты вторичных гидроксильных групп при C2 устанавливали с помощью ЯМР <sup>13</sup>С. В спектрах соединений (**X**)–(**XIII**) наблюдали сигналы ядер атомов C2 с незамещенной гидроксильный сигнал ядер атомов C2 с, замещенных остатком пальмитиновой кислоты, при  $\delta$  69.4 м.д.

Таким образом, нами предложены новые пути синтеза амфифильных катионных производных β-циклодекстрина, содержащих остатки фармакологически важных ароматических монокарбоновых кислот и гидрофобные фрагменты пальмитиновой кислоты по первичным или вторичным гидроксильным группам. Такие производные могут представлять интерес для медико-биологических исследований в разных направлениях.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР <sup>1</sup>Н и <sup>13</sup>С ( $\delta$ , м.д.; *J*, Гц) регистрировали на приборе JEOL ECX-400 на частоте 399.78 и 100.53 МГц, соответственно. Химические сдвиги <sup>1</sup>Н и <sup>13</sup>С приведены относительно сигнала SiMe<sub>4</sub>, растворитель – DMSO-*d*<sub>6</sub>. Элементный анализ выполнен на приборе "FlashEA 1112HT". Для TCX применяли алюминиевые пластинки с закрепленным слоем силикагеля (Silufol UV-254), элюент: хлороформ–метанол, 3 : 1. В работе использовали β-циклодекстрин фирмы "Wacker" (США).

6-О-Пальмитоил-6-[(2-{2-[4-(изобутил)фенил]пропионилокси}этил)(диметил)аммонио]-6-дезокси**β-циклодекстриниодид (V).** К раствору 1.00 г (0.65 ммоль) соединения (I) в 20 мл DMF в присутствии 0.20 г (1.97 ммоль) триэтиламина при перемешивании в течение 15 мин при 0°С прибавляли раствор 0.60 г (2.17 ммоль) хлорангидрида пальмитиновой кислоты (ІХ) в 10 мл бензола, перемешивали и выдерживали 10 ч при 20°С. Раствор концентрировали до 2 мл и выливали в 30 мл диэтилового эфира. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали диэтиловым эфиром (3 × 5 мл), сушили, растирали с 20 мл гексана, отфильтровывали, остаток промывали гексаном (3 × 2 мл) и сушили в вакууме (1 мм рт. ст.) 5 ч при 80°С. Выход 0.65 г (56%), т. пл. 350°С (разл.), R<sub>f</sub> 0.89. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н: 0.80 м [9Н, СН<sub>2</sub>С<u>Н</u><sub>3</sub>, СН(С<u>Н</u><sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 1.19 м [22H, (С<u>Н</u><sub>2</sub>)<sub>11</sub>СН<sub>3</sub>], 1.28 м [2H, С<u>H</u><sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>3</sub>], 1.32 д (3H, CHC<u>H</u><sub>3</sub>, *J* 7.0), 1.44 м [2H, C<u>H</u><sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>CH<sub>3</sub>], 1.75 м [1H, C<u>H</u>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 2.16 уш. с [6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 2.27 м [2H, C<u>H</u><sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CH<sub>3</sub>],

2.34 д (2H, CHCH<sub>2</sub>, J 7.3), 2.47 м (2H, NCH<sub>2</sub>), 3.25-3.71 м [43H, H2-H5, C6H<sub>2</sub>, CHC(O)], 4.32 м (2H, OCH<sub>2</sub>), 4.45 ym. c (5H, C6OH), 4.78 c (7H, H1), 5.70 уш. с (14Н, С2ОН, СЗОН), 7.06 д (2Н, м-СН, J7.8), 7.13 д (2H. o-CH. J 8.0). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С: 14.5 19.0 (CH<u>C</u>H<sub>3</sub>), 22.6  $[CH(\underline{CH}_3)_2,$  $(CH_2CH_3),$  $CH_2CH_3$ ], 24.9 [ $CH_2(CH_2)_{12}CH_3$ ], 28.7–29.5, 31.8, 34.2  $[(\underline{CH}_2)_{11}CH_2CH_3]$ , 30.1  $(\underline{CH}(CH_3)_2)$ , 33.7 [CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CH<sub>3</sub>], 44.6 (CHC(O)), 44.7 (CH<sub>2</sub>), 45.1 [N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 57.1 (NCH<sub>2</sub>), 60.4 (C6), 62.0 (OCH<sub>2</sub>), 63.8 (C6'), 72.5 (C5), 73.0 (C2), 73.6 (C3), 82.0 (C4), 102.1 (C1), 127.6 (м-CH), 129.5 (о-CH), 138.3 [ArC<sup>unco</sup>C(O)], 140.3 (n-CH), 174.4 (CH<sub>2</sub>C=O), 175.0 (C=O). Haŭдено, %: С 51.43; Н 7.09; N 0.83. С<sub>75</sub>Н<sub>126</sub>INO<sub>37</sub>. Вычислено, %: С 51.16; Н 7.21; N 0.80.

#### Соединения (VI)-(VIII) получены аналогично.

6-О-Пальмитоил-6-[(3-{2-[4-(изобутил)фенил]пропионилокси}пропил)(диметил)аммонио]-6дезокси-β-циклодекстриниодид (VI) получен из 1.00 г (0.65 ммоль) соединения (II) в 20 мл DMF в присутствии 0.20 г (1.95 ммоль) триэтиламина и 0.59 г (2.15 ммоль) хлорангидрида пальмитиновой кислоты (IX). Выход 0.58 г (50%), т. пл. 350°С (разл.), R<sub>c</sub> 0.88. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н: 0.80 м [9Н,  $CH_2CH_3$ ,  $CH(CH_3)_2$ ], 1.18 м [22H,  $(CH_2)_{11}CH_3$ ], 1.28 м [2H, CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>3</sub>], 1.32 д (3H, CHCH<sub>3</sub>), J7.0), 1.44 м [2H, CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>CH<sub>3</sub>], 1.63 м (2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.75 м [1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 2.13 уш. с [6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 2.23 м [2H, C<u>H</u><sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CH<sub>3</sub>], 2.35 д (2H, СНС<u>Н</u><sub>2</sub>, *J* 7.3), 3.25–3.65 м (42H, H2–H5, C6H<sub>2</sub>), 3.68 м (2H, NCH<sub>2</sub>), 3.76 м [1H, CHC(O)], 3.99 м (2H, OCH<sub>2</sub>), 4.45 viii. c (5H, C6OH), 4.79 c (7H, Н1), 5.70 уш. с (14Н, С2ОН, СЗОН), 7.06 д (2Н, м-CH, J 7.8), 7.13 д (2H, o-CH, J 8.0). Спектр ЯМР <sup>13</sup>C: 14.5 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 19.0 (CH<u>C</u>H<sub>3</sub>), 22.6 [CH(<u>C</u>H<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>], 24.9 [CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>CH<sub>3</sub>], 26.0 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28.7 - 29.5, 31.8, 34.2  $[(\underline{C}H_2)_{11}CH_2CH_3],$ 30.2  $(\underline{CH}(CH_3)_2)$ , 33.7  $[\underline{CH}_2(CH_2)_{13}CH_3]$ , 44.6  $(\underline{CHC}(O))$ , 44.7 (CH<sub>2</sub>), 44.8 [N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 55.3 (NCH<sub>2</sub>), 60.4 (C6), 62.0 (OCH<sub>2</sub>), 63.8 (C6'), 72.5 (C5), 72.9 (C2), 73.6 (C3), 82.0 (С4), 102.5 (С1), 127.6 (м-СН), 129.5 (о-СН),  $[Ar\underline{C}^{unco}C(O)],$ 138.4 140.3 (*n*-CH). 174.4 (CH<sub>2</sub><u>C</u>=O), 175.0 (C=O). Найдено, %: C 51.65; Н 7.15; N 0.83. С<sub>76</sub>Н<sub>128</sub>INO<sub>37</sub>. Вычислено, %: С 51.44; H 7.27; N 0.79.

**6-О-Пальмитоил-6-[{2-[2-(3-(бензоилфенил)** пропионилокси]этил} (диметил)аммонио]-6-дезокси- $\beta$ -циклодекстриниодид (VII) получен из 1.00 г (0.64 ммоль) соединения (III) в 20 мл DMF в присутствии 0.19 г (1.91 ммоль) триэтиламина и 0.58 г (2.10 ммоль) хлорангидрида пальмитиновой кислоты (IX). Выход 0.60 г (52%), т. пл. 350°С (разл.),  $R_f$ 0.88. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н: 0.80 м (3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.19 м [22H, (CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>3</sub>], 1.27 м [2H, CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>3</sub>], 1.37 д (3H, CHCH<sub>3</sub>, J 7.0), 1.44 м [2H, С<u>H</u><sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>CH<sub>3</sub>], 2.05 уш. с [6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 2.26 м [2H, CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CH<sub>3</sub>], 2.40 м (2H, NCH<sub>2</sub>), 3.26-3.70 м (42H, H2–H5, C6H<sub>2</sub>), 3.91 м (1H, CHCH<sub>3</sub>), 4.07 м (2H, OCH<sub>2</sub>), 4.47 уш. с (5H, C6OH), 4.79 с (7Н, Н1), 5.71 уш. с (14Н, С2ОН, СЗОН), 7.53–7.70 м (9H, Ar). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С: 14.5 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 19.0  $(CHCH_3)$ , 22.6  $(CH_2CH_3)$ , 24.9  $[CH_2(CH_2)_{12}CH_3]$ , 28.7-29.5, 31.8, 34.2  $[(\underline{C}H_2)_{11}CH_2CH_3],$ 33.7  $[CH_2(CH_2)_{13}CH_3], 44.8 (CHC(O)), 45.6 [N(CH_3)_2],$ 57.5 (NCH<sub>2</sub>), 60.4 (C6), 62.8 (OCH<sub>2</sub>), 63.8 (C6'), 72.5 (C5), 72.9 (C2), 73.6 (C3), 82.0 (C4), 102.5 (C1), 128.8–140.8 (Ar), 174.0 (CH<sub>2</sub>C=O), 175.0 (C=O), 196.2 (PhC=O). Найдено, %: С 51.53; Н 6.92; N 0.81. С<sub>78</sub>Н<sub>122</sub>INO<sub>38</sub>. Вычислено, %: С 51.80; Н 6.80; N 0.77.

6-О-Пальмитоил-6-[{3-[2-(3-(бензоилфенил) пропионилокси]пропил}(диметил)аммонио]-6-дезокси-β-циклодекстриниодид (VIII) получен из 1.00 г (0.63 ммоль) соединения (IV) в 20 мл DMF в присутствии 0.19 г (1.89 ммоль) триэтиламина и 0.57 г (2.08 ммоль) хлорангидрида пальмитиновой кислоты (IX). Выход 0.55 г (48%), т. пл. 350°С (разл.), *R*<sub>f</sub>0.88. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н: 0.81 м (3H, CH<sub>2</sub>C<u>H<sub>3</sub></u>), 1.19 м [22H, (C<u>H</u><sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>3</sub>], 1.27 м [2H, C<u>H</u><sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>3</sub>], 1.37 д (3H, CHC<u>H</u><sub>3</sub>, J 7.0), 1.44 м [2H, С<u>H</u><sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>CH<sub>3</sub>], 1.60 м (2H, NCH<sub>2</sub>C<u>H<sub>2</sub></u>), 2.01 уш. с [6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 2.26 м [2H, C<u>H</u><sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CH<sub>3</sub>], 3.26-3.70 м (42H, H2–H5, C6H<sub>2</sub>), 3.68 м (2H, NCH<sub>2</sub>), 3.99 м (1H, C<u>H</u>CH<sub>3</sub>), 4.02 м (2H, OCH<sub>2</sub>), 4.47 уш. с (5Н, С6ОН), 4.79 с (7Н, Н1), 5.71 уш. с (14Н, С2ОН, C3OH), 7.53-7.70 м (9H, Ar). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С: 14.5  $(CH_2CH_3)$ , 18.8  $(CHCH_3)$ , 22.6  $(CH_2CH_3)$ , 24.9  $[CH_2(CH_2)_{12}CH_3]$ , 26.4 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28.7–29.5, 31.8, 34.2  $[(\underline{CH}_2)_{11}CH_2CH_3]$ , 33.7  $[C\underline{H}_2(CH_2)_{13}CH_3]$ , 44.8 (<u>C</u>HC(O)), 45.3 [N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 55.6 (NCH<sub>2</sub>), 60.4 (C6), 63.1 (OCH<sub>2</sub>), 63.8 (C6'), 72.5 (C5), 72.9 (C2), 73.6 (C3), 82.0 (C4), 102.5 (C1), 128.8-140.8 (Ar), 174.0 (CH<sub>2</sub>C=O), 175.0 (C=O), 196.2 (PhC=O). Найдено, %: С 52.31; Н 6.75; N 0.73. С<sub>79</sub>Н<sub>124</sub>INO<sub>38</sub>. Вычислено, %: С 52.06; Н 6.86; N 0.77.

2-О-Пальмитоил-6-[(2-{2-[4-(изобутил)фенил]пропионилокси}этил)(диметил)аммонио]-6-дез**окси-β-циклодекстриниодид (Х).** К раствору 1.00 г (0.66 ммоль) соединения (I) в 20 мл DMF при перемешивании прибавляли 0.1214 г (5.06 ммоль) гидрида натрия. Через 1 ч по каплям прибавляли раствор 1.26 г (4.60 ммоль) хлорангидрида пальмитиновой кислоты (IX) в 20 мл DMF, перемешивали и выдерживали 24 ч при 20°С. К полученному раствору прибавляли 2 мл метилового спирта и выливали в 40 мл ацетона. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали 5 мл воды, сушили, растирали с 10 мл гексана, отфильтровывали, остаток промывали гексаном (3 × 2 мл) и сушили в вакууме (1 мм рт. ст.) 5 ч при 80°С. Выход 0.56 г (48%), т. пл. 350°С (разл.), R<sub>f</sub> 0.85. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н: 0.80 м [9H, CH<sub>2</sub>C<u>H<sub>3</sub></u>, CH(C<u>H<sub>3</sub></u>)<sub>2</sub>], 1.19 м [22H, (CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>3</sub>], 1.28 м [2H, CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>3</sub>], 1.32 д (3H, CHCH<sub>3</sub>, J 7.0), 1.44 м [2H, CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>CH<sub>3</sub>], 1.75 м [1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 2.15 уш. с [6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 2.27 м [2H, CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CH<sub>3</sub>], 2.36 д (2H, CHCH<sub>2</sub>, J7.3), 2.55 м (2H, NCH<sub>2</sub>), 3.25–3.65 м (42H, H2– Н5, С6Н<sub>2</sub>), 3.71 м [СНС(О)], 4.08 м (2Н, ОСН<sub>2</sub>), 4.47 уш. с (6Н, С6ОН), 4.79 с (7Н, Н1), 5.71 уш. с (13Н, С2ОН, СЗОН), 7.06 д (2Н, м-СН, J7.8), 7.13 д (2H, *o*-CH, *J* 8.0). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С: 14.5 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 19.0 (CHCH<sub>3</sub>), 22.7 [CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>], 24.8  $[\underline{C}H_{2}(CH_{2})_{12}CH_{3}],$ 28.7 - 29.5, 31.8, 34.2  $[(\underline{C}H_2)_{11}CH_2CH_3],$ 30.1  $(\underline{CH}(CH_3)_2),$ 33.8 [CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CH<sub>3</sub>], 44.6 (<u>C</u>HC(O)), 44.7 (CH<sub>2</sub>), 45.1 [N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 57.1 (NCH<sub>2</sub>), 60.3 (C6), 62.1 (OCH<sub>2</sub>), 63.8 (C6'), 69.4 (C2'), 72.5 (C5), 72.9 (C2), 73.6 (C3), 82.0 (C4), 102.5 (C1), 127.6 (м-CH), 129.6 (о-CH), 138.3 [ArC<sup>unco</sup>C(O)], 140.3 (n-CH), 174.4 (CH<sub>2</sub>C=O), 176.2 (C=O). Найдено, %: С 50.89; Н 7.32; N 0.84. С<sub>75</sub>Н<sub>126</sub>INO<sub>37</sub>. Вычислено, %: С 51.16; Н 7.21; N 0.80.

#### Соединения (XI)-(XIII) получены аналогично.

2-О-Пальмитоил-6-[(3-{2-[4-(изобутил)фенил]пропионилокси}пропил)(диметил)аммонио]-6-дезокси-β-циклодекстриниодид (XI) получен из 1.00 г (0.65 ммоль) соединения (II) в 20 мл DMF в присутствии 0.1203 г (5.01 ммоль) гидрида натрия и 1.25 г (4.56 ммоль) хлорангидрида пальмитиновой кислоты (IX). Выход 0.53 г (46%), т. пл. 350°С (разл.), R<sub>f</sub> 0.88. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н: 0.80 м [9Н,  $CH_2CH_3$ ,  $CH(CH_3)_2$ ], 1.16 M [22H,  $(CH_2)_{11}CH_3$ ], 1.27 м [2H, CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>3</sub>], 1.32 д (3H, CHCH<sub>3</sub>, J7.0), 1.43 м [2H, C<u>H</u><sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>CH<sub>3</sub>], 1.63 м (2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.74 м [1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 2.13 уш. с [6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 2.25 м [2H, C<u>H</u><sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CH<sub>3</sub>], 2.33 д (2H, СНС<u>Н</u><sub>2</sub>, *J* 7.3), 3.25–3.65 м (44H, H2–H5, C6H<sub>2</sub>, NCH<sub>2</sub>), 3.76 м [CHC(O)], 4.00 м (2H, OCH<sub>2</sub>), 4.45 уш. с (6Н, С6ОН), 4.79 с (7Н, Н1), 5.70 уш. с (13Н, С<sub>2</sub>ОН, СЗОН), 7.06 д (2Н, *м*-СН, *J* 7.8), 7.13 д (2Н, о-СН, J 7.0). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С: 14.4 (СН<sub>2</sub><u>С</u>Н<sub>3</sub>), 19.0  $(CH\underline{CH}_3),$ 22.6  $[CH(\underline{C}H_3)_2,$  $CH_2CH_3],$ 24.9[CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>CH<sub>3</sub>], 25.8 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28.6–29.5, 31.8, 34.2  $[(\underline{C}H_2)_{11}CH_2CH_3],$ 30.1 (<u>CH(CH\_3)</u>), 33.7  $[CH_2(CH_2)_{13}CH_3], 43.8 (CHC(O)), 44.7 [N(CH_3)_2],$ 45.4 (CH<sub>2</sub>), 55.3 (NCH<sub>2</sub>), 60.2 (C6), 62.6 (OCH<sub>2</sub>), 63.8 (C6'), 69.4 (C2'), 72.4 (C5), 72.9 (C2), 73.5 (C3), 82.0 (С4), 102.5 (С1), 127.6 (м-СН), 129.6 (о-СН),  $[Ar\underline{C}^{unco}C(O)],$ 138.4 140.4 (*n*-CH), 174.5 (CH<sub>2</sub>C=O), 176.9 (C=O). Найдено, %: С 51.59; Н 7.18; N 0.82. С<sub>76</sub>Н<sub>128</sub>INO<sub>37</sub>. Вычислено, %: С 51.44; H 7.27; N 0.79.

**2-О-Пальмитоил-6-[{2-[2-(3-(бензоилфенил)пропионилокси]этил}(диметил)аммонио]-6-дезокси-β-циклодекстриниодид (XII)** получен аналогично соединению из 1.00 г (0.64 ммоль) соединения (III) в 20 мл DMF в присутствии 0.1177 г (4.90 ммоль) гидрида натрия и 1.23 г (4.46 ммоль) хлорангидрида пальмитиновой кислоты (IX). Выход 0.51 г (44%), т. пл. 350°С (разл.), R<sub>f</sub> 0.88. Спектр ЯМР<sup>1</sup>Н: 0.82 м (3Н, CH<sub>2</sub>C<u>H<sub>3</sub></u>), 1.21 м [22H, (С<u>Н</u><sub>2</sub>)<sub>11</sub>СН<sub>3</sub>], 1.27 м [2H, С<u>Н</u><sub>2</sub>(СН<sub>2</sub>)<sub>11</sub>СН<sub>3</sub>], 1.37 д (3H, CHCH<sub>3</sub>, J 7.0), 1.60 м [2H, CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>CH<sub>3</sub>], 2.03 уш. с [6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 2.25 м [2H, С<u>H</u><sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CH<sub>3</sub>], 2.40 м (2H, NCH<sub>2</sub>), 3.26–3.70 м (42H, H2–H5, C6H<sub>2</sub>), 3.91 м (1H, C<u>H</u>CH<sub>3</sub>), 4.07 м (2H, OCH<sub>2</sub>), 4.47 ym. c (6H, C6OH), 4.79 c (7H, H1), 5.71 уш. с (13Н, С2ОН, СЗОН), 7.53–7.70 м (9Н, Аг). Спектр ЯМР<sup>13</sup>С: 14.5 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 19.0 (CHCH<sub>3</sub>), 22.6 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 24.9 [CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>CH<sub>3</sub>], 28.7–29.5, 31.8, 34.2 [(<u>CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>], 33.7 [CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CH<sub>3</sub>], 44.8</u> (<u>CHC(O)</u>), 45.7 [N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 57.5 (NCH<sub>2</sub>), 60.4 (C6), 62.9 (OCH<sub>2</sub>), 63.8 (C6'), 69.4 (C2'), 72.5 (C5), 72.9 (C2), 73.6 (C3), 82.1 (C4), 102.5 (C1), 128.8-140.8 (Ar), 174.0 (CH<sub>2</sub><u>C</u>=O), 175.0 (C=O), 196.1 (Ph<u>C</u>=O). Найдено, %: С 52.02; Н 6.69; N 0.73. С<sub>78</sub>Н<sub>122</sub>INO<sub>38</sub>. Вычислено, %: С 51.80; Н 6.80; N 0.77.

2-О-Пальмитоил-6-[{3-[2-(3-(бензоилфенил)пропионилокси]пропил}(диметил)аммонио]-6дезокси-**β-циклодекстриниодид (XIII)** получен аналогично соединению из 1.00 г (0.63 ммоль) соединения (IV) в 20 мл DMF в присутствии 0.1166 г (4.86 ммоль) гидрида натрия и 1.21 г (4.42 ммоль) хлорангидрида пальмитиновой кислоты (IX). Выход 0.47 г (41%), т. пл. 350°С (разл.), R<sub>f</sub> 0.88. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 0.80 м (3Н, СH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.18 м [22H, (CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>3</sub>], 1.27 м [2H, С<u>H</u><sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>3</sub>], 1.37 д (3H, CHC<u>H</u><sub>3</sub>, *J* 7.0), 1.44 м [2H, C<u>H</u><sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>CH<sub>3</sub>], 1.60 м (2H, NCH<sub>2</sub>C<u>H</u><sub>2</sub>), 2.02 уш. с [6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 2.26 м [2H, C<u>H</u><sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CH<sub>3</sub>], 3.26-3.70 м (42Н, Н2-Н5, С6Н<sub>2</sub>), 3.68 м (2Н, NCH<sub>2</sub>), 3.99 м (1H, C<u>H</u>CH<sub>3</sub>), 4.02 м (2H, OCH<sub>2</sub>), 4.47 уш. с (6Н, С6ОН), 4.79 с (7Н, Н1), 5.71 уш. с (13H, C2OH, C3OH), 7.53-7.70 м (9H, Ar). Спектр **MMP**  $^{13}C$ : 14.5 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 18.8 (CH<u>C</u>H<sub>3</sub>), 22.6 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 24.9 [CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>CH<sub>3</sub>], 26.4 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28.7–29.5, 31.8, 34.2  $[(\underline{C}H_2)_{11}CH_2CH_3]$ , 33.8  $[CH_2(CH_2)_{13}CH_3], 44.8 (CHC(O)), 45.3 [N(CH_3)_2],$ 55.7 (NCH<sub>2</sub>), 60.4 (C6), 63.1 (OCH<sub>2</sub>), 63.8 (C6'), 69.4 (C2'), 72.5 (C5), 72.9 (C2), 73.6 (C3), 82.1 (C4), 102.5 (C1), 128.8–140.8 (Ar), 174.0 (CH<sub>2</sub>C=O), 175.0 (C=O), 196.1 (Ph<u>C</u>=O). Найдено, %: С 52.29; Н 6.76; N 0.72. С<sub>79</sub>Н<sub>124</sub>INO<sub>38</sub>. Вычислено, %: С 52.06; H 6.86; N 0.77.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-03-00444).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Parrot-Lopez H., Djedaïni F., Perly B., Coleman A.W., Galons H., Miocque M. // Tetrahedron Lett. 1990. V. 31. P. 1999.
- Djedaïni-Pilard F., Désalos J., Perly B. // Tetrahedron Lett. 1993. V. 34. P. 2457.
- Hristova-Kazmierski M.K., Horan P., Davis P., Yamamura H.I., Kramer T., Horvath R., Kazmierski W.M., Porreca F., Hruby V.J. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1993. V. 3. P. 831.
- 4. Uekama K., Minami K., Hirayama F. // J. Med. Chem. 1997. V. 40. P. 2755.
- Minami K., Hirayama F., Uekama K. // J. Pharm. Sci. 1998. V. 87. P. 715.
- Uekama K., Hirayama F., Irie T. // Chem. Rev. 1998. V. 98. P. 2045.
- Tavornvipas S., Arima H., Hirayama F., Uekama K., Ishiguro T., Oka M., Hamayasu K., Hashimoto H. // J. Inclusion Phenom. Macr. Chem. 2002. V. 44. P. 391.
- Cyclodextrins in Pharmaceutics, Cosmetics, and Biomedicine: Current and Future Industrial Applications / Ed. by Bilensoy E., Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2011. 395 p.
- 9. Perly B., Moutard S., Djedaïni-Pilard F. // PharmaChem: Fine, Specialty & Performance Chemicals. 2005. V. 4. P. 4–9.
- Javierre I., Nedyalkov M., Petkova V., Benattar J.-J., Weisse S., Auzely-Velty R., Djedaïni-Pilard F., Perly B. // J. Colloid Interface Sci. 2002. V. 254. P. 120.
- Moutard S., Perly B., Gode P., Demailly G., Djedaïni-Pilard F. // J. Incl. Phen. Macrocycl. Chem. 2002. V. 44. P. 317–322.
- 12. Грачев М.К., Сипин С.В., Кононов Л.О., Нифантьев Э.Е. // Изв. АН. Сер. хим. 2009. С. 221.
- Грачев М.К., Едунов А.В., Курочкина Г.И., Соболева Н.О., Васянина Л.К., Нифантьев Э.Е. // Изв. АН. Сер. хим. 2012. С. 178.
- Cryan S.A., Donohue R., Ravoo B.J., Darcy R., O'Driscoll C.M. // J. Drug Deliv. Sci. Technol., 2004. V. 14. P. 57–62.
- Грачев М.К., Чараев А.А., Курочкина Г.И., Васянина Л.К., Шмелёва В.Н., Нифантьев Э.Е. // Журн. общ. химии, 2010. Т. 80. С. 1494–1500. [Grachev M.K., Charaev A.A., Kurochkina G.I., Vasyanina L.K., Shmelev V. N., Nifant'ev E.E. // Russ. J. Gen. Chem. 2010. V. 80. P. 1812–1818.
- Шипилов Д.А., Маленковская М.А., Кутяшева Н.В., Курочкина Г.И., Сергиевич А.А., Грачев М.К. // Изв. АН. Сер. хим. 2012. С. 862–866.

- Маленковская М.А., Грачев М.К., Левина И.И., Нифантьев Э.Е. // Журн. орган. химии. 2013. Т. 49. С. 1796–1801.
- Глазырин А.Е., Сырцев А.Н., Курочкина Г.И., Кононов Л.О., Грачев М.К., Нифантьев Э.Е. // Изв. АН. Сер. хим. 2003. С. 225.
- 19. Грачев М.К., Едунов А.В., Курочкина Г.И., Попков А.В., Левина И.И., Нифантьев Э.Е. // Журн. орган. химии. 2011. Т. 41. С. 290.
- Грачев М.К., Едунов А.В., Курочкина Г.И., Левина И.И., Нифантьев Э.Е. // Журн. общ. химии. 2011. Т. 81. С. 222.
- 21. Takeo K., Mitoh H., Uemura K. // Carbohydr. Res. 1989. V. 187. P. 203.
- 22. Baer H.H., Shen Ya., González F.S., Berenguel A.V., García J.I. // Carbohydr. Res. 1992. V. 235. P. 129.
- 23. Hanessian S., Benalil A., Laferrière C. // J. Org. Chem. 1995. V. 60. P. 4786.
- 24. Menger F.A., Dulany M.A. // Tetrahedron Lett. 1985. V. 26. P. 267.
- 25. *Rong D., D'Souza V.T.* // Tetrahedron Lett. 1990. V. 31. P. 4275.

## Amphphilic Cationic Beta-Cyclodextrin Derivatives Containing 2-(4-Isobutylphenyl)and 2-(3-Benzoilphenyl) Propionic Acid Residues

M. A. Malenkovskaya\*, D. A. Shipilov\*, #, and M. K. Grachev\*

<sup>#</sup>Phone: +7 (495) 682-02-45; e-mail: shda90@mail.ru

\*Moscow State University of Education, Institute of Biology and Chemistry, ul. Kibalchicha 6/2, Moscow, 129164, Russia

In the present work the synthesis of amphiphilic cationic  $\beta$ -cyclodextrin derivatives containing residues of some pharmacologically important acids attached with the linker of different lengths on the side of primary hydroxyl groups is proposed. In this case, the hydrophobic fragments of palmitic acid are on both the primary and secondary groups.

Keywords:  $\beta$ -cyclodextrin, amphiphilic cationic  $\beta$ -cyclodextrin derivatives, region directed synthesis, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy



## ДИЗАЙН ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АГЕНТОВ НА ОСНОВЕ ХРОМОН-ПИРАЗОЛА<sup>1</sup>

© 2020 Marwa S. Salem<sup>\*, #</sup>, Eman A. E. El-Helw<sup>\*</sup>, and Hamed A. Y. Derbala<sup>\*</sup>

\*Chemistry Department, Faculty of Science, Ain Shams University, Abbasia, Cairo, 11566 Egypt Поступила в редакцию 03.04.2019 г. После доработки 30.08.2019 г.

Принята к публикации 16.09.2019 г.

Изучена химическая активность 4-((6-хлоро-4-окси-4*H*-хромен-3-ил)метилен)-2-фенилоксазол-5(4*H*)-она по отношению к соединениям, содержащим нуклеофильные атомы азота или серы, а также бидентатным нуклеофилам в различных условиях. Указанные реакции нуклеофилов приводят к образованию гетероциклических систем, а именно пиразолилоксазолонов, пиразолдигидротриазинонов, хромонилимидазолонов, хромонилимидазолов, а также хромонилбензо[*d*]имидазолов и хромонилоксатиазепинов. Все полученные вещества были исследованы на предмет их противоопухолевой активности по отношению к двум клеточным линиям, а именно рака толстой кишки (HCT-116) и молочной железы (MCF-7) человека, с помощью MTT-теста. Некоторые из изученных соединений показали исключительную активность по отношению к клеткам линий HCT-116 (IC<sub>50</sub> 7.74–82.49 мкг/мл) и MCF-7 (IC<sub>50</sub> 4.98–92.62 мкг/мл); для сравнения активность (IC<sub>50</sub>) стандартного противоопухолевого агента доксорубицина по отношению к этим линиям составляет 5.23 и 4.17 мкг/мл соответственно. Среди полученных соединений производные пиразолбензамида и пиразолдигидротриазинона проявили наиболее высокую противоопухолевую активность. Полученные соединения могут считаться перспективными противоопухолевыми агентами.

Ключевые слова: противоопухолевая активность, хроменопиррол, имидазолон, пиразол, триазинон, пиразолбензамид

DOI: 10.31857/S013234232001011X

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Полный текст статьи печатается в английской версии журнала.

<sup>&</sup>lt;sup>#</sup> Автор для связи: (эл. почта: marwa\_k@sci.asu.edu.eg).



## СИНТЕЗ, РЕАКЦИИ И АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ЦИКЛОПЕНТА[*d*]ТИЕНО[2,3-*b*]ПИРИДИНОВЫЙ ОСТАТОК И РОДСТВЕННЫЕ КОНДЕНСИРОВАННЫЕ ГЕТЕРОЦИКЛЫ<sup>1</sup>

© 2020 Remon M. Zaki<sup>\*, #</sup>, Adel M. Kamal El-Dean<sup>\*</sup>, Shaban M. Radwan<sup>\*</sup>, and Mahmoud A. Ammar<sup>\*</sup>

\*Chemistry Department, Faculty of Science, Assiut University, Assiut, 71516 Egypt Поступила в редакцию 07.07.2019 г. После доработки 29.07.2019 г. Принята к публикации 16.09.2019 г.

В работе описан простой метод синтеза новых 4-циано-1-морфолин-4-ил-6,7-дигидро-5*H*-циклопента[с]пиридин-3-тиона реакцией 3-амино-1-тиоксо-1,5,6,7-тетрагидроциклопента[с]тиопиран-4-карбонитрила с морфолином посредством перегруппировки Димрота. 1-Амино-5-морфолин-4ил-7,8-дигидро-6*H*-циклопента[*d*]тиено-[2,3-*b*]пиридин-2-карбоксамид, полученный двумя методами, использовали как универсальный прекурсор для синтеза новых тиенопиримидинов, конденсированных с циклопента[d]пиридиновой системой. Реакция аминокарбоксамида с диэтилмалонатом, триэтилортоформанатом и циклоалканонами позволила получить соответствующие конденсированные пиримидиновые гетероциклы. С другой стороны, обработка аминокарбоксамида хлороацетил хлоридом в диоксане позволило получить хлороацетиламино производное, которое в свою очередь претерпевало циклоконденсацию в реакции с уксусным ангидридом, образуя хлорометилпиримидинон. Последнее соединение использовали в реакции нуклеофильного замещения с различными азот-содержащими нуклеофилами для получения алкил- (арил-) аминометилпиримидинонов. Затем, обработка фениламинометил производного формальдегидом в условиях реакции Манниха приводила к образованию имидазопиридотиенопиримидиновой системы циклов. Сходным путем реакция фениламинометилпиримидинона с хлороацетил хлоридом позволила получить новую гетероциклическую систему, а именно, циклопентапиридотиенопиримидопиразин. С другой стороны, реакция аминокарбоксамида с дисульфидом углерода в пиридине приводила к образованию оксопиримидинтиона, который алкилировали различными α-галокарбонильными соединениями. Новые вещества были полностью охарактеризованы с помощью элементного анализа и спектральными методами. Некоторые из полученных соединений показали высокую антибактериальную и противогрибковую активности в экспериментах in vitro.

Ключевые слова: циклопентатиенопиридин, пиримидин, пиразин, имидазол, синтез, антимикробная активность

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Полный текст статьи печатается в английской версии журнала.

<sup>&</sup>lt;sup>#</sup>Автор для связи: (эл. почта: remon.asal2015@gmail.com; rasal@aun.edu.eg).



## ПРОСТОЙ СИНТЕЗ НОВЫХ ГИБРИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 2-ХИНОЛИНОНА — ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОТИВОРАКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ<sup>1</sup>

© 2020 Safyah B. Bakare<sup>#</sup>

Faculty of Education, Shaqra University, Al Muzahimiyah, KSA Поступила в редакцию 10.04.2019 г. После доработки 30.04.2019 г. Принята к публикации 26.06.2019 г.

Синтезирована серия новых гибридных производных 2-хинолинона; структуры полученных соединений подтверждены данными ИК, <sup>1</sup>Н и <sup>13</sup>С ЯМР спектроскопии и элементного анализа. Цитотоксическую активность гибридных 2-хинолинонов оценивали с помощью стандартного МТТ теста против линии клеток рака молочной железы человека МСF-7. По данным анализа селективности по отношению к стадии клеточного цикла 7-гидрокси-4-метил-3-бромо-2-оксо-1-(*р*-хлоробензоил)метилхинолина, данное соединение вызывает остановку клеточного цикла в S-фазе. Кроме того, это соединение показало высокую способность ингибировать топоизомеразу II с IC<sub>50</sub> в наномолярном диапазоне. Также это соединение проявило себя как умеренно активный ингибитор полимеризации  $\beta$ -тубулина в сравнении с комбретастатином A4.

Ключевые слова: хинолинон, цитотоксичность, анализ клеточного цикла, топоизомераза II, тубулин, комбретастатин A4

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Полный текст статьи печатается в английской версии журнала.

<sup>&</sup>lt;sup>#</sup>Автор для связи: эл. почта: safyahbakare@gmail.com.



## СИНТЕЗ И ОШЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ СТЕРОИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 5а,8а-ЭНДОПЕРОКСИДА С АРОМАТИЧЕСКИМИ ГИДРАЗОНАМИ В БОКОВОЙ ЦЕПИ В КАЧЕСТВЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АГЕНТОВ<sup>1</sup>

© 2020 H. J. Wang\*, M. Bu\*, #, J. Wang\*, L. Liu\*, and S. Zhang\*\*

\*College of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Qiqihar, 161006 China \*\*Basic Medical Science College, Qiqihar Medical University, Qiqihar, 161006 China Поступила в редакцию 29.04.2019 г. После доработки 25.05.2019 г. Принята к публикации 25.07.2019 г.

Получены 7 новых стероилных производных 5α.8α-эндопероксида с ароматическими гидразонами в боковой цепи. Структуры синтезированных производных подтверждены методами ИК, <sup>1</sup>Н и <sup>13</sup>С ЯМР, а также масс-спектрометрии. Противоопухолевую активность полученных соединений исследовали in vitro с помощью МТТ-теста. Среди новых соединений, 5α,8α-эпидиокси-17-(4-хлоробензилиден)-гидразоноандрост-3β-ол показал наибольшую активность против трех раковых клеточных линий человека (MCF-7, HepG2, SK-Hep1).

Ключевые слова: стероид, пероксид эргостерина, дегидроэпиандростерон, дигидразон, противоопухолевая активность

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Полный текст статьи печатается в английской версии журнала.

<sup>&</sup>lt;sup>#</sup>Автор для связи: эл. почта: buming@qmu.edu.cn.



## СИНТЕЗ И ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ГИБРИДНЫХ СУКЦИНИМИДОВ<sup>1</sup>

© 2020 Fatih Yılmaz\*, Emre Menteşe\*\*, #, and Nimet Baltaş\*\*

\*Vocational School of Technical Studies, Department of Chemistry and Chemical Processing Technology, Recep Tayyip Erdogan University, Rize, 53100 Turkey

\*\*Department of Chemistry, Faculty of Arts and Sciences, Recep Tayyip Erdogan University, Rize, 53100 Turkey Поступила в редакцию 13.03.2019 г.

После доработки 23.04.2019 г. Принята к публикации 17.06.2019 г.

В работе получена серия новых гибридных сукцинимидов, содержащих остатки изотиоцианата, кумарина, изатина и фурана; новые соединения исследованы с точки зрения их способности ингибировать α-глюкозидазу и антиоксидантной активности. По предварительным данным все гибридные молекулы являются хорошими ингибиторами α-глюкозидазы. Антиоксидантную активность гибридных молекул определяли с помощью методов оценки способности к восстановлению меди(II) (cupric reducing antioxidant capacity, CUPRAC) и железа(III) (ferric reducing antioxidant power, FRAP). Также радикал-улавливающая активность полученных соединений оценивали с помощью стандартных тестов с использованием катион-радикала 2,2'-азинобис-3-этилбензотиазолин-6-сульфо-

ната (ABTS<sup>•+</sup>) и радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH<sup>•</sup>). Результаты тестов свидетельствуют о том, что все соединения проявляют радикал-улавливающую активность среднего-высокого уровня.

Ключевые слова: пирролидин-2,5-дионы, α-глюкозидаза, кумарин, изатин, фуран, антиоксидантная активность

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Полный текст статьи печатается в английской версии журнала.

<sup>&</sup>lt;sup>#</sup>Автор для связи: эл. почта: emre.mentese@erdogan.edu.tr.



## ДИЗАЙН, СИНТЕЗ, ИССЛЕДОВАНИЯ *in silico* И ПРОТИВОМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ РЯДА ТИАДАЗИНОВ И 1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ТИОНОВ, НЕСУЩИХ ПИРАЗОЛОВУЮ ГРУППУ<sup>1</sup>

© 2020 Soukhyarani Gopal Nayak\* and Boja Poojary\*, #

\*Department of Chemistry, Mangalore University, Mangalagangothri, Mangaluru, Karnataka, 574199 India Поступила в редакцию 14.05.2019 г. После доработки 14.06.2019 г.

Принята к публикации 16.09.2019 г.

В виду активной разработки новых биологически активных соединений получена серия 6-(замещенных фенил)-3-(5-метил-1-фенил-1*H*-пиразол-4-ил)-7*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тиадиазинов и 4-[(замещенных бензилиден)амино]-5-(5-метид-1-фенил-1*H*-пиразол-4-ил)-2,4-дигидро-*3H*-1,2,4-триазол-3-тионов с хорошими выходами. Структуры соединений подтверждены элементным анализом, методами масс спектрометрии, Фурье-ИК, <sup>1</sup>Н и <sup>13</sup>С ЯМР спектрометрии. Для изучения взаимодействий полученных производных с рецептором был произведен докинг с простагландин D2-синтазой (PDGS). Позиции докинга и нековалентные взаимодействия позволили понять возможный механизм ингибирования. Они показали высокую антибактериальную активность против штаммов *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*. В частности, хлор-, фтор-, диметокси- и дигидрокси-производные показали высокую активность.

Ключевые слова: тиадиазин, основания Шиффа, молекулярный докинг, простагландин D2-синтаза, антибактериальная активность

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Полный текст статьи печатается в английской версии журнала.

<sup>&</sup>lt;sup>#</sup> Автор для связи: (тел.: +91-944-886-5403; эл. почта: poojaryboja@gmail.com).



УДК 615.214.22

## АНКСИОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ 11*H*-2,3,4,5-ТЕТРАГИДРО[1,3]ДИАЗЕПИНО[1,2-*a*]БЕНЗИМИДАЗОЛА И 2-МЕРКАПТОБЕНЗИМИДАЗОЛА

© 2020 г. А. А. Спасов<sup>\*, \*\*</sup>, О. Н. Жуковская<sup>\*\*\*</sup>, Д. В. Мальцев<sup>\*, \*\*</sup>, М. В. Мирошников<sup>\*, #</sup>, М. О. Скрипка<sup>\*</sup>, К. Т. Султанова<sup>\*, \*\*</sup>, А. С. Морковник<sup>\*\*\*</sup>

\*ФГБОУ ВО "Волгоградский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакологии и биоинформатики,

Россия, 400131, Волгоградская обл., Волгоград, площадь Павших Борцов, 1

\*\*ГБУ "Волгоградский медицинский научный центр", лаборатория экспериментальной фармакологии,

Россия, 400131, Волгоградская обл., Волгоград, площадь Павших Борцов, 1

\*\*\*ФГАОУ ВО "Южный федеральный университет", научно-исследовательский институт физической и органической химии.

Россия, 344006, Ростов-на-Дону, ул. Большая Садовая, 105/42

Поступила в редакцию 08.07.2019 г. После доработки 11.07.2019 г. Принята к публикации 22.08.2019 г.

Изучена анксиолитическая активность соединений двух химических групп: бифенилметильных производных 11H-2,3,4,5-тетрагидро[1,3]диазепино[1,2-*a*]бензимидазола (BIF) и функционально замещенных по алкильной группе 2-алкилтиобензимидазолов (AZH). Установлено, что изучаемые соединения обладают транквилизирующим действием различной степени выраженности; два из них — BIF-66 и AZH-57, с наиболее высокой анксиолитической активностью перспективны для углубленного изучения их нейропсихотропного профиля.

Ключевые слова: анксиолитики, транквилизаторы, 11H-2,3,4,5-тетрагидро[1,3]диазепино[1,2-а]бензимидазол производные, 2-меркаптобензимидазол производные

DOI: 10.31857/S0132342320010145

#### введение

Антифобические средства имеют важное значение в лечении широкого спектра психических расстройств. За последние годы к назначению этой группы анксиолитических средств предъявляются все более серьезные требования, которые усложняют персональный подбор препарата, тем самым создавая трудности в расширении современного ассортимента лекарственных средств [1].

Анксиогенез является одним из самых сложных поведенческих процессов, в нем задействовано значительное количество нейромедиаторных и гормональных систем. На сегодняшний день, по оценкам ВОЗ, психическими расстройствами страдают по меньшей мере 300 млн людей на планете. Аксиолитики, применяемые сегодня при терапии данных патологий, обладают как правило, значительным перечнем побочных действий [2]. Для средств из группы "дневных" транквилизаторов отмечается низкий уровень проти-

вотревожной активности, что в совокупности с клинически длительным периодом проявления стойкого эффекта снижает их эффективность в терапии тревожных заболеваний [3]. В связи с этим современные рекомендации предлагают в качестве препаратов выбора группу веществ с антидепрессивной активностью, а именно ингибиторы обратного захвата моноаминов. Однако и для них отмечается ряд существенных недостатков, основными из которых являются: низкая эффективность (60-70%) и длительное развитие эффекта (спустя 2-3 недели после начала применения) [4]. На сегодняшний день заявлены новые соединений с потенциальным анксиолитическим лействием: АР-521 (производное хинолина) AVN-101 (Япония), (производное индола) (США), D2AAK1 (производное хинолина и индола) (Финляндия), и другие [5]. Для многих из них показан мультитаргентный механизм действия. Направления, разрабатываемые существующими рабочими группами, представлены функционализированными представителями ряда химических классов - пиримидинов, диазепинов, бен-

<sup>&</sup>lt;sup>#</sup> Автор для связи: (тел.: +79650072956; эл. почта: mihailmiroshnikov@mail.ru).

зимидазолов и многих других [6]. В ранее проведенных исследованиях показан высокий потенциал анксиолитической активности у соединений, содержащих бензимидазольный бицикл. Существенным фактором для оптимизации указанной химической структуры является значительный потенциал в мультитаргетности действия производных бензимидазола, полученных ранее, особенно при наличии в молекулах второго привилегированного структурного фрагмента, такого, например, как бифенильный.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве объектов исследования были выбраны две группы бензимидазолсодержащих структур, а именно, 11-бифенилметилзамещенные 11*Н*-[1,3]диазепино[1,2-а]бензимидазолы под шифрами BIF, а также функционально-замешенные по алкильной группе 2-алкилтиобензимидазолы (АZН) (табл. 1). Синтез всех соединений с шифрами BIF [7], а также соединений AZH-53, 54, 55 [8], AZH-61 [9], AZH-62 [10], AZH-63 [11] проведен по методикам, описанным в указанных работах. Препаратами сравнения послужили диазепам (7-хлор-1-метил-5-фенил-1,3-лигилро-2H-1,4-бензолиазепин-2-он) и афобазол (дигидрохлорид 5-этокси-2-[(2-морфолино)-этилтио]бензимидазола).

В результате проведенного исследования, было установлено, что оба типа структур обладают, в той или иной степени, анксиолитическим действием. Рассмотрим вначале данные, полученные для бифенилметилзамещенных 2,3,4,5-тетрагидро-11*H*-[1,3]диазепино[1,2-а]бензимида-Введение животным гидробромида золов. метилового эфира 4'-(2,3,4,5-тетрагидро-11*H*-[1, 3]диазепино[1,2-а]бензимидазол-11-илметил)бифенил-2-карбоновой кислоты (BIF-60) оказывало лишь незначительный анксиолитический эффект: практически сохранялось чувство страха открытого пространства, почти не изменялось количество выходов в светлый рукав и время нахождения в нем по сравнению контрольной группой животных (табл. 1). В опытных группах, которым вводили гидробромид 4'-(2,3,4,5-тетрагидро-11*H*-[1,3]диазепино[1,2-*а*]бензимидазол-11-илметил)бифенил (BIF-59) и гидробромид 4'-(2,3,4,5тетрагидро-11*H*-[1,3]диазепино[1,2-а]бензимидазол-11-илметил)бифенил-2-карбонитрил (BIF-69), указанный эффект уже был явным и выражался в примерно двукратном увеличении времени нахождения мышей в светлом рукаве и количества выходов в этот рукав в сравнении с группой, получавшей дистиллированную воду.

Наибольшую же анксиолитическую активность среди первой группы соединений продемонстрировал гидробромид 4'-(2,3,4,5-тетрагидро-11*H*-[1,3]диазепино[1,2-*а*]бензимидазол-11-илметил)

бифенил-2-карбоновая кислота (BIF-66), что свидетельствует о весьма важной роли, в данном случае, карбоксильной группы бифенильного фрагмента. Действительно, соединение BIF-66 более чем в 7 раз повышало количество выходов в светлый рукав и практически в 4 раза увеличивало время пребывания в нем в сравнении с контрольными значениями. По своей активности оно также явно превосходило препарат сравнения диазепам в дозе 1 мг/кг, который давал увеличение времени нахождения мышей в светлом рукаве более чем в 3 раза. Отметим также, что показатель количества выходов в светлый рукав у мышей, получавших диазепам, увеличивался лишь в 1.5 раза в сравнении с контрольным значением, но расхожление было статистически не слишком значимым. Это связано с тем, что диазепаму присуще не только анксиолитическое, но и седативное действие, что с одной стороны снижает страх лабораторного животного, а с другой, делает его в определенной степени заторможенным.

По отношению к второму препарату сравнения, афобазолу, сопутствующий эффект седации, при сопоставимом в сравниваемых дозах анксиолитическом эффекте, гораздо менее выражен, так как число выходов в светлый рукав, по сравнению с контрольной группой, было увеличено уже в 3 раза. Таким образом, для соединений под шифром BIF характерно проявление противотревожного действия. В этом отношении наиболее активный представитель этой группы, карбоновая кислота BIF-66, не только не уступало, но и заметно превосходило оба препарата сравнения (табл. 2).

Для второго типа бензимидазолсодержащих структур, являющихся производными 2-меркаптобензимидазола (AZH) также была выявлена противотревожная активность различной степени выраженности в тесте "Приподнятый крестообразный лабиринт". Наименее выражена она для дигидробромида 5-этокси-2-[(3-диметиламино)-пропилтио]бензимидазола(АZH-55), дигидрохлорида 5-метил-2-[(2-морфолино)-этилтио]бензимидазола (AZH-57) и 5-метокси-2-[2-(4-бромфенил)-гидроксиэтилтио]бензимидазол (AZH-62). В этом случае регистрировалось статистически достоверное увеличение времени нахождения мышей в открытом рукаве лабиринта. Отмечалось также и увеличение количества выходов в светлый рукав. Дигидрохлорид 5-этокси-2-[(2диэтиламино)этилтио]бензимидазол (AZH-53) при пероральном введении вызывал повышение количества выходов мышей в открытый рукав, хотя статистически значимых изменений времени нахождения на открытом пространстве отмечено не было. Для четырех вышеуказанных производных 2-меркаптобензимидазола характерно увеличение активности грызунов, что отражалось в повышении количества переходов как между

Соелинение	Химическая структура	Время нахождения	Количество выходов
Coodminenne	Annan tookus orpykrypu	в открытом рукаве, с	в открытый рукав
BIF-59	N N N N N N N N N N N N N N N N N N N	$66.75 \pm 4.80*$	2.75 ± 0.63*
BIF-60	N N N N N N N N N N N N N N N N N N N	31.00 ± 15.21	$1.00 \pm 0.71$
BIF-66	$HBr \qquad H$	114.00 ± 16.49*	5.75 ± 1.75*
BIF-69	HBr N N NC	51.17 ± 10.82*	3.25 ± 0.71*
AZH-53		$48.50 \pm 14.20$	$4.00 \pm 1.10^{*}$
AZH-54		18.00 ± 5.21	0.75 ± 0.47

**Таблица 1.** Анксиолитический эффект в тесте "Приподнятый крестообразный лабиринт" производных 11*H*-2,3,4,5тетрагидро[1,3]диазепино[1,2-*a*]бензимидазола и 2-меркаптобензимидазола, пероральное введение (*M*±*m*)

#### Таблица 1. Окончание

Соединение	Химическая структура	Время нахождения в открытом рукаве, с	Количество выходов в открытый рукав
AZH-55	$\sim 0$ $\sim N$ $\sim 2HBr$	$66.00 \pm 8.08*$	3.25 ± 0.47*
AZH-56		20.75 ± 12.85	$1.25 \pm 0.95$
AZH-57		115.8 ± 19.96*	5.25 ± 0.51*
AZH-61	$N \qquad OH \qquad HCl$	51.75 ± 20.15	3.00 ± 1.23
AZH-62	N $S$ $H$ $Br$ $HCl$	83.25 ± 22.63*	3.75 ± 0.63*
AZH-63		45.75 ± 19.80	3.00 ± 1.00
Контроль		$24.84 \pm 7.55$	$0.75\pm0.48$
Диазепам (1 мг/кг)		79.13 ± 14.96*	$1.25\pm0.95$
Афобазол (5 мг/кг)	$\sim 0$ $H$ $N$	65.75 ± 5.54*	2.25 ± 0.47

\* Данные достоверны по отношению к контролю (*p* ≤ 0.05, критерий Краскелла–Уоллиса). Соединения под шифрами BIF и AZH вводились в дозах 1 мг/кг, примерно эквимоляльных дозе препарата сравнения – диазепама.

**Таблица 2.** Влияние Диазепама, Афобазола, BIF-59, BIF-60, BIF-61, BIF-66, AZH-53, AZH-54, AZH-55, AZH-56, AZH-57, AZH-61, AZH-62, AZH-63 на поведение мышей в условиях методики "Приподнятый крестообразный лабиринт", пероральное введение ( $M \pm m$ )

	Количество переходов				
Соединение	общее	из светлого рукава в светлый	из светлого рукава в темный	из темного рукава в темный	
Контроль	$5.25 \pm 1.32$	$0.25\pm0.25$	$1.50\pm0.96$	$3.50\pm0.29$	
Диазепам (1 мг/кг)	$2.54\pm0.66$	$0.13\pm0.09$	$2.20\pm0.58$	$1.4 \pm 0.41$	
Афобазол (5 мг/кг)	$5.00 \pm 1.88$	$0.50\pm0.44$	$4.21\pm0.48$	$0.8\pm0.45$	
BIF-59	$11.50 \pm 2.63^*$	$2.00 \pm 1.23$	$4.50\pm1.66$	$2.75\pm1.25$	
BIF-60	$4.00\pm1.87$	$0.00\pm0.00$	$1.00\pm0.71$	$3.00\pm1.92$	
BIF-66	$11.75 \pm 3.57*$	$3.25 \pm 1.32^{*}$	$4.75 \pm 1.49^{*}$	$3.75 \pm 1.75^{*}$	
BIF-69	$9.83 \pm 1.85^{*}$	$0.83 \pm 0.31$	$4.83 \pm 0.83^{*}$	$4.17 \pm 1.14$	
AZH-53	$9.50 \pm 1.91^{*}$	$1.00 \pm 0.61$	$6.75 \pm 1.91$	$1.50\pm0.29$	
AZH-54	$3.00 \pm 1.31$	$0.25\pm0.25$	$1.00\pm0.71$	$2.00\pm0.91$	
AZH-55	$13.75 \pm 1.81*$	$2.00 \pm 0.71^{*}$	$6.50 \pm 0.31^{*}$	$2.25\pm1.03$	
AZH-56	$4.00 \pm 1.71$	$0.25\pm0.25$	$2.00 \pm 1.41$	$1.25\pm0.75$	
AZH-57	$14.00 \pm 1.23^*$	$2.25 \pm 1.03^{*}$	$9.50 \pm 1.01^{*}$	$2.50\pm0.29$	
AZH-61	$8.50 \pm 1.71$	$1.75 \pm 0.75^{*}$	$3.75 \pm 1.71$	$3.00\pm0.91$	
AZH-62	$12.50 \pm 1.71^*$	$1.00 \pm 0.58$	$7.30 \pm 1.21*$	$4.75 \pm 0.63^{*}$	
AZH-63	$8.00\pm2.12$	$0.50\pm0.50$	$4.75 \pm 1.11$	$2.75\pm0.63$	

\* Данные достоверны по отношению к контролю (p ≤ 0.05, критерий Краскелла–Уоллиса). Соединения под шифрами BIF и AZH вводились в дозах 1 мг/кг, эквимоляльных дозе препарата сравнения – диазепама.

темными-светлыми, так и между однотипными рукавами.

Далее нами было исследовано поведение мышей в тесте "Открытое поле" (табл. 3). Для диазепама в дозе 1 мг/кг, вследствие его седативного эффекта, отмечалось снижение практически всех видов активности в 2.8–4.8 раза, что согласуются с литературными данными, характерными для используемых доз препарата [12]. В то же время производные 11*H*-2,3,4,5-тетрагидро[1,3]диазепино[1,2-а]бензимидазола (BIF) значимо не изменяли показатели горизонтальной активности животных в сравнении с контрольными значениями. Для соединения BIF-59 отмечалось увеличение количества вертикальных стоек, а также некоторое снижение поисковой активности животных. У мышей, получавших соединение BIF-60, статистически незначимо снижались горизонтальная и вертикальная активности, при этом поисковая активность падала в сравнении с результ атами контрольной группы животных в 7 раз (p < 0.05).

Для всех производных 2-меркаптобензимидазола (AZH) было характерно отсутствие влияния на горизонтальную двигательную активность животных, но для пяти из этой серии соединений – AZH-56, AZH-55, AZH-57, AZH-61 и AZH-63 – отмечалось увеличение количества вертикальных стоек, совершаемых животными в течение периода наблюдения. В большинстве экспериментальных групп наблюдалось также увеличение поисковой активности.

Проведенные тесты по изучению миорелаксирующего действия веществ дали результаты, согласующиеся с полученными в тесте "Открытое поле" (табл. 4). Так, препарат сравнения диазепам в дозе 1 мг/кг снижал способность животных удерживаться на сетке в 2 раза, проволоке в 1.3 раза и вращающемся стержне в 3 раза. В группах экспериментальных веществ для производных 2-меркаптобензимидазола и соединения BIF-66 не регистрировалось изменений наблюдаемых показателей, что позволяет говорить об отсутствии у них не только седативного, но и миорелаксирующего и действия в используемой дозе. Для иных соединений BIF-типа отмечалось снижение способности мышей удерживаться на вращающемся стержне в течение 30 с: в среднем исследуемый показатель составлял 19.6 с. Для соединения BIF-60 снижение времени удержания животных на проволоке составило 25%.

При сравнении двух серий соединений – производных 11*H*-2,3,4,5-тетрагидро[1,3]диазепино[1,2-*a*]бензимидазола (BIF) и 2-меркаптобензимидазола (AZH) на предмет проявления анксиолитической и миорелаксирующей активности можно сделать вывод о том, что изучаемые субстанции обеих групп обладают разной степенью выраженности изучаемых эффектов. Так, в тесте "Приподнятый крестообразный лабиринт" среди соединений группы BIF было обнаружено 1 вещество BIF-60 с отсутствием анксиолитической активности и 3 соединения BIF-59, BIF-66, BIF-69 с умеренной и высокой степенью проявления

Соединение	Горизонтальная активность	Вертикальная активность	Поисковая активность	
Контроль	$94.34 \pm 3.61$	$7.25 \pm 0.61$	$7.00\pm0.78$	
Диазепам (1 мг/кг)	$33.83 \pm 3.41^*$	$1.50 \pm 0.43^{*}$	$1.5 \pm 0.05^{*}$	
Афобазол (5 мг/кг)	$68.33 \pm 9.56*$	$2.17 \pm 1.67*$	$5.00 \pm 1.71^*$	
BIF-59	$123.3 \pm 13.80^*$	$16.50 \pm 3.20^*$	$3.50 \pm 0.31^*$	
BIF-60	$68.33 \pm 17.57$	$5.00 \pm 1.71$	$1.00 \pm 0.71^{*}$	
BIF-66	$103.3 \pm 28.53$	$12.25 \pm 5.50$	$6.00 \pm 1.68$	
BIF-69	$90.33 \pm 9.89$	$17.17 \pm 2.85^*$	$3.00 \pm 0.82^{*}$	
AZH-53	$110.00 \pm 7.63$	$15.50 \pm 4.25$	$7.75 \pm 0.25$	
AZH-54	$99.50 \pm 7.31$	$7.00 \pm 0.71$	$10.50 \pm 1.76^*$	
AZH-55	$109.80 \pm 13.44$	$35.25 \pm 4.52^*$	$13.75 \pm 2.39^*$	
AZH-56	$95.00 \pm 10.03$	$20.75 \pm 3.43^*$	$15.75 \pm 3.66$	
AZH-57	$109.50 \pm 14.98$	$23.75 \pm 6.42^*$	$11.00 \pm 2.12^*$	
AZH-61	$87.25 \pm 4.59$	$15.75 \pm 0.85^{*}$	$12.25 \pm 1.32^*$	
AZH-62	$111.5 \pm 15.21$	$32.00 \pm 9.17$	$11.75 \pm 0.25^{*}$	
AZH-63	$101.80 \pm 14.98$	$15.25 \pm 5.54*$	$12.25 \pm 1.89^*$	

**Таблица 3.** Влияние Диазепама, Афобазола и соединений с шифрами BIF и AZH на поведение мышей в тесте "Открытое поле", пероральное введение  $(M \pm m)$ 

\* Данные достоверны по отношению к контролю (p ≤ 0.05, критерий Краскелла–Уоллиса). Соединения под шифрами BIF и AZH вводились в дозах 1 мг/кг, примерно эквимоляльных дозе препарата сравнения – диазепама.

**Таблица 4.** Миорелаксирующие свойстава Диазепама, Афобазола и соединений с шифрами BIF и AZH, пероральное введение (*M* ± *m*)

Соединения	Сетка	Проволока	Ротарод
Контроль	$3.98\pm0.01$	$3.98 \pm 0.01$	$29.95 \pm 0.01$
Диазепам (1 мг/кг)	$2.00 \pm 0.32^{*}$	$3.00 \pm 0.87^{*}$	$10.20 \pm 2.44^*$
Афобазол (5 мг/кг)	$4.00 \pm 0.01$	$3.17 \pm 0.40$	$22.67\pm0.67$
BIF-59	$3.98 \pm 0.01$	$3.98\pm0.01$	$18.50 \pm 3.95^*$
BIF-60	$3.75 \pm 0.25$	$3.00 \pm 0.41^{*}$	$22.00 \pm 3.94^*$
BIF-66	$3.75 \pm 0.25$	$3.75 \pm 0.25$	$23.00 \pm 3.58$
BIF-69	$3.80 \pm 0.13$	$3.80 \pm 0.13^{*}$	$18.33 \pm 3.63^*$
AZH-53	$4.00 \pm 0.01$	$4.00\pm0.01$	$27.00 \pm 2.38$
AZH-54	$4.00 \pm 0.01$	$3.75 \pm 0.25$	$28.75\pm0.75$
AZH-55	$4.00 \pm 0.01$	$4.00\pm0.01$	$25.50 \pm 3.57$
AZH-56	$4.00 \pm 0.01$	$4.00\pm0.01$	$29.75 \pm 0.25$
AZH-57	$4.00 \pm 0.01$	$4.00\pm0.01$	$23.75 \pm 3.12$
AZH-61	$4.00 \pm 0.01$	$4.00\pm0.01$	$27.50 \pm 1.66$
AZH-62	$4.00 \pm 0.01$	$4.00 \pm 0.01$	$26.75 \pm 2.36$
AZH-63	$4.00\pm0.01$	$4.00\pm0.01$	$17.00 \pm 6.61$

\* Данные достоверны по отношению к контролю (*p* ≤ 0.05, критерий Краскелла–Уоллиса). Соединения под шифрами BIF и AZH вводились в дозах 1 мг/кг, эквимоляльных дозе препарата сравнения – диазепама.

противотревожного действия. При анализе зависимости "структура—эффект" данных соединений (табл. 1) было показано: животные, которым вводили соединение BIF-59, не содержащее дополнительных заместителей в структуре бифенила, показали результат, сопоставимый с результатами, полученными для группы афобазола, что говорит о перспективности данного соединения и необходимости дальнейшей химической модификации его структуры для достижения максимального анксиолитического действия. В структурах соединений BIF-60 и BIF-69 помимо коровой части содержатся сложно-эфирный или нитрильный радикалы в положении 2' бифенила. Для данных соединений отмечалось снижение выраженной противотревожной активности, что может свидетельствовать о неэффективности присутствия данных радикалов у производных группы BIF в проявлении анксиолитического эффекта. Наиболее активное вещество BIF-66 содержит карбоксильную группу, отсутствующую у других соединений данного ряда. Ее присутствие, очевидно, может влиять на эффективность взаимодействия изучаемой молекулы с мишенями живого организма, в связи с выраженной склонностью карбоксильной группы к образованию двух типов водородных связей — за счет ее карбонильной и гидроксильной групп.

Среди производных серии АZH было выявлено 4 соединения, с низкой анксиолитической активностью – AZH-53, 54, 56, 63; остальные 4 соединения AZH-55, 57, 61, 62 — обладали противотревожным действием, сопоставимым, либо превышающим таковое у препаратов сравнения диазепама и афобазола. При анализе зависимости "структура-эффект" производных 2-меркаптобензимидазола можно сделать вывод о важности наличия морфолиноэтильного радикал (соединение AZH-57), притом что сходный по строению пипиридиноэтильный радикал столь явного эффекта не оказывает. Таким образом, именно этот атом при наличии остального окружения, а именно, меркаптобензимидазольного скафолда в комбинации с морфолиноэтильным остатком играет критически важную роль в появлении у соединения AZH-57 выраженного противотревожного эффекта.

Соединения AZH-53, 54, 55 имеют определенное химическое сходство внутри своей группы производных, содержат диалкиламиноалкильный радикал. Данные вещества показали низкий уровень противотревожного действия, это свидетельствует о том, что включение названных радикалов в производные 2-меркаптобензимидазола, не приводит к возникновению выраженного анксиолитическогоэффекта. К ним можно отнести также соединения AZH-61 и AZH-63, имеющие 2-[(2-гидрокси-2-*трет*-бутил)этильные остатки.

Вещество AZH-62, проявившее противотревожную активность, сопоставимую с препаратом сравнения диазепамом, имеет в своей структуре 2-(4-бромфенил)-2-гидроксиэтильный заместитель. Можно сделать предположение о том, что наличие данного радикала у производного 2-меркаптобензимидазола способствует проявлению нейропсихотропных свойств. Данное вещество также является перспективным для дальнейшей химической модификации и углубленного изучения нейропсихотропной активности.

Результаты, полученные в тесте "Открытое поле", по ряду показателей свидетельствуют о более выраженном активирующем действии производных 2-меркаптобензимидазола в сравнении с производными 11*H*-2,3,4,5-тетрагидро[1,3]диазепино[1,2-*a*]бензимидазола. Так, средний показатель вертикальной активности животных, которым вводили соединения AZH, в 1.6 раз больше, чем показатель животных под действием соединений BIF. Средний показатель поисковой активности мышей после введения производных 2-меркаптобензимидазола оказался выше, чем показатель мышей, которым вводили производные 11*H*-2,3,4,5-тетрагидро[1,3]диазепино[1,2*a*]бензимидазола в 3.5 раза. Данные параметры свидетельствуют о развитии у животных, под действием соединений AZH, явного исследовательского интереса, превышающего данный показатель у мышей под действием соединений BIF. Этот эффект может быть интерпретирован как характерный признак более выраженного противотревожного действия, которым обладают соединения группы AZH.

Показатели количества груминга, уринаций, болюсов и выходов в центральную часть установки опытных групп животных не показали статистических различий между группами препаратов сравнения. Оценка миорелаксирующей активности животных которым вводили соединения АZH в тестах "Сетка", "Проволока" и "Ротарод" так же подтверждает перспективность их дальнейшего изучения, так как данные, полученные в результате 3 тестов аналогичны показателям группы контроля, что может расцениваться как отсутствие развития, выраженного миорелаксирующего действия. Животные, которым вводили производные BIF, показали различный уровень миорелаксирующей активности, в целом уступающий как соединениям AZH, так и контролю, но превосходящий показатели групп диазепама и афобазола, что является перспективным моментом при дальнейших доклинических исследованиях данных вешеств.

Концепция совмещения 2 подклассов (бензимидазола и бифенила) при синтезе базовой структуры, является перспективной, соединения проявляют различный уровень антифобического действия. В то же время, при оптимизации химической формулы производных имидазобензимидазолов необходимо обратить внимание на фармакологическую структуру наиболее сходного препарата сравнения – афобазола, а также его нейропсихотропные свойства и взаимодействие с различными видами мишеней (рецепторы гамма-аминомасляной кислоты, серотониновые, сигма-рецепторы), так как, исходя из химической схожести сравниваемых соединений двух подклассов, можно предположить аналогичный механизм их действия и прогнозировать основные и побочные эффекты.

При детальном рассмотрении двух серий веществ стоит отметить, что коровая структура 11*H*-2,3,4,5-тетрагидро[1,3]диазепино[1,2-*a*]бензимидазола (BIF) не уступает структуре 2-меркаптобензимидазола по проявлению основного нейропсихотропного действия, что говорит о преспективности дальнейшей химической оптимизации и углубленного фармакологического изучения соединений-лидеров этой группы.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Химические структуры соединений синтезированы сотрудниками НИИ ФОХ ЮФУ при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект № 4.5821.2017/8.9).

Эксперименты проводили на половозрелых мышах самцах массой 18-23 г. Животных содержали в условиях вивария с естественным световым режимом на стандартной диете лабораторных животных, без ограничения доступа к еде и воде (ГОСТ Р 50258-92) с соблюдением Международных рекомендаций по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях [13]. Животных разделили на группы по 6 животных в каждой. Изучаемые вещества вводили перорально за 30 мин до начала наблюдения. Контрольным группам вводили растворитель (дистиллированная вода), животным групп препаратов сравнения – диазепам (Реланиум, "Польфа", Польша) в дозе 1 мг/кг, афобазол (ООО "Фармстандарт", Россия) в дозе 5 мг/кг, исследуемые вещества вводили примерно в эквимолярных препарату сравнения (диазепам) дозах.

Метод изучения анксиолитической активности в тесте "Приподнятый крестообразный лабиринт" основан на естественном предпочтении грызунами темных пространств, а также на страхе нахождения на открытых площадках и падения с высоты [14]. Животных помещали в приподнятый крестообразный лабиринт и в течение 5 мин регистрировали следующие показатели анксиолитической активности: количество переходов между рукавами, количество выходов в светлый рукав, количество переходов из светлого рукава в светлый, количество переходов из светлого рукава в темный, количество переходов из темного рукава в темный и время нахождения в открытом рукаве (секунды).

Изучение влияния на поведение мышей проводили в тесте "Открытое поле". В ходе наблюдения за животными регистрировали показатели: горизонтальную и вертикальную двигательную активность, поисковую активность (заглядывания животного в отверстия). В табл. 3 приведены усредненные количественные акты каждого изучаемого показателя, обработанные статистическим критерием Краскелла—Уоллиса. Время наблюдения составляло 5 мин.

Миорелаксирующую активность исследовали в установке "Вращающийся стержень" (ротарод) [15], а также с использованием тестов "Удержание на проволоке" и "Удержания на сетке". В тесте "Вращающийся стержень" исследуемое животное помещалось в установку на 30-секундный период, все животные перед началом исследования подвергались приучению — нахождению на вращающемся стержне. В день проведения эксперимента, после 30-минутной инкубации (после введения веществ) животных помещали на вра-

удержания на нем. Полученные данные представлены в табл. 4 и представляют собой усредненные значения времени нахождения животных на вращающемся стержне. В тестах "Удержания на проволоке" и "Удержание на сетке" (табл. 4) фиксировалась способность мышей удерживаться на них в течение 30 с. Измерение миорелаксирующей активности в тесте "Удержания на сетке" выражали в баллах таким образом: если животное все время эксперимента держалось за проволоку всеми 4 лапами – эта мышь оценивалась в 4 балла, если 3 лапами – 3 балла, 2 лапами – 2 балла, 1 лапой – 1 балл. если животное падало с установки – 0 баллов. Измерение миорелаксирующей активности в тесте "Удержания на проволоке" так же выражали в баллах: если животное во время эксперимента было способно подтянуться всем телом и забраться всеми 4 лапами на проволоку — 4 балла, если мышь была способна воспользоваться только 3 конечностями и оставалась в подвешенном состоянии – 3 балла, если животное все время эксперимента висело на 2 лапах – 2 балла, если висело на 1 лапе – 1 балл, если мышь падала с установки – 0 баллов.

щающийся стержень и регистрировали время

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с использованием теста Вилкоксона, критерия Краскела–Уоллиса с постобработкой тестом Данна. Обсчет реализован в программе GraphPadPrism 5.0.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, изучение производных 11 Н-2,3,4,5-тетрагидро[1,3]диазепино[1,2-а]бензимидазола (BIF) и 2-меркаптобензимидазола (AZH) на модели "Приподнятый крестообразный лабиринт" показало наличие у этих соединений анксиолитической активности. Для 6 из 12 соединений характерно проявление противотревожной активности в дозе 1 мг/кг, примерно эквимолярной диазепаму. Наиболее активным соединением среди изученных производных бифенилметилдиазепинобензимидазолов BIF оказался содержащий карбоксильную группу гидробромид 4'-(2,3,4,5-тетрагидро-11*H*-[1,3]диазепино[1,2-а]бензимидазол-11-илметил)бифенил-2-карбоновой кислоты (BIF-66), а для производных 2-меркаптобензимидазола -AZH-57, соединение с морфолиноэтильным радикалом в качестве S-заместителя. Данные соединения не только не уступали по уровню активности диазепаму и афобазолу, но и превосходили их. Причем для них, в отличие от диазепама, не характерно проявление миорелаксирующего и седативного действия.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Химические структуры соединений синтезированы сотрудниками НИИ ФОХ ЮФУ при финансовой под-

держке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект № 4.5821.2017/8.9).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводились на половозрелых мышах самцах массой 18—23 г. Животные содержались в условиях вивария с естественным световым режимом на стандартной диете лабораторных животных, без ограничения доступа к еде и воде (ГОСТ Р 50258-92) с соблюдением Международных рекомендаций по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Ладыженский М.Я., Городничев А.В., Костюкова Е.Г. // Современная терапия психических расстройств. 2014. №. 2. С. 20-25.
- 2. Гафаров В.В., Гагулин И.В., Громова Е.А., Панов Д.О., Гафарова А.В. // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2017. Т. 9. №. 4. С. 31–37.
- 3. Спасов А.А., Диваева Л.Н., Мальцев Д.В., Кузьменко Т.А., Морковник А.С., Мирошников М.В., Таран А.С., Золотова Е.А. // Вестник Волгоградского гос. мед. университета. 2018. Т. 67. № 3. С. 19–23.
- 4. Данилов Д.С. // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2018. Т. 10. № 4. С. 4–12.
- Domingues M., Casaril A.M., Birmann P.T., Bampi S.R., Lourenço D.A., Vieira B.M., Dapper L.H., Lenardão E.J., Sonego M., Collares T., Seixas F.K., Brüning C.A.,

Savegnago L. // Behavioural Brain Research. 2019. V. 366. P. 96–107.

- 6. Султанова К.Т., Яковлев Д.С., Мальцев Д.В., Мирошников М.В., Морковина Я.В., Анисимова В.А., Морковник А.С. // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2018. Т. 67. № 3. С. 28–32.
- Denis A. Babkov, Olga N. Zhukowskaya, Alexander V. Borisov, Valentina A. Babkova, Elena V. Sokolova, Anastasia A. Brigadirova, Roman A. Litvinov, Alexandra A. Kolodina, Anatolii S. Morkovnik, Vadim S. Sochnev, Gennady S. Borodkin, Alexander A. Spasov // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2019. 29. № 17. P. 2443–2447.
- Harsanyi Kalman, Maderspach Andrea, Javor Andras, Hajos Gyoergy, Fekete Gyoergy, Szporny Laszlo, Tetenyi Peter, Csomor Katalin, Karpati Egon // Ger. Offen. 1986. DE 3608032 A1 19860911.
- 9. Красновский А.Н., Kochergin, Р. М. // Хим. гетероцикл. соед. 1969. № 2. 316-320.
- 10. *Mohan Jag, Pujari H.K.* // Ind. J. Chem. 1972. 10(3). 274–276.
- Goldfarb David Scott // U.S. Pat. Appl. Publ. 2009, US 20090163545 A1 20090625.
- 12. Хомутов А.Е., Пурсанов К.А., Лушникова О.В., Романова Ю.А. // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2014. Т. 1. № 3. С. 48-52.
- Воронина Т.А. // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. Миронова А.Н. 2012. Ч. 1. С. 264–275.
- 14. Таран А.С., Мальцев Д.В., Яковлев Д.С., Караваева Т.В., Ткаченко Ю.О., Диваева Л.Н., Морковник А.С., Кузьменко Т.А. // Волгоградский научно-медицинский журнал. 2017. Т. 53. № 1. С. 24–26.
- Морковин Е.И., Куркин Д.В., Тюренков И.Н. // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2018. Т. 68. № 1. С. 3–15.

## Anxiolytic Activityof Derivatives of 11H-2.3.4.5 A-Tetrahydro[1.3] of Diazepino[1.2-A]benzimidazole and 2-Mercaptobenzimidazole

A. A. Spasov<sup>\*, \*\*</sup>, O. N. Zhukovskaya<sup>\*\*\*</sup>, D. V. Maltsev<sup>\*, \*\*</sup>, M. V. Miroshnikov<sup>\*, #</sup>, M. O. Skripka<sup>\*</sup>, K. T. Sultanova<sup>\*, \*\*</sup>, and A. S. Morkovnik<sup>\*\*\*</sup>

\*Phone: +7(965) 007-29-56; e-mail: mihailmiroshnikov@mail.ru

\*Volgograd State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Department of Pharmacology and Bioinformatics, ploshchad' Pavshih Borcov 1, Volgogradskaya obl., Volgograd, 400131 Russia

\*\*Volgograd Medical Research Center, Laboratory of Experimental Pharmacology,

ploshchad' Pavshih Borcov 1, Volgogradskaya obl., Volgograd, 400131 Russia

\*\*\*Research Institutes of Physical and Organic Chemistry of Southern Federal University.

ul. Bol'shaya Sadovaya 105/42, Rostov-on-Don, 344006 Russia

This paper presents a study of the anxiolytic activity of compounds of the two classes of chemical groups: derivatives of 11H-2,3,4,5-tetrahydro[1.3]diazepino[1.2-a]benzimidazole and derivatives of 2-mercaptobenzimidazole. As a result of the study it was found that the studied compounds exhibit different degrees of severity of tranquilizing action. The most potent anksiolytics were compounds BIF-66 and AGH-57. These compounds are promising for an in-depth study of their neuropsychotropic profile.

Keywords: anxiety, stress, anxiolytics, tranquilizers, derivatives of 11H-2,3,4,5- tetrahydro[1,3]diazepino[1,2-a]ben-zimidazole, derivatives of 2-mercaptobenzimidazole



УДК 547.022.2/.4,547-31/-39,547-312

## СИНТЕЗ И ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ РЯДА ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ 2,3-АЛЛЕНОАТОВ

© 2020 г. Р. Н. Маликова\*, И. М. Сахаутдинов\*, <sup>#</sup>, М. А. Максимова\*\*, У. Ш. Кузьмина\*\*, Ю. В. Вахитова\*\*, М. С. Юнусов\*

> \*Уфимский Институт химии УФИЦ РАН, Россия, 450054, Республика Башкортостан, Уфа, пр-т Октября, 71 \*\*Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Россия, 450054, Республика Башкортостан, Уфа, пр-т Октября, 71 Поступила в редакцию 22.05.2019 г. После доработки 05.06.2019 г. Принята к публикации 09.07.2019 г.

Получена серия новых фталимид- и малеопимаримид производных 2,3-диеноатов (алленоатов) и исследовано их цитотоксическое действие в отношении клеточных линий опухолевого (HepG2, Jurkat) и нормального происхождения (HEK293). Наибольшим цитотоксическим действием обладают *N*-производные аминоалленоатов, содержащие имидомалеопимаровый фрагмент, которые можно отнести к перспективным веществам с потенциальной противоопухолевой активностью.

Ключевые слова: N-производные аминокислот, 2,3-диеноаты,  $\omega$ -карбоксиалленилфталимиды,  $\omega$ -карбоксиалленилимиды малеопимаровой кислоты, противоопухолевая активность, цитотоксическая активность

DOI: 10.31857/S0132342320010054

#### ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день известно около 200 природных и более 2700 синтезированных алленовых соединений [1, 2]. Интенсивные исследования по созданию потенциально биологически активных соединений привели к открытию целого ряда новых алленов, которые являются универсальными строительными блоками и обладают высокой противораковой, цитотоксической, антибактериальной. противовирусной и другими активностями [2-5]. Вдохновленные интригующей биоактивностью многих природных алленовых соединений, в том числе производимых живыми организмами, данный фрагмент в настоящее время систематически вводят в фармакологически активные классы соединений (стероиды, простагландины, аминокислоты, нуклеозиды). Например, феромон, выделенный из самца жука зерновки бобовой Acanthoscelides obtectus (Say), представляет собой интерес как пестицид [6]. Алленовый каротиноид фукоксантин, содержащийся в бурых, золотистых и диатомовых водорослях, получил повышенное внимание в связи с противораковой активностью [7]. Это соединение ингибирует рост клеток меланомы [8], лейкозных клеток человека [9], клеток рака простаты [10].

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью выявления зависимости структураактивность в данной работе синтезированы новые и ранее известные алленоаты на основе фталимид- и малеопимаримид производных аминокислот. Выбор именно таких N-замещенных аминокислот обусловлен тем, что соединения, содержащие остаток фталимида присутствуют в структуре таких лекарственных препаратов, как фталазол, обладающий противомикробным действием, талидомид – седативное снотворное средство и ряда других. Малеопимаровая кислота и ее производные являются аддуктами канифоли с малеиновым ангидридом и так же обладают широким спектром биологической активности. Среди прочих методов получения алленов особый интерес вызывает реакция Виттига, которая протекает в мягких условиях и позволяет варьировать заместители в α-положении у исходных карбоновых кислот и илидов и получать ди-, три- и тетразамещенные аллены, которые сложно получить другими методами. В ходе реакции хлорангидриды *N*-замещенных карбоновых кислот с триэтиламином дают кетены, которые in situ во-

Сокращения: МРІ – малеопимаримид; РНТІ – фталимид. <sup>#</sup> Автор для связи: (тел.: +7 (906) 104-48-19; эл. почта: ioh039@mail.ru).

влекаются в реакцию олефинирования по Виттигу с метил(трифенилфосфоранилиден)ацетатом (Ph<sub>2</sub>P=CHCO<sub>2</sub>Me) или метил-2-(трифенилфос-

форанилиден)пропионатом (Ph<sub>3</sub>P=CMeCO<sub>2</sub>Me) с образованием ди- и тризамещенных алленоатов соответственно (схема 1).

$$R^{1}-(CH_{2})_{n}-COOH \xrightarrow{SOCl_{2}, C_{6}H_{6}} \left[ R^{1}-(CH_{2})_{n-1}-CH=C=O \right] \xrightarrow{Ph_{3}P=C(R^{2})CO_{2}Me} \\ \longrightarrow R^{1}-(CH_{2})_{n-1}-CH=C=C(R^{2})COOMe \\ (I) R^{1} = PHTI, R^{2} = H, n = 1; \\ (II) R^{1} = PHTI, R^{2} = Me, n = 1; \\ (III) R^{1} = PHTI, R^{2} = H, n = 3; \\ (IV) R^{1} = PHTI, R^{2} = H, n = 5; \\ (V) R^{1} = PHTI, R^{2} = H, n = 5; \\ (VI) R^{1} = MPI, R^{2} = H, n = 1; \\ (VII) R^{1} = MPI, R^{2} = H, n = 2; \\ (VIII) R^{1} = MPI, R^{2} = H, n = 3; \\ (IX) R^{1} = MPI, R^{2} = H, n = 4; \\ (X) R^{1} = MPI, R^{2} = H, n = 5 \end{cases}$$

Схема 1. Синтез алленоатов из фталимид- и малеопимаримид производных аминокислот.

Структуры полученных соединений доказаны физико-химическими методами анализа. Для корректного отнесения сигналов в спектрах ЯМР продуктов реакций использовали методы гомо- и гетероядерной двумерной корреляции HSQC и HMBC. Для синтезированных алленоатов в спектре ЯМР <sup>13</sup>С информативными являются сигналы двух терминальных углеродных атомов в области  $\delta_c$  87.72–106.49 м.д., а также центрального четвертичного углеродного атома алленового фрагмента, проявляющийся в области  $\delta_c$  208.31–219.84 м.д.

Как видно из табл. 1, большинство из изученных соединений (I)—(X) проявляют цитотоксическую активность *in vitro*. Наименьшую цитотоксическую активность имеют аллены (II), (V) — соединения с метильной группой в альфаположении к сложноэфирному фрагменту. Наиболее выраженное действие в отношении клеток опухолевого происхождения проявляют алленоаты (VI), (IX), (X), полученные на основе N-малеопимаримидзамещенных глицина, аминовалериановой и аминогексановой кислот. Подчеркнем, что наибольшую чувствительность к данным соединениям проявляют клетки лимфобластной лейкемии Jurkat.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ИК-спектры записывали на приборе IR-Prestige-21 (Fourier Transform Spectrophotometer – Shimadzu). Спектры ЯМР получены в CDCl<sub>3</sub> ( $\delta$ , м.д.) на спектрометре Bruker-AM 500 с рабочей частотой 500 (<sup>1</sup>H), 125.76 МГц (<sup>13</sup>C), внутренний стандарт - тетраметилсилан (Me<sub>4</sub>Si). За ходом реакции следили с использованием тонкослойной хроматографии на пластинках Sorbfil ПТСХ-АФ-А (Россия), вещества обнаруживали с помощью УФ-облучения, паров йода, опрыскивания пластинок раствором нингидринового проявителя или раствором анисового альдегида с последующим нагреванием при 100-120°С. Масс-спектры получены на хроматомасс-спектрометре LCMS-2010EV фирмы "Shimadzu" в режиме химической ионизации при атмосферном давлении (ХИАД). Температуру плавления определяли на нагревательном столике "Boetius". Продукты реакции выделяли с помощью колоночной хроматографии на силикагеле Chemapol с размером частиц 40/100 и 100/160 мкм, элюент петролейный эфирэтилацетат, 7/3. Элементный анализ выполнен с помощью автоматического CHNS-анализатора EUROEA-3000. *N*-Фталимидзамещенные аминокислоты получены по известной методике [4]. Основные физико-химические характеристики соединений (IV), (V), а также алленов (VI), (VII), (VIII), (X), полученных, соответственно, из метил-*N*-малеопимаримидзамещенных глицина, β-аланина, γ-аминомасляной и аминокапроновой кислот, были описаны нами в предыдущих работах [11-15]. Характеристики впервые синтезированных алленоатов приведены ниже.

Общая методика получения алленоатов межмолекулярной реакцией Виттига. К суспензии 5 ммоль *N*-замещенной аминокислоты в 10 мл сухого бензола добавляли пятикратный избыток хлористого тионила. Смесь кипятили с обратным холодильником с хлоридкальциевой трубкой в

#### Таблица 1. Цитотоксическая активность соединений (I)-(X) in vitro



Соеди-	Выхол %	<b>D</b> 1	п	<b>P</b> <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> , мкМ		
нения Выход, ле К	п	N <sup>-</sup>	HEK293	Jurkat	HepG2		
(I)	63	PHTI	1	Н	$25.3 \pm 2.9$	$10.4\pm0.7$	$11.1 \pm 0.2^{6}$
(II)	73	PHTI	1	Me	$110.0 \pm 12.5$	$23.0 \pm 2.7^{a}$ ( $p = 0.0003$ )	(p = 0.0019) 71.2 ± 3.3 <sup>6</sup> (p = 0.0004)
(III)	87	PHTI	3	Н	$18.6 \pm 2.1$	$5.5 \pm 0.8^{a}$ (p = 0.0002)	$22.9 \pm 0.2^{6}$ (p = 0.0139)
( <b>IV</b> )	56	PHTI	5	Н	$42.2 \pm 4.4$	$20.4 \pm 1.7^{a}$ (p = 0.0002)	$118.8 \pm 7.8^{6}$ (p = 0.0002)
( <b>V</b> )	42	PHTI	5	Me	89.1 ± 4.9	$31.3 \pm 3.1^{a}$ (p = 0.0002)	>1 мМ
( <b>VI</b> )	73	MPI	1	Н	79.15 ± 3.99	$3.82 \pm 0.78^{a}$ (p = 0.0002)	$81.22\pm7.88$
(VII)	84	MPI	2	Н	$20.98 \pm 1.14$	$6.12 \pm 1.36$	$30.69 \pm 9.55$
(VIII)	70	MPI	3	Н	$14.3\pm0.8$	$4.4 \pm 1.2^{a}$ ( <i>p</i> = 0.0327)	8.1 ± 3.2
( <b>IX</b> )	75	MPI	4	Н	$11.82\pm0.69$	$1.58 \pm 0.16^{a}$ ( <i>p</i> = 0.0002)	$16.53 \pm 1.12^{6}$ (p = 0.0011)
( <b>X</b> )	70	MPI	5	Н	$13.52 \pm 0.22$	$2.02 \pm 0.26^{a}$ ( $p = 0.0002$ )	$18.87 \pm 0.58$

Примечания.<sup>а, б</sup> Различия значений IC<sub>50</sub> в клетках Jurkat<sup>a</sup> и НерG2<sup>6</sup> относительно значений IC<sub>50</sub> в клетках НЕК293 статистически достоверны (однофакторный парный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим тестом Тьюки).

течение 3 ч. Растворитель и избыток хлористого тионила упаривали на роторном испарителе. Полученный хлорангидрид кислоты далее использовали без дополнительной очистки. К раствору 1.67 г (5 ммоль) метил(трифенилфосфоранилиден)ацетата или 1.74 г (5 ммоль) метил-2-(трифенилфосфоранилиден)пропионата в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> прибавляли по каплям эквимольное количество Et<sub>3</sub>N, раствор охлаждали до  $-10^{\circ}$ C. К этому раствору медленно по каплям добавляли охлажденный раствор полученного хлорангидрида кислоты. Реакционную массу перемешивали в течение 0.5 ч и в течение 4—6 ч выдерживали при 0°C. Растворитель отгоняли, продукты реакции выделяли колоночной хроматографией. **Метил-4-(1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)-2-метилбута-2,3-диеноат (II).** Получен на основе *N*-фталимидзамещенного глицина в количестве 1.03 г и метил-2-(трифенилфосфоранилиден)пропионата. Выход 0.94 г (73%). Белое кристаллическое вещество, т. пл. 102–104°С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н: 2.04 (с, 3 H, CH<sub>3</sub>), 3.72 (с, 3 H, CH<sub>3</sub>), 7.08 (м, 1 H, CH), 7.74 (м, 2 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>),7.83 (м, 2 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С: 18.54 (CH<sub>3</sub>), 53.83 (CH<sub>3</sub>), 91.95 (CH), 106.49 (C), 125.37 (CH<sub>аром</sub>), 133.79 (С<sub>аром</sub>), 136.61 (CH<sub>аром</sub>), 167.36 (C=O), 168.23 (C=O), 208.31 (=C=). Массспектр: m/z 258 [*M*H]<sup>+</sup>, 257 [*M*]<sup>-</sup>. Вычислено С<sub>14</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub> (257.24), %: C, 65.37; H, 4.31; N, 5.44; O, 24.88. Найдено, %: C, 65.32; H, 4.40; N, 5.39.

Метил-8-(1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)окта-2,3диеноат (IV). Получен на основе 5-*N*-фталимидзамещенной аминогексановой кислоты в количестве 1.3 г и метил(трифенилфосфоранилиден)ацетата. Выход 0.83 г (56%). Белое маслообразное вещество. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н: 1.52 (м, 2Н, СН<sub>2</sub>), 1.74 (м, 2Н, СН<sub>2</sub>), 2319 (м, 2Н, СН<sub>2</sub>), 3.65 (м, 2Н, СН<sub>2</sub>), 3.69 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 5.58 (м, 2H, 2=CH),7.70 (м, 2H, С<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.80 (м, 2H, С<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С: 25.78 (CH<sub>2</sub>), 26.88 (CH<sub>2</sub>), 27.77 (CH<sub>2</sub>), 37.53 (CH<sub>2</sub>), 51.87 (СН<sub>3</sub>), 88.14 (СН), 94.78 (СН), 123.11 (СН<sub>аром</sub>), 132.05 (С<sub>аром</sub>), 133.84 (СН<sub>аром</sub>), 166.45 (С=О), 168.3 (C=O), 212.29 (=C=). Масс-спектр: *m/z* 300 [*MH*]<sup>+</sup>, 299 [*M*]<sup>-</sup>. Вычислено С<sub>17</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub> (299.32), %: С, 68.21; H, 5.72; N, 4.68; O, 21.38. Найдено, %: С, 68.12; H, 5.81; N, 4.65.

Метил-8-(1,3-диоксоизоинодолин-2-ил)-2-метилокта-2,3-диеноат (V). Получен на основе 5-Nфталимидзамещенной аминогексановой кислоты в количестве 1.3 г и метил-2-(трифенилфосфоранилиден)пропионата. Выход 0.65 г (42%). Прозрачное маслообразное вещество. Спектр ЯМР <sup>1</sup>H: 1.42 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.74 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.81 (с, 3H, СН<sub>3</sub>), 2.13 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.63 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.72 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.38 (м, 1H, CH), 7.65 (м, 2H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.88 (м, 2H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С: 15.84 (CH<sub>3</sub>), 23.42 (CH<sub>2</sub>), 26.18 (CH<sub>2</sub>), 37.01 (CH<sub>2</sub>), 42.21 (CH<sub>2</sub>), 51.14 (CH<sub>3</sub>), 96.37 (C), 102.54 (CH), 123.08 (CH<sub>apon</sub>), 131.82 (С<sub>аром</sub>), 133.44 (СН<sub>аром</sub>), 162.35 (С=О), 171.63 (C=O), 219.84 (=C=). Масс-спектр: *m/z* 314 [*M*H]<sup>+</sup>, 313 [*M*]<sup>-</sup>. Вычислено С<sub>18</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub> (313.34), %: С, 68.99; H, 6.11; N, 4.47; О, 20.42. Найдено, %: С, 68.90; H, 6.19; N, 4.35.

Метил-12-изопропил-2-(7'-метокси-7'-оксогекса-4',5'-диен-1'-ил)-6,9а-диметил-1,3-диоксогексадекагидро-36,11-этенонафто[2,1-е]изоиндол-6-карбоксилат (IX). Получен на основе метил-5-*N*-малеопимаримидзамещенной аминовалериановой кислоты в количестве 2.56 г и метил(трифенилфосфоранилиден)ацетата. Выход 2.05 г (75%), желтое маслообразное вещество. ИК, v см<sup>-1</sup>: 2956, 2939, 1658, 1465, 740. Спектр ЯМР<sup>1</sup>Н: 0.54 (с, 3Н, Н17), 0.90 (м, 6Н, Н15, 16), 0. 96 и 1.41 (м, 2Н, Н9), 1.12 (с, 3Н, Н18), 1.15 и 1.45 (м, 2Н, Н5), 1.20 и 1.66 (м, 2Н, Н10), 1.40 (м, 1Н, Н9b), 1.52 (м, 2Н, Н8), 1.54 и 1.70 (м, 2Н, Н7), 1.68 и 2.45 (м, 2Н, Н4), 1.72 (м, 2Н, Н2'), 1.74 (м, 1Н, Н5а), 2.18 (м, 1Н, Н14), 2.40 (м, 2Н, Н3'), 2.49 (м, 1Н, НЗа), 2.72 (м, 1Н, Н11а), 2.98 (м, 1Н, Н11), 3.31 (м, 2Н, Н1'), 3.61 (с, 3Н, Н20), 3.68 (с, 3Н, Н8'), 5.33 (с, 1Н, Н13), 5.54 (м, 1Н, Н4'<sub>аллен</sub>), 5.56 (м, 1Н, Нб'<sub>аллен</sub>). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С: 15.56 (С17), 16.57 (C18), 17.11 (C8), 20.06 (C15), 20.88 (C16), 21.65 (C5), 24.72 (C2'), 26.64 (C3'), 27.76 (C10), 32.87 (C14), 35.22 (C4), 35.34 (C11), 36.43 (C7), 38.03 (C1'), 37.03 (C9a), 38.09 (C9), 40.48 (C3b), 44.77 (C11a), 47.34 (C6), 49.55 (C5a), 51.89 (C20),

51.96 (С8'), 52.43 (С3а), 54.22 (С9b), 88.58 (С4'<sub>аллен</sub>), 94.24 (С6'<sub>аллен</sub>), 124.18 (С13), 146.91 (С12), 166.30 (С7'), 177.23 (С1), 178.40 (С3), 179.10 (С19), 212.13 (С5'). Масс-спектр: *m/z* 550 [*M*]<sup>-</sup>, 552 [*M*H]<sup>+</sup>. Вычислено С<sub>33</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>6</sub> (551.71), %: С, 71.84; H, 8.22; N, 2.54. Найдено, %: С, 71.98; H, 8.40; N, 2.49.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Шитотоксические свойства соединений определяли in vitro с помощью МТТ-метода в 96-луночных планшетах [16]. Клетки линии НЕК293 и HepG2 культивировали в среде ДМЕМ (Биолот, Россия), клетки линии Jurkat – в среде RPMI (Биолот, Россия) в присутствии 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Invitrogen, США), 2 мМ L-глутамин и 50 мкг/мл гентамицина сульфата. После 24 ч культивирования в каждую лунку вносили исследуемые соединения в конечных концентрациях 1, 10, 100 мкМ (в 0.1% DMSO) и инкубировали в течение 48 ч, после чего добавляли МТТ-реагент и определяли оптическую плотность при 540 нм за вычетом измеренного фонового поглощения при 600 нм с помощью планшетного анализатора (2300 EnSpire® MultimodePlateReader: PerkinElmer, США). Значение концентрации соединений, вызывающее 50%-е подавление жизнеспособности клеток (IC<sub>50</sub>), определяли на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения GraphPadPrism v. 5.02 (Graph-PadSoftware Inc., США). Данные, полученные в 3 независимых экспериментах, выражали в виде среднего значения 3 измерений для каждой концентрации ± стандартная ошибка среднего, по отношению к значениям контроля (0.1% DMSO), принятого за 100%.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена по теме АААА-А17-117011910025-6 госзадания и при финансовой поддержке гранта Российского Фонда Фундаментальных Исследований № 18-53-41004. Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП "Химия" (УфИХ РАН), "Биомика" (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП "Агидель", Уфа).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dembitsky V.M., Maoka T. // Prog. Lipid Res. 2007. V. 46(6). P. 328–375.
- Hoffmann-Röder A., Krause N. // Angew. Chem. Int. Ed. 2004. V. 43. P. 1196–1216.
- Ban H.S., Onagi S., Uno M. // ChemMedChem. 2008. V. 3. P. 1094–1103.
- Гринштейн Дж., Виниц М. Химия аминокислот и пептидов. М: Мир, 1965. С. 578.
- Zhang F., Liu Sh., Lu X., Guo L., Zhang H., Che Y. // J. Nat. Prod. 2009. V. 72. P. 1782–1785.
- 6. Horler D.F. // J. Chem. Soc. C. 1970. V. 6. P. 859.
- Dembitsky V. M., Maoka T. // Progress in Lipid Research. 2007. V. 46. P. 328–375.
- 8. *Kim K.-N., Ahn G.* // Environmental Toxicology and Pharmacology. 2013. V. 35. P. 39–46.
- Hosokawa M., Wanezaki S. // Food Sci. Technol. Res. 1999. V. 5. P. 243.

- Kotake-Nara E., Kushiro M., Zhang H., Sugawara T., Miyashita K., Nagao A. // J. Nutr. L. 2001. V. 131. P. 3303.
- 11. Сахаутдинов И.М., Батыршин И.Р., Фатыхов А.А. // Ж. структ. хим. 2013. Т. 54. № 2. С. 331–335.
- 12. Sakhautdinov I.M., Gumerov A M., Batyrshin I.R. // Heterocycles. 2014. V. 89. P. 641-651.
- 13. Сахаутдинов И.М., Гумеров А.М., Гибадуллина Г.Г. // Химия природ. соед. 2015. Т. 51. С. 332.
- Сахаутдинов И.М., Гумеров А.М., Маликова Р.Н., Фатыхов А.А., Юнусов М.С. // Химия природ. соед. 2016. Т. 52. № 4. С. 562–565.
- Malikova R.N., Sakhautdinov I.M., Abdullin M.F., Mukhametyanova A.F., Yunusov M.S. // Chem. Nat. Compd. 2017. V. 53. P. 341–344.
- Mosmann T. // J. Immunol. Meth. 1983. V. 65. № 1–2. P. 55–63.

### Synthesis and Cytotoxic Activity of a Number of Functionalized 2,3-Allenoates

R. N. Malikova\*, I. M. Sakhautdinov<sup>\*, #</sup>, M. A. Maksimova\*\*, U. Sh. Kuzmina\*\*, Yu. V. Vakhitova\*\*, and M. S. Yunusov\*

<sup>#</sup>*Phone*: +7 (906) 104-48-19; e-mail: ioh039@mail.ru

\*Ufa Institute of Chemistry UFRC RAS, Prospect Oktyabrya 71, Ufa, 450054 Russia

\*\*Institute of Biochemistry and Genetics, Prospect Oktyabrya 71, Ufa, 450054 Russia

A series of new functionalized allenoates was obtained and their cytotoxic effect was investigated against tumor cell lines (HepG2, Jurkat) and normal origin (HEK293). Allenic compounds with diterpene fragment have the highest cytotoxic effect, which can be attributed to promising substances with potential antitumor activity.

Keywords: N-derivatives of amino acids, 2,3-dienoates,  $\omega$ -carboxyallenylphthalimides,  $\omega$ -carboxyallenylimides of maleopimaric acid, anti-tumor activity, cytotoxic activity



— ПИСЬМО РЕДАКТОРУ —

УДК 547.782.057

## СИНТЕЗ И ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОГО АНАЛОГА ХРОМОФОРА БЕЛКА КАЕDE

© 2020 г. С. О. Зайцева\*, Э. Р. Зайцева\*, \*\*, А. Ю. Смирнов\*, #, Н. С. Балеева\*, М. С. Баранов\*, \*\*\*

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

\*\*Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева,

Россия, 125047, Москва, Миусская площадь, 9

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

Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1 Поступила в редакцию 28.08.2019 г. После доработки 02.09.2019 г.

Принята к публикации 16.09.2019 г.

Синтезировано новое производное хромофора белка Kaede (Z)-2-(4-метоксибензилиден)-7-фенилимидазо[1,2-a]пиридин-3(2H)-он. Сравнение оптических свойств нового соединения и его известного аналога (5-((Z)-4-метоксибензилиден)-3-метил-2-((E)-стирил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он) показало, что максимумы поглощения и эмиссии нового соединения оказываются смещенными в более длинноволновую область благодаря увеличению сопряженной  $\pi$ -системы имидазолонового фрагмента молекулы.

Ключевые слова: имидазолоны, хромофоры, флуоресцентные красители, зеленый флуоресцентный белок, GFP, Kaede, оптические свойства DOI: 10.31857/S0132342320010157

Одним из важнейших современных методов исследования биологических объектов является флуоресцентная микроскопия. Активное развитие данного направления требует все возрастающего количества красителей с различными оптическими свойствами. Бензилиденимидазолоны – производные хромофоров многих флуоресцентных белков, в частности зеленых флуоресцентных белков (GFP), - одних из самых распространенных и многочисленных представителей флуоресцентных белковых красителей [1]. Причиной тому являются узкие пики испускания и поглощения, небольшой размер, низкая токсичность, водорастворимость, а также простота синтеза бензилиденимидазолонов и возможность значительно изменить оптические свойства производных варьированием заместителей [2-5]. Известно, что большинство живых объектов поглощают коротковолновое излучение, в малой степени поглощают длинноволновое излучение и почти полностью пропускают инфракрасное. Классические хромофоры GFP требуют для флуоресценции облучения фототоксичным синим или даже ультрафиолетовым светом, что ограничивает применение подобных соединений в биологических исследованиях, а потому актуальной задачей является поиск аналогов хромофора GFP со значительным батохромным сдвигом. Часто этого можно добиться увеличением размера сопряженной π-системы бензилиденимидазолонового остатка молекулы красителя. Например, бензилиденимидазолон со стирольным заместителем во втором положении имидазолонового цикла является хромофором белка Kaede (см. соединение (V), схема 1) с заметным батохромным смещением в сравнении с аналогичным хромофором GFP [6]. В частности, ранее в своих работах мы показали, что пиридиновые аналоги хромофора белка Kaede могут использоваться в качестве флуоресцентных меток в биологических объектах [7, 8]. Очевидно, что дальнейшее увеличение сопряженной π-системы приведет к смещению максимумов абсорбции и эмиссии в еще более длинноволновую область.

Сокращения: GFP – зеленый флуоресцентный белок.

<sup>&</sup>lt;sup>#</sup> Автор для связи: (тел.: +7 (905) 552-86-82; эл. почта: alexmsu@yandex.ru).



Схема 1. Схема синтеза производного (IV).

В данной работе мы решили сравнить оптические свойства классического хромофора белка Kaede с впервые синтезированным соединением (**IV**) малоизученного типа ауроноподобных красителей (схема 1). Известно, что подобные вещества могут быть эффективно использованы для мечения внутриклеточных объектов, а также имеют длинноволновые пики испускания и поглощения [9].

Соединение (**IV**) было синтезировано в соответствии с литературной методикой [10] получения йодпроизводного (**III**) с последующим арилированием. Сначала нами из 4-йодопиридин-2-амина был синтезирован этил-(4-иодопиридин-2-ил)глицинат (**I**), который затем подвергался кислотному гидролизу. Полученное соединение (**II**) конденсировали с анисовым альдегидом, в результате чего нами было выделено йодпроизводное (**III**). Затем в результате проведения стандартной реакции Сузуки-Мияуры в результате взаимодействия с фенилбороновой кислотой PhB(OH)<sub>2</sub> нами было синтезировано целевое соединение (**IV**).

Изучение оптических свойств полученного соединения (IV) (рис. 1, максимумы адсорбции и эмиссии 503 и 559 нм соответственно) в сравнении со свойствами производного (V) (максимумы адсорбции и эмиссии 424 и 540 нм соответственно) показало, что увеличение  $\pi$ -системы имидазолонового фрагмента приводит к значительному батохромному смещению максимумов абсорбции и эмиссии. Хотя стоксов сдвиг нового соединения оказался ниже, чем у образца сравнения, необходимо отметить, что его возбуждение при использовании в качестве флуоресцентной метки будет требовать более длинноволнового воздействия, которое меньше поглощается биологическими объектами и обладает меньшей фототоксичностью.

Таким образом, нами был получен новый фенилимидазопиридиновый аналог хромофора Kaede. Максимумы абсорбции и эмиссии данного соединения лежат в более длинноволновой области, чем у аналогичного хромофора Kaede (V), за счет создания дополнительных сопряженных  $\pi$ -связей в имидазолоновом фрагменте.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР ( $\delta$ , м.д.; *J*, Гц) зарегистрированы на приборе Bruker Avance III (700 МГц, США) при 303 К в DMSO-*d*<sub>6</sub> (внутренний стандарт – Me<sub>4</sub>Si). Спектры поглощения в УФ и видимом диапазоне регистрировали на спектрофотометре Varian Cary 100 Bio (США); спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (США). Температуры плавления определены на приборе SMP 30 (Великобритания) и не исправлены. Масс-спектры высокого разрешения записаны на приборе Bruker micrOTOF II, ионизация электрораспылением. Соединение (**V**) было получено по литературной методике [11].

**4-Йодопиридин-2-амин.** 2-Аминопиридин (4.7 г, 50 ммоль) растворяли в предварительно охлажденной до комнатной температуры смеси воды (6 мл), ледяной уксусной (120 мл) и концентриро-



Рис. 1. Спектры поглощения и эмиссии соединений (IV) и (V) в ацетонитриле.

ванной серной кислот (1 мл). При перемешивании добавляли йод (6 г, 23.6 ммоль) и NaIO<sub>4</sub> (1.6 г, 7.5 ммоль). Полученную смесь выдерживали при 80°С в течение 4 ч, после чего добавляли или 200 мл 10% раствора тиосульфата натрия и экстрагировали этилацетатом (3 × 150 мл). Органическую фазу промывали 10% раствором гидроксида натрия (3 × 60 мл) и рассолом (2 × 50 мл), сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, упаривали и очищали методом флеш-хроматографии (элюент – хлороформ–этиловый спирт, 50 : 1). Фиолетовый порошок (10.3 г, 94%); <sup>1</sup>Н-ЯМР: 8.04 (д,  $J_2$  2.1, 1H), 7.58 (дд,  $J_2$  8.6, 2.2, 1H), 6.35 (д,  $J_2$  8.6, 1H), 6.10 (уш.с., 2H).

Этил-*N*-(4-йодопиридин-2-ил)глицинат (I). 4-Йодопиридин-2-амин (5.50 г, 25 ммоль) растворяли в смеси хлорной кислоты (50%, 12.5 мл), воды (14 мл) и этилового спирта (28 мл), добавили глиоксаль (1.45 г, 25 ммоль). Полученную смесь кипятили в течение 9 ч, за прохождением реакции следили методом ТСХ в системе этилацетат-гексан, 1:1. По истечению указанного времени колбу охлаждали ледяной бане до 0°С, нейтрализовали насыщенным раствором гидрокарбоната натрия до pH 7 и экстрагировали хлороформом (3 × × 100 мл). Экстракт сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, упаривали и очищали методом флешхроматографии (элюент – хлороформ). Розовый порошок (1.76 г, 23%); т. пл. 56-59°С; <sup>1</sup>Н-ЯМР: 8.11 (д, J<sub>2</sub> 2.1, 1Н), 7.63 (дд, J<sub>2</sub> 8.8, 2.2, 1Н), 7.19 (т, J<sub>2</sub> 6.0, 1H), 6.50 (д, J<sub>2</sub> 8.8, 1H), 4.07 (к, J<sub>2</sub> 7.1, 2H), 3.97 (д, J<sub>2</sub> 6.1, 2H), 1.17 (т, J<sub>2</sub> 7.1, 3H); <sup>13</sup>С-ЯМР: 170.9, 157.1, 152.5, 143.9, 111.5, 76.6, 60.1, 42.4, 14.1; HRMS (ESI), *m/z*: найдено *M*, 306.9938; рассчитано для C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>, [*M* + H]<sup>+</sup> 306.9938.

*N*-(4-Йодопиридин-2-ил)глицин гидрохлорид (II). Этил (4-иодопиридин-2-ил)глицинат (I) (1.33 г, 4.3 ммоль) растворяли в 8.5 мл 5 М соляной кислоты и кипятили 6 ч. Реакционную смесь упаривали, полученный твердый остаток промывали диэтиловым эфиром (4 × 15 мл) и сушили. Белый порошок (1.02 г, 75%); т. пл. около 165°С с разложением; <sup>1</sup>Н-ЯМР: 8.16 (с, 1Н), 7.95 (д,  $J_2$  8.4, 1Н), 6.85 (д,  $J_2$  9.0, 1Н), 4.12 (с, 2Н); <sup>13</sup>С-ЯМР: 170.2, 153.2, 148.9, 142.7, 114.6, 74.9, 43.4; HRMS (ESI) m/z: найдено M 278.9623; рассчитано для  $C_7H_8IN_2O_2^+$ ,  $[M-CI]^+$  278.9625.

(Z)-7-Йодо-2-(4-метоксибензилиден)имидазо[1,2а]пиридин-3(2H)-он (III). (4-Йодопиридин-2ил)глицин гидрохлорид (II) (350 мг, 1.1 ммоль) помещали в колбу Шленка, которую вакуумировали, заполняли аргоном и затем добавляли в нее 2 мл трихлорида фосфора (22.9 ммоль). Полученную смесь кипятили в течение 3 ч, после чего упаривали в вакууме водоструйного насоса. К светло-голубому остатку в токе аргона добавляли анисовый альдегид (0.16 мл, 1.3 ммоль), пиридин (1.6 мл) и триэтиламин (0.45 мл). Реакционную смесь выдерживали при 80°С в течение 3 ч, а затем упаривали. Полученный остаток растворяли в хлороформе (50 мл), промывали насыщенным раствором гидрокарбоната натрия (20 мл), сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Полученный продукт был очищен флеш-хроматографией (элюент – хлороформ-гексан, 1:1). Красный порошок (21 мг, 5%); т. пл. около 260°С с разложением; <sup>1</sup>Н-ЯМР: 8.29 (д, J<sub>2</sub> 8.8, 2H), 7.99 (с, 1H), 7.42 (д, J<sub>2</sub> 9.7 1Н), 7.25 (с, 1Н), 7.06 (д, J<sub>2</sub> 8.8, 2Н), 6.88 (д, J<sub>2</sub> 9.7, 1Н), 3.84 (с, 3Н); <sup>13</sup>С-ЯМР: 165.2, 161.4, 153.2, 144.5, 135.8, 134.7, 130.8, 128.4, 127.3, 120.0, 114.5, 72.2, 55.4; HRMS (ESI), m/z: найдено M 378.9933; рассчитано для  $C_{15}H_{12}IN_2O_2^+$ ,  $[M + H]^+$ 378.9938.

(Z)-2-(4-Метоксибензилиден)-7-фенилимидазо[1,2-а]пиридин-3(2*H*)-он (IV). В колбу Шленка насыпали (Z)-7-йодо-2-(4-метоксибензилиден)имидазо[1,2-а]пиридин-3(2*H*)-он (III; 28 мг, 0.07 ммоль), фенилбороновую кислоту (12 мг, 0.10 ммоль) и карбонат цезия (120 мг, 0.37 ммоль).
109

Колбу вакуумировали, заполнили аргоном, в токе аргона добавляли толуол (2 мл) и Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (9 мг, 0.01 ммоль). Реакционную смесь выдерживали при 75°С 4 ч. затем добавляли хлористый метилен (50 мл) и промывали водой (2 × 80 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Продукт очищали флеш-хроматографией (элюент – хлористый метилен). Красный порошок (12 мг, 52%); т. пл. около 300°С с разложением; <sup>1</sup>Н-ЯМР: 8.33 (д, J<sub>2</sub> 8.8, 2H, H2", H6"), 7.98 (д, J<sub>2</sub> 0.8 1H, H6), 7.75 (дд, J<sub>2</sub> 9.6, 1.8, 1H, H9), 7.69 (д, J<sub>2</sub> 7.2, 2H, H2', H6'), 7.46 (т, J<sub>2</sub> 7.5, 2H, H3', H5'), 7.38 (т. J<sub>2</sub> 7.4, 1H, H4'), 7.28 (с. 1H, H7'), 7.15 (дд. J<sub>2</sub> 9.6, 0.8, 1H, H8'), 7.07 (д, J<sub>2</sub> 8.8, 2H, H3", H5"), 3.85 (c, 3H, OCH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C-*ЯМР*: 166.5 (C4), 161.3 (C4"), 154.3 (C2), 138.0 (C7), 136.7 (C7'), 135.1 (C5), 134.6 (C1'), 129.0 (C2", C6"), 127.8 (C3', C5'), 127.8 (C2', C6'), 127.4 (C4'), 125.7 (C1"), 122.2 (C9), 122.0 (C6), 118.8 (C8), 114.5 (C3", C5"), 55.4 (OCH<sub>3</sub>); HRMS (ESI) *m/z*: найдено *M* 329.1284; рассчитано для  $C_{21}H_{17}N_2O_2^+$ ,  $[M + H]^+$  329.1285.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 18-33-00075 мол\_а.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Walker C.L., Lukyanov K.A., Yampolsky I. V, Mishin A.S., Bommarius A.S., Duraj-Thatte A.M., Azizi B., Tolbert L.M., Solntsev K.M. // Curr. Opin. Chem. Biol. 2015. V. 27. P. 64–74.
- Ge S., Deng H., Su Y., Zhu X. // RSC Adv. 2017. V. 7. P. 17980–17987.
- Povarova N.V, Bozhanova N.G., Sarkisyan K.S., Gritcenko R., Baranov M.S., Yampolsky I.V., Lukyanov K.A., Mishin A.S. // J. Mater. Chem. C. 2016. V. 4. P. 3036– 3040.
- Chen C., Baranov M.S., Zhu L., Baleeva N.S., Smirnov A.Y., Zaitseva S.O., Yampolsky I.V., Solntsev K.M., Fang C. // Chem. Communs. 2019. V. 55 P. 2537–2540.
- Feng G., Luo C., Yi H., Yuan L., Lin B., Luo X., Hu X., Wang H., Lei C., Nie Z., Yao S. // Nucl. Acids Res. 2017. V. 45. P. 10380–10392.
- Yampolsky I. V, Kislukhin A.A., Amatov T.T., Shcherbo D., Potapov V.K., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2008. V. 36. P. 96–104.
- Baleeva N.S., Myannik K.A., Yampolsky I.V., Baranov M.S. // Eur. J. Org. Chem. 2015. V. 26. P. 5716–5721.
- Ermakova Y.G., Sen T., Bogdanova Y.A., Smirnov A.Y., Baleeva N.S., Krylov A.I., Baranov M.S. // J. Phys. Chem. Lett. 2018. V. 9. P. 1958–1963.
- Ermakova Y.G., Bogdanova Y.A., Baleeva N.S., Zaitseva S.O., Guglya E.B., Smirnov A.Y., Zagudaylova M.B., Baranov M.S. // Dye. Pigment. 2019. V. 170. P. 1075550.
- 10. Knott E.B. // J. Chem. Soc. 1956. P. 1360–1364.
- 11. Muselli M., Colombeau L., Hédouin J., Hoarau C., Bischoff L. // Synlett. 2016. V. 27. P. 2819–2825.

# Synthesis and Optical Properties of the New Kaede Chromophore Analogue

S. O. Zaitseva\*, E. R. Zaitseva\*\*, A. Yu. Smirnov\*, #, N. S. Baleeva\*, and M. S. Baranov\*, \*\*\*

<sup>#</sup>*Phone:* +7(905) 552-86-82; e-mail: alexmsu@yandex.ru

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

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

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

A novel derivative of Kaede protein chromophore was synthesised. Obtained compound showed the shift of absorption and emission maxima to the long-wavelength region in comparison with classical Kaede chromophore analogue due to increasing of the conjugated  $\pi$ -system in the imidazolone fragment.

Keywords: imidazolones, chromophores, fluorescent dyes, GFP, Kaede, optical properties



# ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ 2020

### ТЕМАТИКА ПУБЛИКАЦИЙ

Журнал "Биоорганическая химия" публикует статьи, посвященные структурным, структурнофункциональным и синтетическим исследованиям биологически значимых высокомолекулярных соединений (белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов и смешанных биополимеров любых типов). Предметом публикации для журнала являются также проблемы изучения химических основ деятельности высокоорганизованных частей клетки (клеточных мембран, рецепторных комплексов и др.), целых клеток или органов, проблемы нейро- и иммунохимии, биотехнологии, фундаментальные основы разработки диагностикумов на инфекционные и наследственные заболевания.

Большое внимание журнал уделяет также новым достижениям в области низкомолекулярных биорегуляторов. Рассматриваются исследования природных веществ (пептидов, пептидных и стероидных гормонов, липидов, витаминов, антибиотиков, простагландинов, алкалоидов и других соединений, выделяемых из микроорганизмов, грибов, высших растений или животных), их синтетических аналогов, а также синтетических биологически активных веществ (например, лекарств и пестицидов). Предметом публикации также могут быть химические аспекты экологических проблем, методы анализа природных токсикантов и ксенобиотиков и проблемы защиты окружающей среды от этих веществ.

#### ВИДЫ ПУБЛИКАЦИЙ

Основным типом публикаций являются статьи, содержащие результаты оригинальных экспериментальных и теоретических исследований. Представляемые работы должны отражать новые, ранее не публиковавшиеся данные. Максимальный объем статьи вместе с таблицами и списком литературы не должен превышать 40000 знаков (около 24 стандартных машинописных страниц, напечатанных через полтора интервала шрифтом Times New Roman, размер 12) и 8 рисунков.

Журнал публикует также обзоры и мини-обзоры важнейших достижений в области биоорганической химии. Максимальный объем обзора вместе с таблицами и списком литературы не более 60000 знаков (около 35 машинописных страниц) и 15 рисунков. Обзоры большего объема должны быть разбиты на несколько частей и могут быть опубликованы в двух или более номерах журнала. Максимальный объем мини-обзора — 17000 знаков (около 10 печатных страниц) и 5 рисунков. Авторы, планирующие опубликовать обзорную статью, должны вначале представить в редакцию ее аннотацию, содержащую обоснование актуальности предлагаемой темы, краткие данные о содержании и структуре обзора, его объеме, числе иллюстраций и ссылок на цитируемую литературу, временной охват цитирования, с целью предварительной оценки редколлегией целесообразности его публикации. Полный текст одобренного редколлегией обзора принимается далее к рассмотрению.

Под рубрикой "Письма Редактору" в журнале помещаются сообщения, содержащие новые, важные результаты, требующие срочной публикации. Объем "Письма Редактору" не должен превышать 3 машинописные страницы (5000 знаков) и 2 рисунка.

Журнал практикует выпуск тематических номеров, посвященных важным проблемам физикохимической биологии и событиям ее истории, а также номеров, формируемых по материалам докладов и сообщений с важнейших конгрессов, симпозиумов и конференций, проводимых в России. Решения о специальных и симпозиальных выпусках принимаются редколлегией по предварительным заявкам от оргкомитетов, представляемым в редакцию не позднее чем за 6 месяцев до предполагаемого события. Редколлегия назначает ответственных редакторов каждого тематического номера. Статьи, предлагаемые участниками конференции с одобрения оргкомитета и ответственных редакторов выпуска, рассматриваются и принимаются к печати по канонам обычных статей.

#### ПРЕДСТАВЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ В РЕДАКЦИЮ И ИХ ОФОРМЛЕНИЕ

Рукописи статей, включая иллюстративный материал (таблицы, схемы, рисунки), принимаются в редакцию в электронной форме (по эл. адресу: <u>rjbc@ibch.ru</u>) в объеме единого файла (со сплошной нумерацией страниц). Для подачи рукописи в журнал авторы могут воспользоваться авторским порталом Pleiades Publishing Ltd.:https://publish.sciencejornals.ru. Вместе с рукописью авторам необходимо представить в редакцию сопроводительное письмо, в котором гарантируется, что соответствующий материал (в оригинале или в переводе на другие языки или с других языков) ранее нигде не публиковался и не находится на рассмотрении для публикации в других журналах. В сопроводительном письме желательно также указать 2–3 возможных рецензентов указанной работы. Кроме того, авторы должны представить в редакцию договоры о передаче авторских прав с издателями русской и английской версии журнала.

Авторам в течение недели со дня поступления рукописи в редакцию направляется уведомление о ее получении.

При оформлении экспериментальных, обзорных статей и "Писем Редактору" необходимо придерживаться следующего порядка:

1. Индекс УДК

#### 2. ЗАГЛАВИЕ

3. Инициалы и фамилии авторов с пометками, позволяющими понять, в каких научных учреждениях (институтах) они работают

4. Полные названия учреждений, включая почтовый индекс и город, а для учреждения, в котором работает автор для переписки, — полный почтовый адрес

5. Аннотация объемом около 250 слов машинописного текста с изложением сути работы. В аннотации не рекомендуется использовать формулы, изготавливаемые в графическом формате. Аннотация представляет собой автономную часть рукописи, поэтому все вводимые в нее сокращения и условные обозначения должны быть расшифрованы здесь же

6. Ключевые слова

7. Список сокращений и контакты автора для переписки (даются в сноске на первой странице)

#### 8. Раздел ВВЕДЕНИЕ

9. Раздел РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

10. Раздел ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ. В начале раздела должны быть приведены данные об использованных реагентах, о применяемых приборах, их происхождении, описание типовых методов и методик и т.п.

11. Раздел БЛАГОДАРНОСТИ приводится при необходимости. Авторам следует включать в него сообщения о полезных обсуждениях и дискуссиях, благодарности коллегам и рецензентам (в особых случаях); сообщения о предоставлении материалов, данных, компьютерного обеспечения, приборов во временное пользование; информация о проведении исследований в центрах коллективного пользования; помощь в технической подготовке текста; а также все прочее, что оценивается как полезная помощь.

 Раздел ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА включает в себя информацию о грантах и любой другой финансовой поддержке исследований. Сокращенные названия институтов и спонсирующих организаций в данном разделе недопустимы.

13. Раздел СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ является обязательным разделом, который может содержать несколько подразделов (О СОБЛЮДЕНИИ СТАНДАРТОВ РАБОТЫ С ЖИВОТНЫМИ; ОБ ИССЛЕДОВАНИЯХ, ГДЕ В КАЧЕСТВЕ ОБЪЕКТОВ ВЫСТУПАЛИ ЛЮ-ДИ). Этот раздел должен присутствовать во ВСЕХ статьях (независимо от того, были ли вовлечены животные и люди в эксперименты в какой-либо конкретной статье).

14. Раздел КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ является обязательным разделом и должен присутствовать во BCEX рукописях. Раздел должен содержать стандартную формулировку: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

15. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (на отдельной странице). Список литературы оформляется в основном соответственно ГОСТу 7.1 – 84 с. При цитировании статьи, опубликованной в "Биоорган. химии", в списке литературы следует привести под тем же номером выходные данные "Russ. J. Bioorgan. Chem.", включая фамилии авторов в английской транскрипции (для переводной версии журнала): Михалева И.И., Иванов В.Т., Войтенков В.Б., Вечканов Е.М., Бондаренко Т.И. // Биоорган. химия. 2013. Т. 39. С. 277–284. [Mikhaleva I.I., Ivanov V.T., Voitenkov V.B., Vechkanov E.M., Bondarenko T.I. // Russ. J. Bioorg. Chem.. 2013. V. 39. P. 245–251. doi 10.1016/S0040-4020(01)93924-9]

16. RESUME – английская версия пунктов 2–5

17. Подписи к рисункам и схемам (все вместе на отдельной странице)

18. Рисунки, схемы и химические формулы (каждый иллюстративный материал на отдельной странице)

19. Таблицы (каждая на отдельной странице со своим заголовком).

Шаблон для оформления рукописи см. на сайте Журнала в разделе "Для авторов": http://www.rjbc.ru/.

При написании рукописи следует употреблять латинские названия животных, растений и микроорганизмов (род и вид – курсивным шрифтом; таксоны более высокого уровня – прямым); при первом упоминании в аннотации и в тексте род должен называться полностью. Названия ферментов необходимо давать в соответствии с классификацией IUB, приводя в скобках классификационный номер (КФ). Названия химических соединений должны соответствовать номенклатуре, рекомендованной номенклатурным комитетом Международного союза теоретической и прикладной химии IUPAC и Международного союза биохимии IUB. Все сокращения названий химических соединений даются в Журнале в латинской транскрипции.

## РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ РУКОПИСЕЙ И ПОДГОТОВКА ИХ К ПЕЧАТИ

Все статьи, поступающие в редакцию, проходят двухступенчатое рецензирование (фамилии рецензентов авторам не сообщаются). Для первичного рецензирования рецензенту дается 14 календарных дней. Для вторичного рецензирования — 7 календарных дней. Статьи, принятые к публикации, тщательно редактируются. Небольшие исправления стилистического, номенклатурного или формального характера вносятся редактором в статью без согласования с авторами. Более серьезные исправления, обсуждаются с авторами или статья направляется авторам на доработку. При доработке авторам следует внести в текст все необходимые с их точки зрения исправления, а свою позицию по неучтенным исправлениям и комментарии по всем замечаниям изложить в ответном письме в редакцию. Рукопись, направленная авторам на доработку, должна быть возвращена в исправленном чистовом виде в течение 7 календарных дней. К переработанной рукописи авторам необходимо приложить письмо с описанием сделанных исправлений и содержащее ответы на все замечания рецензента и редактора.

## Датой принятия к печати считается дата поступления версии, удовлетворяющей всем требованиям рецензентов и редактора.

Доработанные статьи, возвращенные в редакцию более чем через 2 месяца после направления из редакции, регистрируются как новые и получают новую дату поступления. Очередность публикации устанавливается по дате принятия к печати. Работы, признанные редколлегией приоритетными и высокозначимыми, а также статьи, требующие скорейшей публикации по причинам, затрагивающим интересы авторов и признанными редколлегией заслуживающими внимания, публикуются вне очереди, если процесс подготовки рукописи не требует существенной доработки авторами.

После опубликования статьи автору, указанному для связи, высылаются издателем электронные варианты русской и английской версии статьи в формате PDF.

## ОТЧЕТНОСТЬ И СПРАВКИ О ПРИНЯТИИ СТАТЬИ В ПЕЧАТЬ

До выхода статьи в свет и ее появления в базах данных редакция журнала (по запросу автора) может выдать справку о принятии статьи в печать с указанием только года принятия, например: "...статья прошла все этапы работы и принята к печати в 2020 году". Справка с указанием конкретного номера, в котором статья будет опубликована, может быть выдана авторам только после регистрации статьи в научной электронной библиотеке eLIBRARY.RU. Автору не рекомендуется указывать в отчетах (не оповестив при этом редакцию журнала) конкретный номер, в котором планируется выход его статьи, если она еще не вышла в свет (например, на этапе корректуры или при согласовании правки). Справка о принятии рукописи в печать выдается на официальном бланке редакции журнала за подписью заведующего редакцией. Письма и иные оповещения от редакции журнала не являются формой отчета о принятии рукописи в печать.

Редколлегия оставляет за собой право отклонить статью по следующим причинам:

1) несоответствие профилю журнала;

2) недостаточная значимость полученных результатов;

3) нечеткая формулировка целей и задач исследования;

4) несоответствие современному уровню исследований;

5) недостаточная обоснованность выводов литературным или экспериментальным материалом;

6) описанные результаты уже опубликованы достаточно полно авторами статьи или другими исследователями;

7) неудовлетворительные литературные качества статьи и/или ее оформление, несоответствие оформления "правилам для авторов";

8) в варианте, полученном редакцией после двукратной доработки авторами, не учтены (без соответствующего обоснования) все замечания рецензента.

С полным вариантом правил для авторов и с перечнем символов/обозначений, принятых в журнале "Биоорганическая химия", вы можете ознакомиться на сайте журнала: http://www.rjbc.ru/.