

СОДЕРЖАНИЕ

Том 46, номер 5, 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.

Липидом кораллов и его изменение в процессе обесцвечивания (Обзорная статья)

Т. В. Сикорская, А. Б. Имбс 451

Активные формы кислорода: участие в клеточных процессах и развитии патологии (Обзорная статья)

Т. И. Шлапакова, Р. К. Костин, Е. Е. Тягунова 466

Физико-химические процессы – вероятные родоначальники жизни (Обзорная статья)

С. П. Коваленко 486

Регуляция свойств липидных мембран при взаимодействии с 2-гидроксипропил β-циклодекстрином. Молекулярные детали

А. А. Скуредина, А. С. Тычинина, И. М. Ле-Дейген, Н. Г. Белозурова, Е. В. Кудряшова 505

Получение и характеристика гуманизованного нейтрализующего антитела против интерферона-бета человека

В. С. Рыбченко, А. А. Панина, В. Н. Новоселецкий, Д. С. Балабашин, С. А. Якимов, О. Н. Солопова, П. Г. Свешников, Т. К. Алиев, Д. А. Долгих, М. П. Кирпичников 517

Механизм ингибирующего действия анионных полиамидоамин дендримеров генерации 1.5–3.5 на активность фибринолитической системы

Р. Б. Айсина, Л. И. Мухаметова, Е. М. Иванова 528

Новые структурные фрагменты молекул химических регуляторов роста и развития растений, стимулирующие ризогенез

Р. Г. Гафуров, И. В. Мартынов, Г. А. Романов 540

Письмо редактору

Одновременное встраивание модифицированных производных dU и dC в растущую цепь ДНК в реакции удлинения праймера и ПЦР

А. В. Чудинов, В. Е. Шершов, А. С. Павлов, О. С. Волкова, В. Е. Кузнецова, А. С. Заседателев, С. А. Лапа 546

Мультиплексная ПЦР для выявления бактериальных возбудителей инфекционной пневмонии

С. А. Лапа, Е. С. Ключихина, Р. А. Мифтахов, А. М. Золотов, А. С. Заседателев, А. В. Чудинов 550

Синтез и оптические свойства конформационно-фиксированных индолиевого и индолинового производных хромофора GFP

Н. С. Балеева, А. Ю. Смирнов, И. Н. Мяснянко, М. С. Баранов 553



УДК 577.115.3:577.125.3

ЛИПИДОМ КОРАЛЛОВ И ЕГО ИЗМЕНЕНИЕ В ПРОЦЕССЕ ОБЕСЦВЕЧИВАНИЯ

© 2020 г. Т. В. Сикорская*, #, А. Б. Имбс*

**ФГБУН “Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского” ДВО РАН,
Россия, 690041 Владивосток, ул. Пальчевского, 17*

Поступила в редакцию 30.03.2020 г.

После доработки 04.04.2020 г.

Принята к публикации 06.04.2020 г.

Многочисленные виды коралловых полипов составляют структурную основу тропических коралловых рифов. Ткани коралловых полипов богаты липидами. В настоящее время обобщена информация о составе жирных кислот и классов липидов кораллов, однако каждый класс липидов представляет собой сложный спектр молекулярных видов липидов, который определяется как липидом биологической системы. Научных работ по липидому человека и высших наземных животных опубликовано на два порядка больше, чем по липидому морских организмов, при этом данные о липидоме кораллов очень разрозненные. Существование симбиотических видов кораллов полностью зависит от наличия внутриклеточных микроводорослей – зооксантелл, потеря которых называется обесцвечиванием кораллов и приводит к гибели всего кораллового рифа. При обесцвечивании происходят существенные изменения липидного профиля кораллов. В настоящей работе обобщена информация о составе общих липидов, жирных кислот и молекулярных видов полярных и неполярных классов липидов восьмилучевых и шестилучевых коралловых полипов, а также их симбионтов, дано общее представление о механизмах обесцвечивания кораллов и показана важность липидных показателей при исследовании этого процесса. Переход от классических интегральных показателей к липидному анализу открывает новые возможности в изучении биохимии и экологии кораллов.

Ключевые слова: липидом, молекулярные виды липидов, кораллы, обесцвечивание кораллов, липидомика, масс-спектрометрия

DOI: 10.31857/S0132342320050231

ВВЕДЕНИЕ

Коралловые рифы служат домом для многих видов донных и пелагических морских организмов [1]. Структурную основу рифа составляют твердые, или рифообразующие, кораллы (шестилучевые коралловые полипы, Anthozoa: Hexacorallia: Scleractinia), которые имеют твердый известковый экзоскелет. Отмершие участки колоний твердых кораллов заселяют мягкие кораллы (восьмилуче-

вые коралловые полипы, Anthozoa: Octocorallia), которые можно разделить на горгонарии (Gorgonacea), имеющие внутри колоний кератиноподобный осевой скелет, и альционарии (Alcyonacea), содержащие внутри колонии мелкие известковые спиккулы. На коралловом рифе часто встречаются другие представители шестилучевых коралловых полипов – зоантарии (Anthozoa: Hexacorallia: Zoanthidea), колонии которых, в отличие от твердых кораллов, не имеют экзоскелета, но, подобно альционариям, содержат известковые спиккулы. Большинство видов коралловых полипов являются симбиотическими животными, которые содержат внутриклеточные симбиотические микроводоросли (динофлагелляты семейства Symbiodiniaceae) или зооксантеллы.

Ткани коралловых полипов богаты липидами, которые составляют до 30% сухой массы тканей колоний кораллов [2]. Более половины общих липидов кораллов составляют нейтральные липиды (НЛ) [3], к которым относятся триацилглицериды (ТГ), моноалкилдиацилглицериды (МАДАГ), сложные эфиры алифатических спиртов и жир-

Сокращения: ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ДГДГ – дигалактозилдиацилглицериды; ЖК – жирные кислоты; ЦАЭФ – керамидаминоэтилфосфонаты; МАДАГ – моноалкилдиацилглицериды; МГДГ – моногалактозилдиацилглицериды; МС/МС – тандемная масс-спектрометрия; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; СХДГ – сульфохиновозилдиацилглицериды; ТГ – триглицериды; ТПЖК – тетракозаполиеновые кислоты; ФИ – инозитглицерофосфолипиды; ФС – серинглицерофосфолипиды; ФХ – холинглицерофосфолипиды; ФЭ – этаноламинглицерофосфолипиды; ЭВ – эфиры восков; АРСИ – химическая ионизация при атмосферном давлении; ESI – ионизация распылением в электрическом поле.

Автор для связи: (тел.: +7 (423) 231-09-37; эл. почта: miss.tatyanna@yandex.ru).

ных кислот (ЖК), или воски (ЭВ), а также стеринны и эфиры стериннов [2, 4, 5]. В липидах зооксантелл содержится ряд гликолипидов (ГЛ): моно-, дигалактозилдиацилглицериды (МГДГ и ДГДГ) и сульфохинозилдиацилглицериды (СХДГ), которые характерны для мембран фотосинтетического аппарата растений [6]. А также характерные для растительных клеток бетаиновые липиды (БЛ). Фосфорсодержащие липиды (ФЛ) составляют 13–50% от общих липидов тропических кораллов [2, 7]. В состав ФЛ кораллов входят этаноламин-, холин-, серин- и инозитглицерофосфолипиды (ФЭ, ФХ, ФС и ФИ соответственно), лизофосфатидилхолин (ЛФХ), лизофосфатидилэтанолламин (ЛФЭ), а также фосфолипид – церамидаминоэтилфосфонат (ЦАЭФ) [8, 9]. В коралловых полипах НЛ служат основным резервом энергии, а ФЛ и стеринны выполняют структурную функцию и составляют основу клеточных мембран [10].

Общие липиды коралловых полипов содержат более десяти основных классов липидов, однако каждый класс липидов представляют собой сложную смесь индивидуальных молекул, неполярная часть которых различается по остаткам ЖК и алифатических спиртов. Кораллы, как и другие биологические объекты, содержат сотни молекулярных видов липидов. По аналогии с геномом, протеомом и метаболомом, общий спектр липидных молекул биологической системы определяется как липидом, а картирование спектра липидов и определение их биологической роли называется липидомикой [11].

Существование симбиотических видов коралловых полипов полностью зависит от наличия зооксантелл, которые в процессе фотосинтеза вырабатывают питательные вещества, обеспечивая до 90% энергии, необходимой организму-хозяину [12]. При температуре воды выше 32°C зооксантеллы покидают своего хозяина; потеря зооксантелл называется обесцвечиванием (bleaching). Полное обесцвечивание под действием температурного стресса приводит к гибели не только отдельных животных, но и целых морских экосистем, основой которых являются симбиотические животные, в частности, экосистем коралловых рифов. В процессе обесцвечивания в организме коралла происходят существенные изменения, которые также отражаются и на их липидном профиле. Исследования, касающиеся изменений липидных показателей в процессе обесцвечивания кораллов [5, 13–15] и их симбионтов [16–19] не многочисленны, и лишь недавно было проведено детальное исследование изменений, происходящих в полном липидоме мягкого коралла *Sinularia* sp., в условиях экспериментального температурного стресса [20].

В настоящее время, благодаря появлению новых инструментальных методов, липидомный ана-

лиз широко применяется для диагностики многих заболеваний, связанных с нарушением липидного обмена [21, 22]. При этом количество опубликованных научных работ по липидому человека и высших наземных животных на два порядка превышает количество исследований липидома морских организмов. Данные о полном липидоме кораллов и других видов морских беспозвоночных очень ограниченные и разрозненные. Переход от классических интегральных липидных показателей к липидному анализу может открыть новые возможности в изучении биохимии и экологии кораллов. Фундаментом для такого рода исследований является расшифровка полного липидома коралловых полипов. Целью настоящей работы является обобщение информации, касающейся изучения липидных профилей кораллов, а также их симбионтов, и изменений липидных показателей при неблагоприятных условиях окружающей среды.

СИМБИОТИЧЕСКИЙ ОРГАНИЗМ КОРАЛЛА И ЕГО ОБЕСЦВЕЧИВАНИЕ

Почти половина беспозвоночных животных типа Cnidaria, к которым относится класс коралловых полипов (Anthozoa), содержит фотосинтетические микроорганизмы (зооксантеллы), которые придают им свойства растений – это привело к рождению концепции голобионта или метаорганизма. Такая ассоциация растительных симбионтов и животного организма-хозяина коралла сформировала целую экосистему кораллового рифа, который считается “оазисом в пустынном океане”. Огромная важность экосистем коралловых рифов и реальная угроза их исчезновения стали поводом для тщательного изучения книдарий [23].

Симбиотические динофлагелляты семейства Symbiodiniaceae обычно расположены внутри клеток гастродермиса кишечнораотового организма-хозяина (то есть, самого внутреннего тканевого слоя, который граничит с гастроваскулярной полостью), где они связаны мембранным комплексом, состоящим из мембраны водорослевого происхождения и наружной мембраны животного организма-хозяина [24, 25]. Зооксантеллы могут передаваться по наследству [26] или, чаще всего, захватываются из окружающей среды [27].

В дополнение к высокой освещенности и убежищу зооксантеллы, в обмен на фотосинтетически фиксируемый углерод, получают от организма-хозяина неорганический азот, фосфор и углерод [28]. В случае твердых кораллов симбиоз также тесно связан со способностью кораллов образовывать массивные известковые скелеты, которые образуют коралловые рифы. Партнерство книдарий–динофлагелляты имеет особое экологическое значение в среде тропических коралловых рифов, в которой недостаточно экзогенного

питания организма-хозяина коралла, и питательные вещества, получаемые симбионтами с помощью процесса фотосинтеза, поддерживают метаболизм, рост, размножение и выживание колоний кораллов [29, 30].

Клетки *Symbiodiniaceae* имеют золотисто-коричневый цвет из-за присутствия различных пигментов в их хлоропластах. Здоровые кораллы содержат миллионы клеток зооксантелл на квадратный сантиметр ткани и поэтому имеют такой же золотисто-коричневый оттенок. Обесцвечивание кораллов называется так из-за потери цвета тканей организма-хозяина коралла и обнажения лежащего в основе белого известкового скелета. Эта потеря цвета чаще всего обусловлена дисфункцией симбиоза, то есть потерей симбионтов тканями полипа [31]. Обесцвечивание — это реакция на стресс, вызванный изменениями окружающей среды, например, повышения температуры поверхности моря, связанного с глобальным потеплением, в сочетании с высокой степенью солнечной радиации [32]. Симбиотический организм коралла очень чувствителен к температуре, даже умеренное повышение температуры на 1–2°C может привести к обесцвечиванию всего рифа [32].

Начинается процесс обесцвечивания в хлоропластах зооксантелл, повышенная температура и высокий уровень солнечной радиации вызывают фотоингибирование, повреждение хлоропластов и фотосинтетических аппаратов клеток, что ведет к взаимосвязанным процессам запуска каскада обесцвечивания [28, 33]. В каскадном механизме обесцвечивания самого организма-хозяина ключевую роль играет окислительный стресс, который в животном организме модулирует гибель/выживание клеток [34] и связан с врожденным иммунитетом организма [35]. При окислительном стрессе происходит накопление монооксида азота (NO), который участвует в межпартнерском взаимодействии и задействован в иммунном ответе коралла [35, 36]. Взаимодействие хозяин-микроорганизм обусловлено способностью вторгающихся микроорганизмов уклоняться от иммунного ответа хозяина и контролировать его, а также способностью хозяина обнаружить и уничтожить патогенные микроорганизмы [37]. Мутуализм книдарий — динофлагелляты можно рассматривать как контролируемую инфекцию, благодаря которой симбионты успешно модулируют иммунный ответ хозяина. Таким образом, можно сказать, что обесцвечивание — это процесс обнаружения патогенных зооксантелл и уничтожение их организмом-хозяином коралла. Симбионты сигнализируют о своем присутствии выработкой реактивных форм кислорода (АФК) при фотоингибировании, а организм-хозяин, в свою очередь, вырабатывая NO, запускает иммунный ответ для избавления от патогенных микроорганизмов [37].

В стрессовых условиях наблюдается и запрограммированная (апоптоз), и неконтролируемая (некроз) гибель клеток [38, 39]; кроме того сам организм-хозяин уничтожает зооксантеллы. Дан и коллеги предположили, что с помощью апоптоза организм, удаляя поврежденные клетки симбиосом, смягчает повреждения тканей от АФК и тем самым поддерживает гомеостаз тканей [38]. Существует переход от апоптоза при умеренном и коротком температурном стрессе к некрозу при более жестких стрессовых условиях [40, 41]. Другая форма гибели клеток, аутофагия, также участвует в процессе обесцвечивания кораллов [42]. Стресс приводит к изменениям в созревании лизосом и слиянию их с симбиосомами, предположительно, приводящему к перевариванию симбионта [43]. Предполагается, что существует взаимосвязь между двумя формами гибели клеток, при этом, когда одна форма ингибируется, другая — индуцируется. Подобная связь между апоптозом и аутофагией наблюдается у позвоночных [44].

ЛИПИДНЫЙ ПРОФИЛЬ КОРАЛЛОВ

Измерение интегральных липидных показателей (уровня общих липидов, содержания основных классов липидов и состава ЖК) до недавнего времени было одним из основных методических подходов при изучении эффективности репродуктивной стратегии кораллов, степени повреждения и скорости восстановления частично обесцвеченных рифов, пищевых и симбиотических отношений кораллов, а также транспорта органического углерода между симбионтами и организмом-хозяином [15, 45–49]. Со времени первых скрининговых исследований кораллов [50], накоплена обширная информация о составе общих липидов и ЖК, полученных гидролизом общих липидов или их классов [51–53]. В последние 10 лет благодаря развитию современных физико-химических методов анализа липидов, которые позволяют установить структуры молекул липидов в нативном виде, стали применять липидомный подход в изучении липидов книдарий и их зооксантелл [19, 20, 54–57]. Появились первые результаты в области липидомики морских организмов, например, макроводорослей [58], кальмаров [59], актиний [60] и гидрокораллов [57]. Среди коралловых полипов, насчитывающих более 20 тысяч видов, описан состав молекулярных видов ФЛ четырех альционарий [54–56], профиль ФХ рифообразующего коралла *Seriatopora caliendrum* [61–63], полные липидомы мягкого коралла *Sinularia seaesensis* [64] и зоантарии *Palythoa* sp. [65], а также изучены изменения липидома мягкого коралла *Sinularia* sp., происходящие под действием повышенной температуры [20].

*Липиды восьмилучевых кораллов
(Anthozoa: Octocorallia)*

Содержание липидов на сухой вес октокораллов варьируется от 3.2 до 29.7% [2, 66]. Липиды мягких кораллов о. Окинава и Берингова моря содержали 23.7 и 31.1% ФЛ от суммы липидов соответственно [2, 67]. Тропические мягкие кораллы содержали ФЛ в среднем $32.1 \pm 10.3\%$ от суммы липидов [7]. Липидный экстракт тропической альционии *Sinularia saesensis* содержал 2.14% ФЭ, 2.53% ФХ, 1.50% ФС, 0.32% ФИ, 0.71% ЦАЭФ и 1.35% ЛФХ [64]. В липидах холодноводной альционии *Gersemia rubiformis* были обнаружены ФХ ($31.4 \pm 6.2\%$), ФЭ ($25.6 \pm 1.5\%$), ФС ($14.1 \pm 3.2\%$), ЦАЭФ ($15.6 \pm 1.4\%$) и церамидметиламиноэтилфосфонат (ЦМАЭФ) ($13.3 \pm 3.0\%$) [67].

Основными классами неполярных липидов октокораллов, как и гексакораллов, являются воски, ТГ и МАДАГ. В липидах *G. rubiformis* (Берингово море) и тропической альционии *Xenia* sp. (Южно-Китайское море) доля восков составила 29.5 ± 4.9 и $21.4 \pm 1.8\%$ от суммы липидов, соответственно [55, 67]. Общие липиды альционии *S. saesensis* содержали 18.25% восков [64]. Среднее содержание МАДАГ в общих липидах холодноводных альционий (Ньюфаундленд и Лабрадор) составило от 13.7 ± 8.2 до $19.7 \pm 10.10\%$, а доля ТГ была меньше: от 5.59 ± 3.38 до $10.40 \pm 5.11\%$ [4]. Общие липиды альционии *S. saesensis* содержали 5.83% ТГ и 7.79% МАДАГ [64].

В отличие от шестилучевых кораллов, ЖК общих липидов восьмилучевых кораллов содержат две тетракозаполиеновые ЖК (ТПЖК), 24:5n-6 и 24:6n-3 [68]. ТПЖК являются хемотаксономическими маркерами животных подкласса Octocorallia, синтезируются в клетках коралловых полипов без участия симбионтов и могут быть липидными маркерами организма-хозяина в симбиотических видах [69].

Основными ЖК симбиотических альционий рода *Sinularia* были 14:0, 16:0, 7-Me-16:1n-10, 16:1n-7, 16:2n-7, 18:0, 18:1n-9, 18:4n-3, 20:4n-6, 20:5n-3, 22:6n-3, 24:5n-6 и 24:6n-3. Содержание 20:4n-6 варьировалось от 10.2 до 23.8% от суммы ЖК. Основной n-3 ПНЖК была 18:4n-3 (в среднем 5.4%); типичные ПНЖК морских организмов, 20:5n-3 и 22:6n-3, составили не более 2.4 и 3.9% от суммы ЖК, соответственно [70]. Основными ЖК асимбиотических альционий рода *Dendronephthya* были 24:5n-6 (12.7%), 16:0 (12.1%), 18:0 (6.0%), 7-Me-16:1n-10 (4.8%), 24:6n-3 (4.0%) и 20:4n-6 (2.0%) [7, 71].

Первый анализ полярного липида коралла был сделан на примере тропической альционии *Xenia* sp. [55]. Основными классами ФЛ этого вида были ФЭ, ФХ, ФС, ФИ и ЦАЭФ. С помощью сочетания высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии вы-

сокого разрешения идентифицировали 32 молекулярных вида ФЛ, в которых преобладали 18:0alk/20:4 ФХ (20.5%), 18:1alk/20:4 ФЭ (18.0%), 18:0alk/24:5 ФС (14.0%), 16:0 ЦАЭФ (9.6%) и лизо-18:0 ФХ (4.1%). Алкилацильная форма преобладала в молекулярных видах ФЭ, ФХ и ФС, а диацильная форма – в ФИ. Основной кислотой ФЛ была 24:5n-6, а 20:4n-6 преобладала в ФЭ и ФХ.

В работе Имбса и др. [54] исследовали распределение ТПЖК между различными классами ФЛ в альциониях *Sinularia macropodia* и *Capnella* sp., собранных у побережья Вьетнама. Идентифицировали более 32 молекулярных видов четырех классов фосфолипидов (ФЭ, ФХ, ФС и ФИ). Молекулярные виды ФЭ 18:1alk/20:4, ФХ 18:0alk/20:4, ФС 18:0alk/24:5 и ФИ 18:0/24:5 были основными среди фосфолипидов *S. macropodia* и *Capnella* sp. Как и в предыдущей работе [55], среди молекулярных видов ФХ и ФС преобладали алкилацильные формы. ТПЖК были основными кислотами, входящими в состав ФС, а 20:4n-6 входила в состав большинства молекулярных видов ФЭ и ФХ.

Был установлен полярный липидом асимбиотической альционии *G. rubiformis* из Охотского моря [56]. Было идентифицировано 68 молекулярных видов фосфолипидов (ФХ, ФЭ, ФС и ФИ). Обнаружили существенное сходство полярного липида холодноводной альционии *G. rubiformis* и тропических видов альционий. Основными молекулярными видами были ФЭ 16:1alk/20:4, ФХ 16:0alk/20:4, ФС 20:1/24:5 и ФИ 16:0/24:5. Так же как и в тропических альциониях, ТПЖК концентрировались в ФС и, частично, в ФИ. Среди ФЛ холодноводной альционии были обнаружены интересные алкилацильные и диацильные молекулярные виды, которые отсутствовали у тропических альционий, например, ФЭ 20:1alk/20:4, ФЭ 20:2alk/20:4, ФХ 20:1alk/20:4, ФХ 20:1alk/20:5, ФХ 20:1/20:5, ФС 20:1alk/24:5, ФС 20:1alk/24:6, ФИ 20:1/20:4 и ФИ 20:1/20:5. Присутствие молекулярных видов, содержащих C₂₀ мононенасыщенные ацильные и алкильные группы, является специфической особенностью липида *G. rubiformis* [56].

Впервые полный липидом коралла был расшифрован на примере тропической альционии *S. saesensis* [64]. В полярной части липида *S. saesensis* идентифицировали 52 молекулярных вида ФЛ: главными компонентами были (в процентах от общих липидов) ФС 18:0alk/24:5 (1.202%), ЛФХ 18:0alk (1.055%), ФЭ 18:1alk/20:4 (0.909%), ФХ 18:0alk/20:4 (0.510%), ЦАЭФ 18:2b/16:0 (0.433%), СХДГ 14:0/16:0 (0.410%), ФИ 18:0/24:5 (0.196%) (табл. 1). Молекулярный вид ФС 18:0alk/24:5, содержащий остаток ТПЖК, является одним из ключевых компонентов липида *S. saesensis*. Сравнение полярных липидомов *S. saesensis* и других тропических альционий [57]

подтверждает, что подавляющее большинство молекулярных видов ФЭ, ФХ и ФС этих животных находятся в алкилацильной форме, в то время как для молекулярных видов ФИ характерна диацильная форма (табл. 1) [64].

Главными компонентами неполярного липидома альционии *S. siaesensis* были (в процентах от общих липидов) цетилпальмитат (16:0/16:0), цетилстеарат (16:0/18:0) и стеарилпальмитат (18:0/16:0) (в сумме 14.07%); гексадекадиеноилдипальмитоилглицерин (16:2/16:0/16:0) и трипальмитин (16:0/16:0/16:0) (в сумме 3.51%); 1-*O*-октадецил-2,3-дипальмитоил-*sn*-глицерин (18:0alk/16:0/16:0), 1-*O*-гексадецил-2-пальмитоил-3-стеароил-*sn*-глицерин (16:0alk/16:0/18:0) и 1-*O*-гексадецил-2,3-дипальмитоил-*sn*-глицерин (16:0alk/16:0/16:0) (в сумме 3.87%) [64]. В неполярном липидоме исследованной альционии доминировали насыщенные молекулярные виды, а ненасыщенные составили не более 6.8% от суммы восков; аналогичное распределение было найдено в двух других видах симбиотических альционий [72]. ПНЖК зооксантелл, таких как 18:3n-6, 18:4n-3 и 18:5n-3 не были обнаружены в восках *S. siaesensis* [64], так же как и в ЭВ других видов кораллов [72, 73].

Большую часть ацильных групп ТГ и МАДАГ из тропической альционии *S. siaesensis* составляли остатки насыщенных ЖК 16:0 и 18:0 (табл. 1) [64], однако наибольший интерес вызвали ненасыщенные молекулярные виды этих липидных классов. Остатки ПНЖК преимущественно находились в молекулах ТГ в положениях *sn*-1(3), а в молекулах МАДАГ – в положении *sn*-2. Это может быть результатом разницы в путях биосинтеза ацильных (ТГ) и этерных (МАДАГ) глицеролипидов. Из фосфатидной кислоты образуется 1,2-диацилглицерин, ацилирование которого по положению *sn*-3 дает молекулу ТГ [74]. МАДАГ образуется путем последовательного введения двух остатков ЖК в положения *sn*-2 и *sn*-3 молекулы 1-*O*-алкилглицерина [75].

Такие ПНЖК, как 20:4n-6, 22:5n-3 и 22:6n-3, характерны для тканей животных, и присутствие молекулярных видов ТГ и МАДАГ, содержащих остатки этих ПНЖК, закономерно для книдарий (табл. 1). Независимо от наличия симбионтов, все виды октокораллов синтезируют ТПЖК (24:5n-6 и 24:6n-3) [7, 68], поэтому МАДАГ 18:0alk/24:5/16:0 (табл. 1) однозначно является маркером тканей организма-хозяина. Маркерными ПНЖК зооксантелл являются 16:4n-1, 18:3n-6 и 18:4n-3 [10, 76], следовательно, ТГ с остатками этих ПНЖК (табл. 1) могут синтезировать симбионты кораллов. В то же время известно, что зооксантеллы не синтезируют этерные липиды, поэтому обнаружение в липидах мягкого коралла ряда молекулярных видов МАДАГ с остатками маркерных ПНЖК зооксантелл (18:0alk/18:3/16:0, 18:0alk/18:4/16:0 и 16:0alk/

18:3/16:0) (табл. 1) следует рассматривать, как хорошее подтверждение существования передачи ПНЖК от симбионтов к хозяину.

Липиды шестилучевых кораллов (*Anthozoa: Hexacorallia*)

Содержание липидов на сухой вес тканей рифообразующих кораллов может варьироваться от 14 до 37% [2]. В общих липидах может содержаться ФЛ от 8 [77] до 27.8% [2]. Липидный экстракт зоантарии *Palythoa* sp. содержал $39.54 \pm 2.02\%$ ФЛ [65]. Основными классами ФЛ *Palythoa* sp. были ФХ ($15.10 \pm 0.55\%$), ФЭ ($10.93 \pm 0.58\%$) и ФС ($5.98 \pm 0.11\%$) [65], как и в зоантарии *Palythoa carzbaeorum* [78]. Кроме того, были идентифицированы ФИ ($1.6 \pm 0.13\%$), ЦАЭФ ($4.49 \pm 0.70\%$) и ЛФХ ($1.44 \pm 0.31\%$) [65]. Присутствие этих шести классов ФЛ характерно для всех рифообразующих и мягких кораллов [8]. Среди неполярных липидов гексакораллов обнаружены ЭВ, их содержание у рифообразующих кораллов о. Окинава колебалось от 9.1 (*Tubastrea* sp.) до 31.4% (*Goniastrea aspera*) [2]. Доля МАДАГ – этерного класса липидов, в общих липидах рифообразующих кораллов о. Окинава была меньше (от 1.0% для *Stylophora pistillata* до 9.3% для *Montipora aequituberculata*), чем доля ТГ (от 14.9 для *Pocillopora verrucosa* до 30.4% для *Galaxea fascicularis*) [2]. Липиды рифообразующих кораллов Карибского моря также содержали большое количество ТГ (от $18.1 \pm 5.0\%$ для *Porites porites* до $36.6 \pm 13.9\%$ для *Pocillopora verrucosa*) [79].

Основными ЖК кораллов рода *Acropora* являлись 16:0 и 18:0; среди ПНЖК превалировали кислоты 18:3n-6, 20:4n-6, 20:5n-3 и 22:6n-3 [80]. Сумма маркеров зооксантелл (18:3n-6 и 18:4n-3) достигала 15%, а содержание 20:4n-6 не превышало 10% от общих ЖК. Отмечено, что ТГ обогащены насыщенными ЖК, тогда как ПНЖК сосредоточены в полярных липидах рифообразующих кораллов [7, 80, 81]. Основными ЖК липидов *Palythoa caesia* были насыщенные 16:0 и 18:0. Среди моноеновых кислот были идентифицированы 7-Ме-16:1n-10, 16:1n-7 и 18:1n-9. Основным ПНЖК были 20:4n-6, 22:4n-6 и 22:5n-3, так же обнаружены C_{18} ПНЖК, которые считаются маркерами зооксантелл, и редкие для кораллов ЖК: 24:2($\Delta 5,9$), 24:3($\Delta 5,9,15$) и 24:3($\Delta 5,9,17$) [82].

Данные по липидому рифообразующих кораллов очень ограничены. Танг и соавторы [83] изучали различия в профиле молекулярных видов ФХ и ЛФХ различных частей колоний рифообразующего коралла *Seriatopora caliendrum* (о. Тайвань). Основными молекулярными видами ФХ были 16:0/22:6, 16:0alk/20:4, 16:1alk/20:4, 16:0alk/20:5 и 18:0alk/20:4. В последующей работе [61] авторы исследовали влияние оксида цинка на профиль молекулярных видов ФХ липидов *S. caliendrum*.

Таблица 1. Состав этаноламин-, холин-, инозитол- и серинглицерофосфолипидов (ФЭ, ФХ, ФИ, ФС), а также церамидаминоэтилфосфоната (ЦАЭФ) мягкого коралла *Sinularia siaesensis** и зоантарии *Palythoa* sp.**

Молекулярный вид	Содержание, % в классе		Молекулярный вид	Содержание, % в классе	
	<i>S. seaesensis</i>	<i>Palythoa</i> sp.		<i>S. seaesensis</i>	<i>Palythoa</i> sp.
ФХ			ФЭ		
16:0alk/16:3**	5.84	—	16:1alk/17:1	—	8.16 ± 1.36
16:0alk/16:2	7.27	—	17:1alk/17:1	—	1.93 ± 0.71
16:0alk/18:4	7.95	—	18:1alk/17:1	1.82	6.76 ± 0.55
16:0alk/18:2	6.47	—	16:1alk/20:4	2.53	14.04 ± 1.41
18:1alk/16:0	2.95	—	16:0alk/20:4	1.42	1.94 ± 0.21
16:1alk/20:5	1.94	—	19:1alk/17:1	4.49	1.57 ± 0.23
16:1alk/20:4	1.69	5.08 ± 1.30	17:1alk/20:4	0.58	1.90 ± 0.26
16:0alk/20:4	15.68	15.30 ± 3.12	18:1alk/20:5	—	4.41 ± 0.88
16:0alk/20:3	—	2.59 ± 0.50	18:1alk/20:4	42.54	28.13 ± 1.26
36:2alk	—	2.10 ± 0.47	16:1alk/22:4	—	—
16:0alk/22:5	—	10.23 ± 0.97	18:1alk/20:3	—	5.75 ± 0.13
38:3alk	—	1.08 ± 0.20	18:0alk/20:4	4.89	—
38:2alk	—	2.62 ± 0.34	18:1alk/20:0	0.83	—
16:1alk/22:0	—	1.88 ± 0.62	19:1alk/20:4	4.61	—
17:1alk/20:4	—	1.47 ± 0.31	20:3alk/20:0ОН	7.01	—
18:0alk/22:5	—	5.64 ± 0.76	20:3alk/21:0ОН	4.37	—
18:0alk/22:4	—	5.80 ± 0.67	18:1alk/22:5	—	2.65 ± 0.27
20:0alk/20:4	—	—	18:1alk/22:4	—	6.44 ± 0.28
42:5alk	—	1.29 ± 0.17	18:0alk/22:4; 20:0alk/20:4	—	1.85 ± 0.12
22:0alk/20:4	—	1.57 ± 0.45	18:1alk/22:2	—	5.09 ± 1.84
36:1	—	1.38 ± 0.22	18:1alk/24:5	3.1	—
16:0/20:5***	—	1.74 ± 0.69	18:0alk/24:5	2.86	—
16:0/20:4	—	2.08 ± 1.00	18:1alk/24:3	—	2.25 ± 0.43
16:0/20:3	—	1.22 ± 0.66	20:3alk/22:0-ОН	8.11	—
16:0/22:4	—	11.42 ± 1.28	16:2/20:4	4.21	—
22:3/16:0	—	1.02 ± 0.16	18:1/20:4	—	2.33 ± 0.21
18:2/20:0	—	1.34 ± 0.24	18:0/20:4	—	1.08 ± 0.08
18:1/20:0	—	0.96 ± 0.22	19:1/20:4	2.19	—
17:0/22:5	—	6.70 ± 2.06	20:1/20:4	2.4	—
17:0/22:4	—	4.20 ± 0.06	18:0/22:5	—	1.60 ± 0.73
19:0/22:5	—	1.44 ± 0.35	18:0/22:4	—	1.75 ± 0.12
Другие	13.68	4.21 ± 0.78	Другие	—	4.48 ± 0.52
диацильные	0	40.94 ± 2.19	ацил/алкил	91.23	90.56 ± 1.73
ацил/алкил	86.32	55.04 ± 0.48	ФС		
ФИ			18:1alk/20:4	—	10.79 ± 5.23
16:0alk/20:4	—	1.83 ± 0.09	18:1alk/20:3	—	2.13 ± 0.52
18:0alk/22:4	1.1	1.56 ± 0.26	18:1alk/20:2	—	2.87 ± 0.17
16:0/22:6	—	2.12 ± 0.72	18:1alk/22:5	—	2.12 ± 0.03
16:0/22:5	—	1.11 ± 0.09	18:1alk/22:4	—	14.43 ± 2.54
16:0/22:4	—	2.07 ± 0.14	18:0alk/22:5	0.8	3.34 ± 1.44
18:0/22:6	2.59	—	18:1alk/22:3	—	3.34 ± 0.01

Таблица 1. Окончание

Молекулярный вид	Содержание, % в классе		Молекулярный вид	Содержание, % в классе	
	ФХ	<i>S. seaesensis</i>		<i>Palythoa</i> sp.	ФЭ
18:0/22:5	6.13	22.39 ± 0.55	18:1alk/22:2	—	13.35 ± 0.60
18:0/22:4	12.17	59.10 ± 1.70	18:1alk/23:2	—	1.71 ± 0.77
19:0/22:4	—	1.31 ± 0.09	18:1alk/24:4	—	1.95 ± 0.06
20:0/22:4	—	1.33 ± 0.02	18:1alk/24:3	—	9.32 ± 0.42
18:0/24:6	15.51	—	18:1alk/24:2	—	7.33 ± 0.41
18:0/24:5	62.06	—	18:0alk/24:6	12.17	—
Другие	0.44	1.30 ± 0.16	18:0alk/24:5	80.35	—
диацильные	98.46	88.99 ± 0.45	18:0/20:3	—	1.53 ± 0.14
ЦАЭФ			18:0/22:4	—	25.91 ± 1.72
18:2b/16:0	60.99	19.39 ± 1.25	20:0/22:4	—	2.87 ± 0.06
18:1b/16:0	17.47	—	22:5/22:4	—	2.13 ± 0.83
18:0b/16:0	10.28	—	Другие	6.75	1.08 ± 0.28
18:2b/16:0-ОН	6.2	—	алкил/ацильные	93.32	62.77 ± 4.02
Me-N 18:2b/16:0ОН****	—	14.22 ± 0.80			
Me-N 18:1b/16:0ОН	—	2.06 ± 0.42			
Me-N 18:0b/16:0	—	3.43 ± 1.76			
Me-N 18:1b/16:0	—	7.33 ± 2.50			
Me-N 18:2b/16:0	—	31.82 ± 0.14			
Me-N 19:2b/16:0	—	11.44 ± 2.00			
Me-N 20:1b/16:0;	—	1.30 ± 0.27			
Me-N 18:1b/18:0	—	—			
Другие	5.07	9.50 ± 1.49			

* [64].

** [65].

** Алкил (*sn*-1)/ацил (*sn*-2).

*** Ацил/ацил.

**** Церамидметиламиноэтилфосфонат (ЦМАЭФ).

Колонии коралла также были поделены на части: ветви и стебель. Липиды из ветвей коралла в отличие от липидов стебля колонии содержали большое количество ФХ 16:0alk/20:4, а также другие молекулярные виды ФХ, содержащие остатки ПНЖК (16:0alk/20:5, 16:0alk/22:6, 18:0/22:6), и лизо-ФХ. Содержание насыщенных и моноеновых молекулярных видов (16:0alk/14:0 и 16:1alk/16:0) было больше в стеблях колонии этого коралла. Еще в одной работе Танг и др. [62, 63] изучили влияние ингибирующего фотосинтез гербицида иргарола 1051 на профиль основного структурного липида ФХ коралла *S. caliendrum*. Список идентифицированных диацильных молекулярных видов ФХ расширился, появились ФХ, содержащие ЖК маркеры зооксантелл C₁₈ ПНЖК.

В работе [65] по изучению полного липидома зоантарии *Palythoa* sp. большинство молекулярных видов ФЭ имели плазмалогенную форму (90.56 ± 1.73% от суммы ФЭ) и содержали остатки

кислот 20:4n-6 и 17:1 (51.89 ± 0.71 и 17.88 ± 1.27%), а в составе ФИ преобладали диацильные молекулярные виды (88.99 ± 0.45% от суммы ФИ) с остатками кислот 22:4 (64.93 ± 1.74%) и 22:5 (23.5 ± 0.48%) [65]. Необычные молекулярные виды с остатками 17:1 (табл. 1) указывают на участие ассоциированных бактерий в формировании пула ФЭ. Среди ФХ из *Palythoa* sp. были обнаружены как алкилацильные (55.04 ± 0.48%), так и диацильные молекулярные виды (40.94 ± 2.19%). Липидный экстракт содержит большое количество молекулярных видов ФХ, в состав которых входят ПНЖК 20:4, 22:4 и 22:5, например, 15.30 ± 3.12% 16:0alk/20:4, 11.42 ± 1.28% 16:0/22:4 и 10.23 ± 0.97% 16:0alk/22:5 [65]. Подобно холодно-водным мягким кораллам рода *Gersemia* [56], ФС из *Palythoa* sp. были представлены алкилацильными (62.77 ± 4.02%) и диацильными (36.45 ± 3.98%) молекулярными видами. Диацильные формы ФС содержали, в основном, 22:4 и 22:5, тогда как ал-

килацильные формы – широкий спектр C_{20-24} ПНЖК (20:2, 20:3, 20:4, 22:2, 22:3, 22:4, 22:5, 24:2, 24:3 и 24:4) [65]. В отличие от фосфолипидов, для которых профиль молекулярных видов формировался за счет различных остатков ЖК, разнообразие молекулярных видов ЦАЭФ зоантарии *Palythoa* sp. определял набор сфингозиновых оснований, содержащих 18–20 атомов углерода и 1–2 двойные связи (табл. 1) [65]. Аналогичные особенности химической структуры молекулярных видов ЦАЭФ наблюдали ранее в кораллах и гидрокораллах [57].

Шестилучевые коралловые полипы не способны синтезировать ТПЖК [69], однако другие ненасыщенные сверхдлинноцепочечные неметеленразделенные C_{24} ЖК, содержащие от 1-ой до 4-х двойных связей, были найдены в составе ЖК общих липидов зоантарии *Palythoa caesia* [82] и рифообразующих кораллов рода *Porites* [81]. Для полярных липидов альционарий было показано, что ТПЖК сосредоточены в молекулярных видах ФС [55, 56]. В зоантарии *Palythoa* sp. C_{24} ПНЖК также входили в состав молекулярных видов ФС [65]. Ранее было установлено, что молекулярные виды ФС рифообразующих кораллов и гидрокораллов содержали остатки C_{22} ПНЖК, т.е. кислоты с максимальной длиной цепи среди всего набора ПНЖК, которые синтезируются этими животными [57].

В гастродермальных клетках рифообразующего коралла *Euphyllia glabrescens* и липидных тельцах присутствовали 4 молекулярных вида ЭВ, их концентрация менялась в зависимости от времени суток. Основным воском был пальмитоилпальмитат (16:0/16:0), наибольшая концентрация которого наблюдалось в светлое время суток в гастродермальных клетках организма-хозяина и липидных тельцах (14.5 ± 2.3 и 29.6 ± 1.9 нг/мкг белка соответственно). Пальмитоилолеат был обнаружен только в липидных тельцах, и его концентрация в полдень и утром была 9.9 ± 0.7 и 18.0 ± 1.6 нг/мкг белка, соответственно [73]. Основными молекулярными видами ЭВ *Palythoa* sp. были пальмитоилпальмитат (16:0/16:0) и пальмитоилстеарат (16:0/18:0). Насыщенные молекулярные виды составили $75.05 \pm 2.03\%$, моно- и диненасыщенные – $17.79 \pm 1.68\%$ и ЭВ с жирными кислотами и спиртами, имеющими нечетное число атомов углерода – $1.27 \pm 0.27\%$ от суммы ЭВ [65].

Состав молекулярных видов ТГ и МАДАГ зоантарии *Palythoa* sp. представлен в табл. 2 [65]. Основными молекулярными видами ТГ были 16:0/16:0/18:0, 16:0/16:0/16:0 и 22:5/16:0/16:0. Среди МАДАГ преобладали 18:0alk/20:4/16:0, 16:0alk/20:4/16:0 и 16:0alk/20:5/16:0. Липидный экстракт содержал большое количество молекулярных видов ТГ и МАДАГ, в состав которых входят 20:4 и 22:5. Были обнаружены молекулярные виды ТГ и

МАДАГ, содержащие 18:3n-6 – маркер зооксантелл [10, 78].

Липиды симбионтов кораллов (динофлагелляты семейства Symbiodinacia)

Ткани полипов кораллов и их зооксантеллы резко отличаются по составу липидов, при этом было показано, что липиды зооксантелл рифообразующего коралла *Pocillopora capitata* составляют примерно 19% от суммы липидов целой колонии [84].

Бишоп и Кенрик [85] показали, что основными ЖК общих липидов зооксантелл, выделенных из рифообразующих кораллов (семейства Асгоридае, Faviidae и Pocilloporidae), были кислоты 16:0, 18:3n-6, 18:4n-3, 20:5n-3, 22:6n-3 и 18:5n-3, характерные и для свободноживущих динофлагеллят. Доминирующими ЖК зооксантелл рифообразующего коралла *Montipora digitata* были 18:3n-6, 18:1n-9, 18:0, 18:4n-3, 16:1, 22:6n-3 и 20:5n-3 [46]. Содержание суммы ПНЖК, 18:2n-6 ЖК и ПНЖК n-3 серии было больше в липидах зооксантелл, но процент 16:0 был существенно меньше, чем в липидах тканей полипа [46]. ПНЖК 20:5n-3, 22:6n-3, 18:4n-3 и 18:3n-6 были основными и в липидах фракций зооксантелл, выделенных из двух видов рифообразующих кораллов *Turbinaria reniformis* [10] и *Euphyllia glabrescens* [86]. В липидах тканей организма-хозяина *T. reniformis* и *E. glabrescens* был отмечен высокий уровень 20:4n-6 [10, 86]. Авторы считают, что часть ПНЖК синтезируется в симбионтах и передается организму-хозяину, при этом, возможно, 20:4n-6 синтезируется самим полипом, поэтому 20:4n-6 можно считать маркером организма-хозяина [10, 86].

Липиды тилакоидных мембран фотосинтетического комплекса динофлагеллят содержат специфические гликолипиды: МГДГ, ДГДГ и СХДГ [87, 88]. Внутриклеточные симбиотические динофлагелляты кораллов содержат эти же ГЛ, которые не синтезируются в клетках организма-хозяина и, следовательно, являются маркерными липидами зооксантелл. СХДГ является анионным липидом и имеет отрицательно заряженную полярную “голову”, так же как и фосфолипиды, недостаток которых СХДГ может частично компенсировать [89]. В состав молекул СХДГ симбиотических динофлагеллят входят остатки насыщенных и моноеновых ЖК [19], подобно тому, как молекулы СХДГ зооксантелл из морской актинии *Aiptasia pallida* содержат предельные ЖК с четным числом атомов углерода от 12 до 18 и моноеновые ЖК от 14:1 до 18:1 [60]. Молекулярные виды сульфатированного гликолипида СХДГ из *Palythoa* sp. содержали, в основном, остатки насыщенных и моноеновых кислот (14:0, 14:1, 16:0 и 16:1) (табл. 3) [65].

Основными молекулярными видами галактолипидов некоторых видов свободноживущих ди-

Таблица 2. Состав триацилглицеридов и моноалкилдиацилглицеридов (ТГ и МАДАГ) мягкого коралла *Sinularia siaesensis** и зоантарии *Palythoa* sp.**

Молекулярный вид ТГ/МАДАГ	Содержание, % в классе		Молекулярный вид ТГ/МАДАГ	Содержание, % в классе	
	<i>S. seaesensis</i>	<i>Palythoa</i> sp.		<i>S. seaesensis</i>	<i>Palythoa</i> sp.
14:0/16:0/16:0***	—	1.65 ± 1.09	16:0/16:0/16:0	18.09	10.54 ± 2.65
22:5/16:0/16:0	—	7.20 ± 3.81	16:0alk/20:5/16:0	—	—
20:4/16:0/20:4; 20:5/16:0/16:0	—	2.32 ± 3.15	16:0alk/18:3/16:0; 16:0/18:1/16:0	—	7.63 ± 1.15
22:5/16:0/18:0	—	1.46 ± 0.21	16:0alk/22:5/18:0	—	2.62 ± 1.03
18:3/16:0/16:0	0.19	2.27 ± 1.97	18:0alk/22:5/16:0	0.55	—
20:4/16:0/16:0	0.41	3.42 ± 1.43	16:0alk/16:0/16:0	12.14	0.79 ± 0.70
16:1/16:0/16:0; 22:6/16:0/16:0	2.30	3.29 ± 0.57	16:0alk/22:5/16:0	—	5.36 ± 1.73
18:2/16:0/16:0	0.95	—	16:0alk/16:2/16:0	2.65	—
18:1/16:0/16:0	2.30	—	16:0alk/20:4/16:0	1.59	12.72 ± 1.64
18:1/18:1/16:0; 20:4/16:0/18:0	—	1.67 ± 0.29	18:0alk/20:4/16:0	2.96	10.58 ± 1.40
16:0alk/16:3/16:0****; 20:4/16:0/16:0	0.69	—	18:0alk/18:3/18:0	—	2.11 ± 0.46
16:0/16:0/18:0	3.69	10.09 ± 2.22	18:0alk/20:4/18:0	0.43	—
18:0alk/18:3/16:0	0.86	1.60 ± 0.34	Другие	88.62	12.69 ± 4.36

* [64].

** [65].

*** Ацил *sn*-1(3)/ацил *sn*-2/ацил *sn*-3(1).**** Алкил *sn*-1/ацил *sn*-2/ацил *sn*-3.

нофлагеллят являются МГДГ (18:3/16:4, 18:5/18:5 и 18:5/18:4) и ДГДГ 18:5/18:4 [87, 90]. Имбс и др. [91] определили профиль молекулярных видов галактолипидов зооксантелл из альционарии *Carpnella* sp. Основными молекулярными видами ДГДГ были 18:4/20:5, 18:4/18:4 и 16:2/22:6. Молекулы ДГДГ включали 16:2n-7, 16:3n-4 и 18:4n-3, которые предложены в качестве маркерных ПНЖК зооксантелл мягких кораллов, а также 20:5n-3 и 22:6n-3, которые являются характерными ПНЖК динофлагеллят. Основными молекулярными видами были МГДГ 34:7 (16:2/18:5 + 16:3/18:4), 36:10 (16:4/20:5 + 18:4/18:5) и 36:9 (18:4/18:4 + 16:3/20:5). Эти молекулярные виды, а также присутствующий в небольшом количестве МГДГ 16:4/18:5, содержали 16:4n-1 и 18:5n-3, которые являются уникальными маркерами зооксантелл. Схожий профиль молекулярных видов гликолипидов имели симбионты зоантарии *Palythoa* sp. (табл. 3) [65]. Молекулярные виды МГДГ (1.33 ± 0.07% от липидного экстракта) и ДГДГ содержали ПНЖК 16:3, 18:3, 18:4, 18:5 и 20:5 (табл. 3).

Бетаиновые липиды — это группа полярных липидов, которые замещают ФЛ у низших растений [92]. Они представляют собой метилированные или карбоксилированные производные

гидроксиаминокислот, связанные с диацилглицерином в положении *sn*-3. Эти биомолекулы найдены в макроводорослях [93], в динофлагелятах и других микроводорослях [92, 94], в том числе и в зооксантеллах, выделенных из медузы *Cassiopea xamachana* [95]. В микроводорослях присутствуют три основных класса бетаиновых липидов: диацилглицерил-*N*-триметилгомосерин (ДГТС), диацилглицерилгидроксиметил-*N,N,N*-триметилбета-аланин (ДГТА) и диацилглицерилкарбокси-гидроксиметилхолин (ДГКХ) [92].

У симбиотических динофлагеллят *Durusdinium trenchii* и *Cladocopium* С3 из рифообразующего коралла *Acropora valida* среди бетаиновых липидов был идентифицирован только ДГКХ и лизо-ДГКХ. У обоих симбионтов молекулярные виды ДГКХ характеризовались содержанием длинноцепочечных ЖК с высокой степенью полиненасыщенности. У *D. trenchii* основными молекулярными видами ДГКХ были 38:6 (43.3 ± 9.6%), 44:12 (29.2 ± 6.5%) и 42:11 (11.5 ± 3.0%), а у *Cladocopium* — 38:6 (52.3 ± 2.5%), 36:5 (23.0 ± 2.4%) и 44:12 (11.09 ± 3.9%) [19]. В общих липидах целых колоний симбиотической зоантарии *Palythoa* sp. также был идентифицирован ДГКХ (табл. 3) [65]. Основными молекулярными видами ДГКХ были диацильные

Таблица 3. Состав моногалактозил-, дигалактозил- и сульфохиновозилдиацилглицеридов (МГДГ, ДГДГ и СХДГ) мягкого коралла *Sinularia siaeensis** и зоантарии *Palythoa* sp.***, а также бетаинового липида ДГКХ зоантарии *Palythoa* sp.

Молекулярный вид	Содержание, % в классе		Молекулярный вид	Содержание, % в классе	
	<i>S. seaeensis</i>	<i>Palythoa</i> sp.		ДГДГ	<i>S. seaeensis</i>
СХДГ					
14:0/14:0***	1.83	1.92 ± 1.25	16:3/18:4	11.73	–
12:0/16:0	–	–	18:4/18:5	16.2	11.66 ± 2.22
14:2/16:0	4.63	–	18:4/18:4	42.46	21.99 ± 1.44
14:1/16:0	15.24	19.56 ± 0.14	16:3/20:5	–	–
14:0/16:0	50	57.63 ± 4.63	18:3/18:4	–	2.76 ± 0.56
16:0/16:3	2.44	–	18:5/20:5	–	18.23 ± 0.26
16:0/16:2	4.88	–	18:4/20:5	29.61	41.74 ± 2.86
16:1/16:0	–	3.67 ± 1.47	МГДГ		
16:0/16:0	17.32	13.40 ± 3.16	16:0/16:2	3.51	–
16:0/22:6	–	3.92 ± 1.43	16:3/18:4	3.64	–
ДГКХ			18:4/18:5	8.5	38.18 ± 4.70
16:0/18:4	Н.у.****	12.96 ± 2.56	16:3/20:5	15.59	21.88 ± 0.14
16:0/18:3	Н.у.	2.61 ± 0.97	18:3/18:4	20	6.69 ± 0.85
14:0/22:6	Н.у.	4.60 ± 0.49	18:5/20:5	3.09	13.00 ± 1.06
16:0/20:5	Н.у.	9.02 ± 1.42	18:4/20:5	3.68	15.06 ± 0.21
16:0/22:6	Н.у.	50.95 ± 1.29			
18:4/22:6	Н.у.	2.05 ± 0.55			
40:09:00	Н.у.	1.42 ± 0.07			
20:5/22:6	Н.у.	2.88 ± 0.80			
22:6/22:6	Н.у.	4.17 ± 0.22			
18:0/28:7	Н.у.	5.83 ± 0.32			
Другие	Н.у.	2.28 ± 0.05			

* [64].

** [65].

*** Ацил/ацил.

**** Не установлено.

16:0/18:4 и 16:0/22:6 (12.96 ± 2.56 и $50.95 \pm 1.29\%$ от суммы ДГКХ) [65].

ИЗМЕНЕНИЕ ЛИПИДНОГО ПРОФИЛЯ КОРАЛЛОВ И ИХ СИМБИОНТОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА

Еще в самых ранних работах по обесцвечиванию кораллов [13, 14] акцент был сделан именно на липидах, поскольку они играют важную роль в этом процессе. Неблагоприятные условия внешней среды или заболевания оказывают существенное влияние на содержание общих липидов в кораллах. В работе по изучению влияния обесцвечивания в естественной среде обитания на уровень липидов рифообразующего коралла *Pocilopora damicornis* было замечено двукратное снижение уровня липидов в обесцвеченных колониях коралла

относительно здоровых колоний (с 0.59 до 0.28% от сухого веса) [13]. Обесцвечивание коралловых рифов на о. Сесоко (Япония) привело к заметному понижению количества липидов в рифообразующих кораллах с 26.5 ± 2.3 до $9.0 \pm 1.5\%$ от мокрого веса колонии [5].

Основной причиной обесцвечивания является повышенная температура, которая действует синергически с повышенным уровнем солнечной радиации. Так, в работе по изучению влияния различной интенсивности света и температуры на ЖК профиль организма-хозяина и симбионтов коралла *Montipora digitata* было замечено, что снижение доли ПНЖК наблюдается в ответ на повышение интенсивности света только лишь в сочетании с повышенной температурой [96]. Большинство изменений были замечены в самом полипе *M. digitata*, что свидетельствует о том, что либо сам организм-хозяин более восприимчив к измене-

ниям окружающей среды, чем его симбионты, либо хозяин защищает симбионтов от воздействия неблагоприятных факторов [96].

Степень и характер нарушений, происходящих в симбиотическом организме коралла в ответ на тепловой стресс, зависит от таксономической принадлежности коралла. В работе [15] обнаружено, что рифообразующий коралл *Acropora intermedia* является более восприимчивым к экспериментальному тепловому стрессу, чем альционария *Sinularia capitalis* и рифообразующий коралл *Montipora digitata*. В данной работе была изучена динамика изменений содержания различных классов липидов и ЖК профилей различных таксономических групп кораллов при гипертермическом воздействии. Во всех исследуемых образцах существенно снижалось содержание общих липидов (на 17% для *S. capitalis* и 35% для *A. intermedia* после 24-х часов инкубирования, на 40% для *M. digitata* после 30-ти часов инкубирования); наблюдались изменения в содержание различных классов липидов. Липидные профили кораллов *S. capitalis* после 24-х часов инкубации и *M. digitata* после 30-ти часов инкубации были схожи, за исключением ТГ, количество которых в *M. digitata* уменьшилась на 67% относительно контрольных значений. В *A. intermedia* количества ФЛ и СТ уменьшилось в два раза после 10-ти часов тепловой обработки, в то время как количество восков увеличилось на 40% относительно контроля, а затем снова снизилось. Профиль ЖК оставался неизменным в течение 24-х часов эксперимента, но к концу эксперимента (48 часов для *S. capitalis* и *A. intermedia* и 30 часов для *M. digitata*) все виды кораллов продемонстрировали снижение количества ПНЖК на 80–90%; меньшее снижение было отмечено для предельных (60%) и моноеновых ЖК (60%).

Известно, что процесс обесцвечивания запускается в клетках симбионтов, что отражается на липидном профиле зооксантелл кораллов. Определенные клады зооксантелл более устойчивы к повышенным температурам. В работе [16] было проведено сравнительное исследование состава липидов тилакоидных мембран культивируемых зооксантелл из различных видов рифообразующих кораллов. Было показано, что отношение ЖК 18:1n-9/18:4n-3 значительно выше в тех культурах симбионтов, которые более устойчивы к повышению температуры окружающей среды. Авторы предполагают, что большое количество ПНЖК в составе липидов тилакоидных мембран зооксантелл при действии повышенной температуры приводит к их окислению и к повышению проницаемости мембран, что нарушает работу фотосинтетического аппарата и, в конечном итоге, ведет к потере зооксантелл и гибели колонии коралла [16].

В более поздних работах [17, 18] также было показано, что различные типы зооксантелл по-разному реагируют на температурный стресс, что отражается на профиле их липидного состава. В работе [18] было проведено сравнительное исследование состава липидов и ЖК культур зооксантелл *Symbiodinium goreauii* клад С1 и *Symbiodinium* sp. клад D1 при различных температурах. Длительное воздействие повышенной температуры вело к уменьшению относительного количества С₁₈ ПНЖК в липидах зооксантелл обоих типов, но видимый тепловой порог изменений липидов был ниже для С1.

В работе [17] было изучено изменение профиля ЖК липидов симбиотических динофлагеллят различных филогенетических типов (*Symbiodinium kawagutii* (тип F1), *S. pilosum* (тип A2), *S. microadriaticum* (тип A1), *Symbiodinium* sp. (тип B1) и *Symbiodinium* sp. (тип С1)), выделенных из тканей различных видов кораллов и культивируемых при нормальной (24°C) и повышенной (32°C) температурах. Для изучения способов акклиматизации, были исследованы изменения ЖК двух типов термочувствительных динофлагеллят кладов С1 и А1. Симбионты по-разному реагировали на повышение температуры. Для *Symbiodinium* sp. С1 высокая температура не приводила к значительному изменению состава жирных кислот, а у *S. microadriaticum* А1 наблюдались значительные изменения состава ЖК. Увеличилось содержание 18:1 и 18:3, при этом уменьшился относительный процент 16:0, 18:1, 18:4 и 22:6. В ЖК зооксантелл, культивируемых при 32°C, содержание 18:3 увеличилось в пять раз по сравнению с ЖК зооксантелл, культивируемых при 24°C, а 18:1n-9 — удвоилось. Для фракции фотосинтетических мембран относительная пропорция 18:1n-9 также удвоилась, процентное содержание 22:6 сократилось в два раза и снизилась доля 16:0. Отношение насыщенных и ненасыщенных ЖК липидов фотосинтетических мембран *Symbiodinium* sp. С1 составило 1.17 при 24°C, увеличилось до 1.23 при 32°C, тогда как для *S. microadriaticum* А1 это отношение заметно снизилось с 1.55 при 24°C до 1.28 при 32°C. Изменение длины углеродной цепи ЖК также сыграло роль в изменении состава мембран *S. microadriaticum* А1, культивируемых при высокой температуре. В ответ на повышение температуры содержание С₁₈ ЖК увеличивалось как в общих липидах, так и в липидах фотосинтетических мембран, при этом уменьшались количества С₁₆ и С₂₂ ЖК. Интересно, что профиль ЖК *Symbiodinium* sp. С1 имел другую картину: увеличилось содержание С₂₂ ЖК в целых клетках, выращенных при высокой температуре. Так как культура *Symbiodinium* sp. С1 росла гораздо лучше при более высокой температуре культивирования, было сделано предположение, что изменение длины ЖК

для *S. microadriaticum* A1 не отражает физиологическую адаптацию к акклиматизации, но, скорее всего, отражает степень повреждений. У каждого типа зооксантелл, по-видимому, разные механизмы акклиматизации: *Symbiodinium* sp. C1 был способен расти при 32°C без значительных изменений в составе ЖК клеточных мембран, хотя температура плавления культур, выращенных при 32°C, была на 3.5°C выше. Анализируя состав мембран и изменения, вызванные реакцией акклиматизации, авторы предположили, что мембраны *S. microadriaticum* A1 имеют более высокую текучесть при 24°C, с более высокой долей ПНЖК. После повышения температуры культивации в липидах *S. microadriaticum* A1 изменился состав ЖК, но этих изменений оказалось недостаточно для обеспечения устойчивого роста культуры при 32°C. В итоге, авторами был сделан вывод о том, что степень ненасыщенности ЖК тилакоидных мембран зооксантелл на прямую не влияет на обесцвечивание и не может быть использована, как надежный инструмент для диагностики термочувствительности симбиотических кораллов [17].

В работе [19] были изучены происходящие под действием повышенной температуры изменения структурных липидов (БЛ, ФЛ и ГЛ) двух видов зооксантелл: более термически устойчивого *Durisdinium trenchii* и более термически восприимчивого вида *Cladocopium* C3; выделенных из рифообразующего коралла *Acropora valida*. Результаты исследования показали, для того чтобы справиться с повышенной температурой симбиотические водоросли могут применять несколько стратегий, включающих изменения липидного строения их мембран.

По сравнению с *Cladocopium*, *D. trenchii* характеризовался более высоким уровнем лизо-ДГКХ. Накопление лизо-липидов может представлять собой отдельный механизм, участвующий в устойчивости к тепловому стрессу *D. trenchii* [19]. Так же было показано, что увеличивается насыщенность липидов МГДГ, ДГДГ, СХДГ, ФХ, лизо-ФХ у термочувствительного клада зооксантелл *Cladocopium* C3, что является ответной реакцией клеток фотосинтезирующих организмов для снижения текучести биологических мембран при высоких температурах. У *D. trenchii* таких изменений не было замечено, видимо подобный стресс для них не является критичным. МГДГ, ДГКХ, лизо-ДГКХ и лизо-ФХ у *D. trenchii* имели более высокую степень ненасыщенности по сравнению с *Cladocopium* C3, независимо от температуры эксперимента, а ФХ, ФГ и СХДГ были значительно более насыщенными. Под действием температуры наблюдалось увеличение степени насыщенности СХДГ и лизо-ФХ у *D. trenchii*. Эти результаты позволяют предположить, что более высокая термоустойчивость *D. trenchii* не происходит за счет общего повышенного насыщения мембранных

липидов в организме зооксантелл, как упоминалось ранее [16], а центральную роль в ответ на температурный стресс занимает СХДГ и их степень насыщенности, поскольку индекс ненасыщенности снижается у *D. trenchii* при температуре окружающей среды, и разница с *Cladocopium* C3 еще больше увеличивается при температурном стрессе [19]. Интересно, что соотношение ДГДГ/МГДГ у *D. trenchii* по сравнению с симбионтами *Cladocopium* было больше. Соотношение ДГДГ/МГДГ в мембране имеет решающее значение для правильного физиологического функционирования, поскольку ДГДГ являются бислообразующим липидом, а МГДГ нет [97]. Повышенная термостойкость *D. trenchii* может быть напрямую связана с более высокими соотношениями ДГДГ/МГДГ даже в отсутствие теплового стресса. Напротив, восприимчивость *Cladocopium* C3 может быть связана с обычно более низкими соотношениями ДГДГ/МГДГ в сочетании с неспособностью реконструировать галактолипидный профиль его хлоропластов в ответ на повышение температуры [19].

Недавно был проведен эксперимент по экспериментальному обесцвечиванию мягкого коралла *Sinularia* sp. при кратковременном (36 часов) действии повышенной температуры [20]. Были замечены резкие изменения в липидоме тропической альционии. Если содержание основных запасных (ТГ, МАДАГ и ЭВ) и структурных липидов (ФЛ) достоверно не изменилось относительно контрольных образцов, то уровни хлорофилла, гликолипидов, ФИ и ФХ с C₁₆₋₁₈ ПНЖК существенно снизились [20]. Была нарушена естественная суточная цикличность в уровне некоторых молекулярных видов гликолипидов, что говорит о нарушениях фотосинтетического аппарата зооксантелл, происходящих при термическом стрессе [20]. Среди молекулярных видов липидов достоверные изменения наблюдались в профилях ФХ и ФЭ. Мы полагаем, что ФЭ является основной мишенью процесса обесцвечивания, о чем свидетельствуют снижение уровня ФЭ, замещение алкил/ацильных молекулярных видов ФЭ на диацильные, появление продуктов гидролиза (ЛФЭ) и окисленных производных ФЭ (окФЭ) [20]. Известно, что колонии кораллов содержат разнообразные молекулярные виды лизоглицерофосфолипидов [63], которые связаны с модуляцией мембранных свойств клеток кораллов [83], однако окисленные фосфолипиды в частично обесцвеченных кораллах обнаружены не были. Положение sn-2 в остатке глицерина таких фосфолипидов содержит окисленные ПНЖК. Липиды схожей структуры участвуют в регуляции воспаления, тромбоза, ангиогенеза и других важных процессов у высших животных [98]. Окисленные фосфолипиды могут нарушать структуру клеточных мембран, поскольку окисленные ацильные цепи обращены в водную среду, что делает их

физически доступными для участия в сигнальных событиях, включая и распознавание макрофагами [99]. Предположительно окФЭ может быть синтезирован путем прямого окисления молекул ФЭ или этерификацией ЛФЭ окисленными ПНЖК. Одновременное появление лизо-ФЭ и окФЭ при обесцвечивании *Sinularia* sp. указывает на возможную биосинтетическую связь между лизо-ФЭ и окФЭ [20].

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. Spalding M.D., Grenfell A.M. // Coral Reefs. 1997. V. 16. P. 225–230. <https://doi.org/10.1007/s003380050078>
2. Yamashiro H., Oku H., Higa H., Chinen I., Sakai K. // Comp. Biochem. Phys. V. 122. P. 397–407. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(99\)00014-0](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(99)00014-0)
3. Imbs A.B., Maliotin A.N., Huyen L.V., Long P.Q. // Vietnamese J. Sci. Technol. 2005. V. 43. P. 84–91. <https://doi.org/10.1007/s00338-007-0318-7>
4. Hamoutene D., Puestow T., Miller, Banoub J., Wareham V. // Coral Reefs. 2008. V. 27. P. 237–246. <https://doi.org/10.1007/s00338-007-0318-7>
5. Yamashiro H., Oku H., Onaga K. // Fisheries Science. 2005. V. 71. P. 448–453. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2005.00983.x>
6. Awai K., Matsuoka R., Shioi Y. // Proceedings of the 12th International Coral Reef Symposium, Cairns, Australia, 2012. 6A.
7. Imbs A.B., Latyshev N.A., Dautova T.N., Latypov Y.Y. // Mar. Ecol. Prog. Ser. 2010. V. 409. P. 65–75. <https://doi.org/10.3354/meps08622>
8. Лам Ч.Н., Нгуен Х.К., Стехов В.Б., Светашев В.И. // Биол. моря. 1981. Т. 6. С. 44–47.
9. Латышев Н.А., Светашев В.И., Хунг Н.К., Нга Д.Т. // Биол. моря. 1986. Т. 3. С. 52–56.
10. Treignier C., Grover R., Ferrier, Pages C., Tolosa I. // Limnol. Oceanogr. 2008. V. 53. P. 2702–2710. <https://doi.org/10.4319/lo.2008.53.6.2702>
11. Spener F., Lagarde M., Record M. // Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2003. V. 105. P. 481–482. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200390101>
12. Muscatine L. // Science. 1967. V. 156. P. 516–519. <https://doi.org/10.1126/science.156.3774.516>
13. Glynn P.W., Gilchrist S.L., Perez M. // Biol. Bull. 1985. V. 168. P. 276–284. <https://doi.org/10.2307/1541240>
14. Harriott V.J. // Environ. Monit. Assess. 1993. V. 25. P. 131–139. <https://doi.org/10.1007/BF00549134>
15. Imbs A.B., Yakovleva I.M. // Coral Reefs. 2012. V. 31. P. 41–53. <https://doi.org/10.1007/s00338-011-0817-4>
16. Tchernov D., Gorbunov M.Y., de Vargas C., Yadav S.N., Milligan A.J., Haggblom M., Falkowski P.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 13531–13535. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402907101>
17. Diaz-Almeyda E., Thome P.E., El Hafidi M., Iglesias-Prieto R. // Coral Reefs. 2011. V. 30. P. 217–225. <https://doi.org/10.1007/s00338-010-0691-5>
18. Kneeland J., Hughen K., Cervino J., Hauff B., Eglinton T. // Coral Reefs. 2013. V. 32. P. 923–934. <https://doi.org/10.1007/s00338-013-1076-3>
19. Rosset S., Koster G., Brandsma J., Hunt A.N., Postle A.D., D'Angelo C. // Coral Reefs. 2019. V. 38. P. 1241–1253. <https://doi.org/10.1007/s00338-019-01865-x>
20. Sikorskaya T.V., Ermolenko E.V., Imbs A.B. // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2020. V. 524. 151295. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2019.151295>
21. Meikle P.J., Wong G., Barlow C.K., Kingwell B.A. // Pharmacol. Ther. 2014. V. 143. P. 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.02.001>
22. Wood P.L., Unfried G., Whitehead W., Phillipps A., Wood J.A. // Schizophr. Res. 2015. V. 161. P. 506–510. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2014.11.032>
23. Allemand D., Furla P. // C. R. Biol. 2018. V. 341. P. 276–280. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2018.03.007>
24. Kazandjian A., Shepherd V.A., Rodriguez-Lanetty M., Nordemeier W., Larkum A.W.D., Quinnell R.G. // Phycologia. 2008. V. 47. P. 294–306. <https://doi.org/10.2216/PH07-23.1>
25. Wakefield T.S., Farmer M.A., Kempf S.C. // Biol. Bull. 2000. V. 199. P. 76–84. <https://doi.org/10.2307/1542709>
26. Davy S.K., Turner J.R. // Biol. Bull. 2003. V. 205. P. 66–72. <https://doi.org/10.2307/1543446>
27. Babcock R.C., Bull G.D., Harrison P.L., Heyward A.J., Oliver J.K., Wallace C.C., Willis B.L. // Mar. Biol. 1986. V. 90. P. 379–394. <https://doi.org/10.1007/bf00428562>
28. Venn A.A., Loram J.E., Douglas A.E. // J. Exp. Bot. 2008. V. 59. P. 1069–1080. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm328>
29. Davies P.S. // Mar. Biol. 1991. V. 108. P. 137–144. <https://doi.org/10.1007/BF01313481>
30. Muscatine L., Falkowski P.G., Porter J.W., Dubinsky Z. // Proc. Biol. Sci. 1984. V. 222. P. 181–202. <https://doi.org/10.1098/rspb.1984.0058>
31. Douglas A.E. // Mar. Pollut. Bull. 2003. V. 46. P. 385–392. [https://doi.org/10.1016/s0025-326x\(03\)00037-7](https://doi.org/10.1016/s0025-326x(03)00037-7)
32. Hoegh-Guldberg O., Mumby P.J., Hooten A.J., Steeneck R.S., Greenfield P., Gomez E., Harvell C.D., Sale P.F., Edwards A.J., Caldeira K., Knowlton N., Eakin C.M., Iglesias-Prieto R., Muthiga N., Bradbury R.H., Dubi A., Hatziolos M.E. // Science. 2007. V. 318. P. 1737–1742. <https://doi.org/10.1126/science.1152509>

33. Lesser M.P. // *Annu. Rev. Physiol.* 2006. V. 68. P. 253–278.
<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001>
34. Martindale J.L., Holbrook N.J. // *J. Cell. Physiol.* 2002. V. 192. P. 1–15.
<https://doi.org/10.1002/jcp.10119>
35. Fang F.C. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2004. V. 2. P. 820–832.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1004>
36. Perez S., Weis V. // *J. Exp. Biol.* 2006. V. 209. P. 2804–2810.
<https://doi.org/10.1242/jeb.02309>
37. Gruenberg J., van der Goot F.G. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. V. 7. P. 495–504.
<https://doi.org/10.1038/nrm1959>
38. Dunn S.R., Thomason J.C., Le Tissier M.D.A., Bythell J.C. // *Cell Death Differ.* 2004. V. 11. P. 1213–1222.
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401484>
39. Strychar K.B., Sammarco P.W., Piva T.J. // *Phycologia.* 2004. V. 43. P. 768–777.
<https://doi.org/10.2216/i0031-8884-43-6-768.1>
40. Sammarco P.W., Strychar K.B. // *PLoS One.* 2013. V. 8. e54989.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054989>
41. Weis V.M. // *J. Exp. Biol.* 2008. V. 211. P. 3059–3066.
<https://doi.org/10.1242/jeb.009597>
42. Dunn S.R., Schnitzler C.E., Weis V.M. // *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* 2007. V. 274. P. 3079–3085.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0711>
43. Chen M.C., Hong M.C., Huang Y.S., Liu M.C., Cheng Y.M., Fang L.S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 338. P. 1607–1616.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.10.133>
44. Boya P., Gonzalez-Polo R.A., Casares N., Perfettini J.L., Dessen P., Larochette N., Metivier D., Meley D., Souquere S., Yoshimori T., Pierron G., Codogno P., Kroemer G. // *Mol. Cell. Biol.* 2005. V. 25. P. 1025–1040.
<https://doi.org/10.1128/mcb.25.3.1025-1040.2005>
45. Mueller C.E., Larsson A.I., Veuger B., Middelburg J.J., van Oevelen D. // *Biogeosciences* 2014. V. 11. P. 123–133.
<https://doi.org/10.5194/bg-11-123-2014>
46. Papina M., Meziane T., van Woessik R. // *Comp. Biochem. Phys. B.* 2003. V. 135. P. 533–537.
[https://doi.org/10.1016/s1096-4959\(03\)00118-0](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(03)00118-0)
47. Rodrigues L.J., Grottoli A.G., Pease T.K. // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2008. V. 358. P. 136–143.
<https://doi.org/10.2307/4502342>
48. Seemann J., Sawall Y., Auel H., Richter C. // *Lipids* 2013. V. 48. P. 275–286.
<https://doi.org/10.1007/s11745-012-3747-1>
49. Teece M.A., Estes B., Gelsleichter E., Lirman D. // *Limnol. Oceanogr.* 2011. V. 56. P. 1285–1296.
<https://doi.org/10.4319/lo.2011.56.4.1285>
50. Meyers P.A. // *Proceedings of Third International Coral Reef Symposium 1*, 1977. P. 529–536.
51. Imbs A.B., Demidkova D.A., Dautova T.N. // *Mar. Biol.* 2016. V. 163. P. 202.
<https://doi.org/10.1007/s00227-016-2974-z>
52. Imbs A.B., Yakovleva I.M., Pham L.Q. // *Fisheries Science.* 2010. V. 76. P. 375–380.
<https://doi.org/10.1007/s12562-009-0213-y>
53. Имбс А.Б. // *Биол. моря.* 2013. Т. 3. С. 159–172.
54. Imbs A.B., Dang L.P.T., Rybin V.G., Nguyen N.T., Pham L.Q. // *Biochem. Anal. Biochem.* 2015. V. 4. P. 205.
<https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000205>
55. Imbs A.B., Dang L.P.T., Rybin V.G., Svetashev V.I. // *Lipids.* 2015. V. 50. P. 575–589.
<https://doi.org/10.1007/s11745-015-4021-0>
56. Imbs A.B., Dang L.T.P. // *Russ. J. Mar. Biol.* 2017. V. 43. P. 239–244.
<https://doi.org/10.1134/s1063074017030051>
57. Imbs A.B., Dang L.P.T., Nguyen K.B. // *PLoS One.* 2019. V. 14. P. 22.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215759>
58. Vitova M., Goecke F., Sigler K., Rezanka T. // *Algal Res.* 2016. V. 13. P. 218–226.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.12.005>
59. Rybin V.G., Imbs A.B., Demidkova D.A., Ermolenko E.V. // *Chem. Phys. Lipids.* 2017. V. 202. P. 55–61.
<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2016.11.008>
60. Garrett T.A., Schmeitzel J.L., Klein J.A., Hwang J.J., Schwarz J.A. // *PLoS One.* 2013. V. 8. e57975.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057975>
61. Tang C.H., Lin C.Y., Lee S.H., Wang W.H. // *Aquat. Toxicol.* 2017. V. 187. P. 72–81.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.03.021>
62. Tang C.H., Lin C.Y., Sun P.P., Lee S.H., Wang W.H. // *Sci. Total Environ.* 2018. V. 627. P. 571–578.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.276>
63. Tang C.H., Shi S.H., Lin C.Y., Li H.H., Wang W.H. // *Sci. Total Environ.* 2019. V. 648. P. 1275–1283.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.296>
64. Sikorskaya T.V., Imbs A.B. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2018. V. 44. P. 712–723.
<https://doi.org/10.1134/s1068162019010151>
65. Sikorskaya T.V. // *Chem. Nat. Compd.* 2020. V. 56. P. 44–49.
<https://doi.org/10.1007/s10600-020-02940-4>
66. Carballeira N.M., Miranda C., Rodriguez A.D. // *Comp. Biochem. Phys. B.* 2002. V. 131. P. 83–87.
[https://doi.org/10.1016/s1096-4959\(01\)00495-x](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(01)00495-x)
67. Imbs A.B., Demina O.A., Demidkova D.A. // *Lipids* 2006. V. 41. P. 721–725.
<https://doi.org/10.1007/s11745-006-5023-8>
68. Vysotskii M.V., Svetashev V.I. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1991. V. 1083. P. 161–165.
[https://doi.org/10.1016/0005-2760\(91\)90037-i](https://doi.org/10.1016/0005-2760(91)90037-i)
69. Imbs A.B., Demidkova D.A., Dautova T.N., Latyshev N.A. // *Lipids.* 2009. V. 44. P. 325–335.
<https://doi.org/10.1007/s11745-008-3266-2>
70. Imbs A.B., Latyshev N.A. // *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 2012. V. 92. P. 1341–1347.
<https://doi.org/10.1017/s0025315411001226>
71. Imbs A.B., Latyshev N.A., Zhukova N.V., Dautova T.N. // *Comp. Biochem. Physiol.* 2007. V. 148B. P. 314–321.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.06.009>
72. Bosh T.V., Long P.Q. // *Russ. J. Mar. Biol.* 2017. V. 43. P. 471–478.
<https://doi.org/10.1134/s1063074017060049>
73. Chen H.K., Wang L.H., Chen W.N.U., Mayfield A.B., Levy O., Lin C.S., Chen C.S. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 13.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-02722-z>

74. *Athenstaedt K., Daum G.* // Eur. J. Biochem. 1999. V. 266. P. 1–16.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00822.x>
75. *Magnusson C.D., Haraldsson G.G.* // Chem. Phys. Lipids. 2011. V. 164. P. 315–340.
<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.04.010>
76. *Имбс А.Б., Яковлева И.М., Латышев Н.А., Фам Л.К.* // Биология моря 2010. Т. 36. С. 445–450.
<https://doi.org/10.1134/S1063074010060076>
77. *Oku H., Yamashiro H., Onaga K., Sakai K., Iwasaki H.* // Coral Reefs. 2003. V. 22. P. 83–85.
<https://doi.org/10.1007/s00338-003-0279-4>
78. *Carballeira N.M., Reyes M.* // J. Nat. Prod. 1995. V. 58. P. 1689–1694.
<https://doi.org/10.1021/np50125a007>
79. *Harland A.D., Navarro J.C., Davies P.S., Fixter L.M.* // Mar. Biol. 1993. V. 117. P. 113–117.
<https://doi.org/10.1007%2FBF00346432>
80. *Latyshov N.A., Naumenko N.V., Svetashev V.I., Latypov Y.Y.* // Mar. Ecol.-Prog. Ser. 1991. V. 76. P. 295–301.
<https://doi.org/10.3354/meps076295>
81. *Imbs A.B., Demidkova D.A., Latypov Y.Y., Pham L.Q.* // Lipids 2007. V. 42. P. 1035–1046.
<https://doi.org/10.1007/s11745-007-3109-6>
82. *Imbs A.B.* // Biochem. Syst. Ecol. 2014. V. 54. P. 213–218.
<https://doi.org/10.1007/s11745-015-4021-0>
83. *Tang C.H., Ku P.C., Lin C.Y., Chen T.H., Lee K.H., Lee S.H., Wang W.H.* // Mar. Biotechnol. 2015. V. 17. P. 633–643.
<https://doi.org/10.1007/s10126-015-9645-9>
84. *Patton J.S., Abraham S., Benson A.A.* // Mar. Biol. 1977. V. 44. P. 235–247.
<https://doi.org/10.1007/BF00387705>
85. *Bishop D.G., Kenrick J.R.* // Lipids. 1980. V. 15. P. 799–804.
<https://doi.org/10.1007/BF02534368>
86. *Chen H.-K., Song S.-N., Wang L.-H., Mayfield A.B., Chen Y.-J., Chen W.-N.U., Chen C.-S.* // PLoS One. 2015. V. 10. e0132519.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132519>
87. *Flaim G., Obertegger U., Guella G.* // Hydrobiologia. 2012. V. 698. P. 285–293.
<https://doi.org/10.1007/s10750-012-1070-8>
88. *Li-Beisson Y., Thelen J.J., Fedosejevs E., Harwood J.L.* // Prog. Lipid Res. 2018. V. 74. P. 31–68.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.01.003>
89. *Kobayashi K.* // J. Plant Res. 2016. V. 129. P. 565–580.
<https://doi.org/10.1007/s10265-016-0827-y>
90. *Leblond J.D., Dodson J., Dahmen J.L.* // Eur. J. Phycol. 2013. V. 48. P. 309–317.
<https://doi.org/10.1080/09670262.2013.833297>
91. *Imbs A.B., Rybin V.G., Kharlamenko V.I., Dang L.P.T., Nguyen N.T., Pham K.M., Pham L.Q.* // Russ. J. Mar. Biol. 2015. V. 41. P. 461–467.
<https://doi.org/10.1134/S1063074015060048>
92. *Canavate J.P., Armada I., Rios J.L., Hachero-Cruzado I.* // Phytochemistry. 2016. V. 124. P. 68–78.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.02.007>
93. *Хотимченко С.В.* // Липиды морских водорослей-макрофитов и трав. Владивосток: Дальнаука, 2003.
94. *Flaim G., Obertegger U., Anesi A., Guella G.* // Freshwater Biol. 2014. V. 59. P. 985–997.
<https://doi.org/10.1111/fwb.12321>
95. *Leblond J.D., Khadka M., Duong L., Dahmen J.L.* // Phycol. Res. 2015. V. 63. P. 219–230.
<https://doi.org/10.1111/pre.12093>
96. *Papina M., Meziane T., van Woesik R.* // Comp. Biochem. Phys. B. 2007. V. 147. P. 583–589.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.02.011>
97. *Dormann P., Benning C.* // Trends in Plant Sci. 2002. V. 7. P. 112–118.
[https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(01\)02216-6](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(01)02216-6)
98. *Bochkov V., Gesslbauer B., Mauerhofer C., Philippova M., Erne P., Oskolkova O.V.* // Free Radic. Biol. Med. 2016. V. 111. P. 6–24.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.034>
99. *Serbulea V., DeWeese D., Leitinger N.* // Free Radic. Biol. Med. 2017. V. 111. P. 156–168.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.035>

The Coral Lipidomes and Their Changes during Coral Bleaching

T. V. Sikorskaya*, # and A. B. Imbs*

*Phone: +7 (423) 231-09-05; fax: +7(423)2310905; e-mail: miss.tatyanna@yandex.ru

*Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Palchevskogo 17, Vladivostok, 690041 Russia

Numerous species of coral polyps form the structural basis of tropical coral reefs. Coral polyp tissues are rich in lipids. Currently, information on the composition of fatty acids and coral lipid classes is reviewed, however, each lipid class represents a complex spectrum of molecular species of lipids, which is defined as the lipidome of a biological system. Scientific works on human and higher terrestrial animal lipidomes have been published two orders of magnitude more than on marine organism lipidomes, and the data on coral lipidomes are very scattered. The existence of symbiotic coral species is completely dependent on the presence of intracellular microalgae – zooxanthellae, the loss of which is called coral bleaching and leads to the death of the entire coral reef. When bleaching occurs, significant changes in the lipid profile of corals occur. This paper summarizes information on the composition of common lipids, fatty acids, and molecular species of polar and nonpolar lipid classes of octocoral and hexacoral polyps, as well as their symbionts, gives general mechanisms of coral bleaching, and shows the importance of lipid indicators in the study of this process. The transition from classical integral indicators to lipidomic analysis opens up new possibilities in the study of biochemistry and ecology of coral.

Keywords: lipidome, lipid molecular species, corals, coral bleaching, lipidomic, symbionts, mass spectrometry



УДК 612.67+616-002.16:612.014.464

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА: УЧАСТИЕ В КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССАХ И РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИИ

© 2020 г. Т. И. Шлапакова*, Р. К. Костин*[#], Е. Е. Тягунова*

*ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8/2

Поступила в редакцию 18.02.2020 г.

После доработки 27.02.2020 г.

Принята к публикации 29.02.2020 г.

Активные формы кислорода (АФК) и азота (АФА) – не только побочные продукты химических реакций, но и участники различных клеточных процессов: защита от патогенных микроорганизмов (H_2O_2 , HOCl , ONOO^- , O_2^- , OH^\bullet), оплодотворение (H_2O_2), деление клеток (O_2^-), апоптоз (H_2O_2), регенерация (H_2O_2), координация направления клеточного движения, регуляция тонуса сосудов (NO^\bullet) и т.д. Баланс между продукцией и устранением АФК и АФА приводит к внутриклеточному гомеостазу, в то же время их чрезмерное образование приводит к повреждению клеток и, скорее всего, изменению их метаболизма. АФК и АФА способны действовать как внутриклеточные мессенджеры, т.е. изменять внутриклеточное окислительно-восстановительное состояние и/или структуру и функцию белка путем модификации аминокислотных остатков (в основном цистеиновых), а редокс-состояние ряда белков может влиять на клеточный метаболизм. Перекись водорода является основной формой АФК, участвующей в окислительно-восстановительной передаче сигналов у эукариот. Нарушения в восстановительных системах способствуют старению и возникновению возрастных заболеваний. Старение в первую очередь связано с повышенным уровнем окислительного стресса, различными типами макромолекулярных изменений и накоплением повреждений дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Поскольку большинство клеточных функций выполняется белками, старение может быть в какой-то степени следствием нарушения регуляции протеостаза или изменением функционирования протеома. Более того, не все клеточные белки могут быть ресинтезированы из-за возникающих в результате старения повреждений ДНК. Таким образом, активные формы кислорода и азота, постоянно генерируемые в организме, – важные участники регуляторных механизмов в клетке, но также и причина некоторых патологических состояний, включая рак. Известно, что АФК регулируют метаболизм сигнальных молекул, необходимых для осуществления клеточного цикла. Более того, АФК способны изменять активность железосодержащих белков. Связанное с неэффективной работой антиоксидантной защиты старение ассоциировано с окислительным стрессом, различными изменениями в клеточных структурах и макромолекулах, накоплением продуктов метаболизма, которые могут оказывать негативный эффект, повреждений дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), например, из-за совершения ошибок в ходе репликации ДНК-полимеразами, сбоев работы репарационных систем.

Ключевые слова: активные формы кислорода, активные формы азота, антиоксидантная защита, внутриклеточные мессенджеры, редокс-сигнализация, перекись водорода, супероксид-анион, гидроксильный радикал, хлорноватистая кислота, бромноватистая кислота, гипотиоциановая кислота, пероксинитрит, оксид азота, ферроптоз, железо-серные кластеры, старение, антиоксиданты

DOI: 10.31857/S013234232005022X

ВВЕДЕНИЕ

В норме в ходе клеточного метаболизма образуются активные формы кислорода (АФК) и активные формы азота (АФА), которые являются не только побочными продуктами химических реак-

ций, но и участвуют в различных клеточных процессах: защита от патогенных микроорганизмов (H_2O_2 , HOCl , ONOO^- , O_2^- , OH^\bullet), оплодотворение (H_2O_2), деление клеток (O_2^-), апоптоз (H_2O_2), регенерация (H_2O_2), координация направления клеточного движения (H_2O_2), регуляция тонуса сосудов (NO^\bullet) и т.д. Однако чрезмерно продуцируемые АФК и АФА – молекулы с высокой реакционной

Сокращения: АФК – активные формы кислорода; ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 950 768-48-78; эл. почта: rkostin2000@mail.ru).

способностью, которые могут приводить к различным повреждениям клеток. Антиоксидантная защита обеспечивает инактивацию АФК и АФА, что способствует поддержанию гомеостаза. Недостаточная эффективность данной системы может приводить к окислительному стрессу, являющемуся одной из причин развития дегенеративных и онкологических заболеваний, а также клеточному старению. В данной работе мы рассмотрим участие АФК и АФА в различных клеточных процессах (в том числе редокс-сигнализации), а также механизмы антиоксидантной защиты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для подробного изучения клеточных антиоксидантных механизмов, влияния АФК на метаболизм и процессы старения были проанализированы опубликованные статьи из баз данных Elsevier, NCBI MedLine, Scopus, Scholar.Google, Embase, Web of Science, MedLine, The Cochrane Library, EMBASE, Global Health, CyberLeninka и RSCI. Для поиска англоязычных статей использовались следующие ключевые слова: “reactive oxygen species”, “reactive nitrogen species”, “antioxidant cell defense”, “redox signalling”, “ferroptosis”, “singlet molecular oxygen”, “hydroxyl radical”, “hypobromous acid”, “hypochlorous acid”, “superoxide”, “nitric oxide”, “peroxynitrite”, “hydrogen peroxide”, “hypothiocyanous acid oxidative stress”, “ROS pathways”, “senescence”, “aging”. Для поиска русскоязычных статей были использованы следующие ключевые слова: “перекисное окисление липидов”, “респираторный взрыв”, “АФК”, “СПОЛ”, “активные формы азота”, “активные формы кислорода”. Оценка приемлемости англоязычных и русскоязычных оригинальных источников осуществлялась в несколько этапов: просматривались заголовки, аннотации и полнотекстовые статьи. Кроме того, осуществлялся дополнительный поиск источников, указанных в отобранных статьях. Были исключены статьи, включающие оригинальные исследования на небольших группах пациентов (или подопытных животных), статьи, в которых были приведены предварительные результаты исследований или дублировались результаты предыдущих исследований.

УЧАСТИЕ АФК В КЛЕТОЧНОМ МЕТАБОЛИЗМЕ

Значительную роль в клеточном метаболизме играют активные формы кислорода (АФК) и активные формы азота (АФА). Активные формы азота представляют собой продукты метаболизма оксида азота. Они генерируются, когда оксид азота(II) (NO^{\cdot}), образующийся либо экзогенно, либо эндогенно, взаимодействует с такими активными формами кислорода, как супероксид ($\text{O}_2^{\cdot-}$) и пере-

кись водорода (H_2O_2). Как АФА, так и АФК образуются как естественные продукты нормальной клеточной активности и участвуют в клеточной передаче сигналов [1]. Однако чрезмерное образование АФК и АФА может вызывать окислительный и нитрозирующий стрессы соответственно, что приводит к повреждению клеток и, как следствие этого, к их гибели [1–3]. В целом повреждение клетки свободными радикалами приводит к возникновению многих заболеваний, включая сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания, катаракту, рак молочной железы, легких, печени, толстой кишки, простаты, яичников и головного мозга [2, 3]. Было показано, что окислительный стресс, являясь причиной или следствием патологии, вовлечен в патогенез более, чем 100 заболеваний [4, 5].

Избыточный синтез АФК может быть результатом изменений во многих процессах, например, окислительном фосфорилировании, химических реакциях с участием ионов переходных металлов, оксидазной активности, фолдинге белков, катаболизме полиаминов и тимидина. Окислительное фосфорилирование и реакции с участием переходных металлов будут рассмотрены позже. Рассмотрим продукцию АФК в процессе фолдинга белков (1) и катаболизме полиаминов (2) и тимидина (3) [1].

1) Изменения в процессе фолдинга белков приводят к накоплению неправильно свернутых и развернутых белков в просвете эндоплазматического ретикулума (ЭПР), что негативно сказывается на ЭПР. Это нарушает клеточный гомеостаз и инициирует ответ развернутого белка (ОРБ) [6]. ОРБ способствует продукции АФК, а последние в свою очередь могут способствовать стрессорному воздействию на ЭПР [7].

2) Катаболизм полиаминов включает циклы взаимопревращения, при которых спермин разлагается до спермидина и спермидин до путресцина с образованием токсичных альдегидов и АФК. Например, сперминоксидаза катализирует превращение спермина в спермидин, что сопровождается выделением 3-аминопропаналя и H_2O_2 [8].

3) Тимидинфосфорилаза (ТФ) – скорость-лимитирующий фермент, участвующий в катаболизме тимидина. ТФ катализирует обратимое превращение тимидина в тимин и 2-дезоксид-Д-рибозо-1-фосфат (2dDR1P). ТФ активируется во многих опухолях и играет важную роль в ангиогенезе, противодействию апоптоза, инвазии и метастазированию, а также в ответе на химиотерапию [9]. Недавно Tabata et al. обнаружили, что активность ТФ повышает уровни NADPH через пентозофосфатный путь, который активирует NADPH-оксидаза-зависимую продукцию АФК в раковых клетках [10]. Ранее было показано, что добавление тимидина к клеточной линии карциномы со сверхэкспрес-

сией ТФ вызывает клеточный окислительный стресс [11]. Авторы предложили еще один потенциальный механизм продукции АФК, вызванного ТФ. Этот механизм основан на избыточной продукции 2dDRIP, образующемся во время фосфорилирования тимидина, которое может быть катализировано переходным металлом, что приводит к образованию АФК.

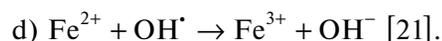
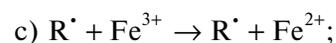
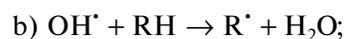
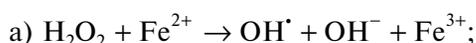
Активные формы кислорода и азота включают вещества как радикальной, так и нерадикальной природы: перекись водорода (H_2O_2), супероксид-анион ($O_2^{\cdot-}$), синглетный кислород (1O_2), гидроксильный радикал (OH^{\cdot}), хлорноватистая кислота ($HOCl$), бромноватистая кислота ($HOBr$), гипотиоциановая кислота ($HOSCN$), оксид азота (NO^{\cdot}) и пероксинитрит ($ONOO^-$) [1–4].

АФК образуются, когда наши клетки вырабатывают энергию из пищи, а также когда мы подвергаемся воздействию бактериальных и вирусных инфекций, интенсивных физических нагрузок, ксенобиотиков, сигаретного дыма, алкоголя, ионизирующего и ультрафиолетового излучений, пестицидов, озона и др. [3, 12].

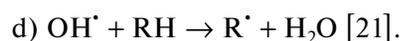
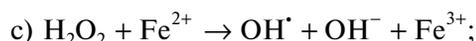
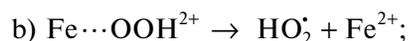
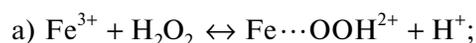
АФК сконцентрированы практически во всех внутри- и внеклеточных структурах и жидкостях: в митохондриях, цитозоле, одиночных мембраносвязанных органеллах (пероксисомах, эндосомах и фагосомах), экзосомах, высвобождаемых плазматическими мембранами, и внеклеточных жидкостях, включая плазму. Наиболее важными источниками АФК являются митохондрии (рис. 1) ввиду происходящего переноса электронов по цепи переноса электронов [13, 14]. Супероксидный радикал ($O_2^{\cdot-}$) продуцируется в ряде участков митохондрии, включая комплекс I (сайты IQ и IF), комплекс III (сайт IIIQo), а также в процессе ферментативных реакций с глицерол-3-фосфатдегидрогеназой, Q-оксидоредуктазой, пируватдегидрогеназой и 2-оксоглутаратдегидрогеназой [15]. В процессе работы каталитического цикла цитохрома (ферменты данного цикла метаболизируют липиды, стероидные гормоны, ксенобиотики и т.д.) образуются супероксидный радикал и перекись водорода [16]. Кроме того, было показано, что некоторые другие белки млекопитающих, такие как NADH-цитохром b5 редуктаза [17], дигидрооротатдегидрогеназа [18], комплекс II (сукцинатдегидрогеназа) [19] и моноаминоксидазы (MAO) [20], генерируют АФК в митохондриях в процессе биохимических реакций.

Немитохондриальными источниками свободных радикалов являются:

1) реакция Фентона — реакция пероксида водорода с ионами железа (приведена цепочка превращений):



2) Фентон-подобные реакции (цепочка превращений):



Стоит отметить, что часть авторов понимают под Фентон-подобными реакциями взаимодействие между окислителем, отличным от перекиси водорода, с переходными металлами (кроме железа), такими как медь, хром, никель, кобальт и т.д. [22].

3) микросомальная система окисления, использующая цитохром P450,

4) пероксисомальное бета-окисление,

5) респираторный взрыв фагоцитирующих клеток [23].

Воспалительные индуцибельные ферменты (NOX (КФ 1.6.3.1)), индуцибельная синтаза оксида азота (iNOS) (КФ 1.14.13.39), индуцибельная циклооксигеназа (COX2) (КФ 1.14.99.1), 5-липоксигеназа (КФ 1.13.11.34) и индуцибельная гемоксигеназа-1 (HO-1) (КФ 1.14.99.3) могут вызывать дополнительный выброс АФК [13]. Образованные в процессе ферментативных реакций с участием миелопероксидазы, эозинофильной пероксидазы АФК высвобождаются во внеклеточное пространство путем их секреции активированными лейкоцитами или путем прохождения АФК через плазматическую мембрану по анионным каналам (супероксиды) или аквапоринам (гидропероксиды) [13, 14, 23]. Внеклеточные АФК важны для защиты, например, как АФК в случае высвобождения эозинофилами в борьбе с макропаразитами и вызывающими повреждение не только соседних здоровых тканей, но и отдаленных тканей и органов, сигнализируя о локальном повреждении и активируя механизмы адаптации и хроническое повреждение [13]. Умеренные количества митохондриального супероксида и перекиси водорода играют важную роль в ряде клеточных сигнальных процессов и могут активировать сигнальные пути, которые способствуют выживанию клеток и устойчивости к болезням вследствие гормезиса (стимулирующее действие умеренных доз стрессоров) [24].

Продукция O_2^{2-} , H_2O_2 , $HOCl$ активированными фагоцитами является классическим примером запрограммированной метаболической генерации

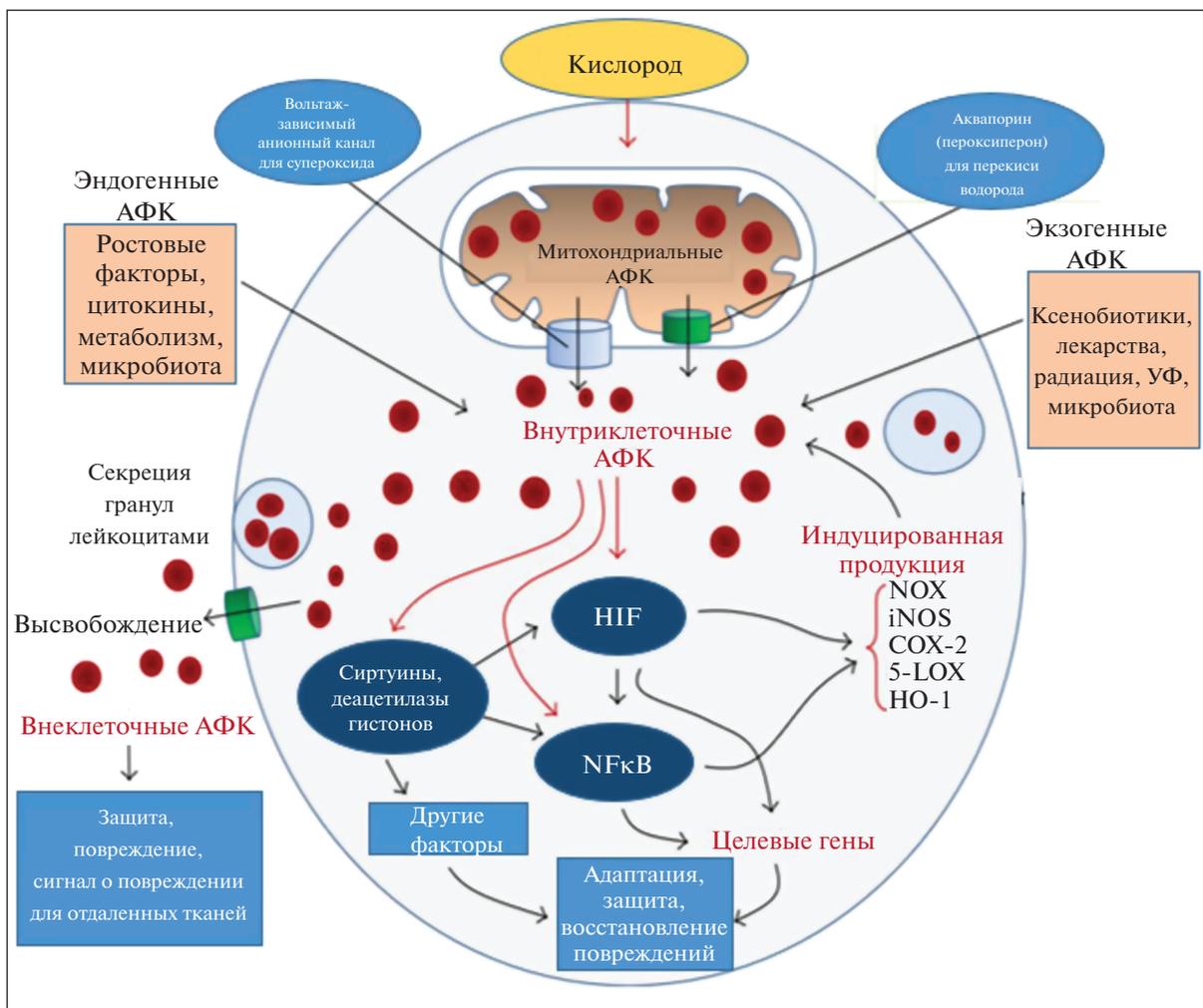


Рис. 1. Участие АФК экзогенного и эндогенного происхождения в различных клеточных процессах: защита, повреждение клетки, передача сигнала о повреждении для отдаленных тканей, адаптации и т.д.

АФК для обеспечения гомеостаза организма в борьбе с антигенами [15, 25, 26]. Главным событием образования АФК фагоцитами является сборка ферментативного комплекса NADPH-оксидазы (NOX) (КФ 1.6.3.1), локализующегося преимущественно на цитоплазматической мембране и в некоторых органеллах [27]. Основой NOX являются две мембранные единицы: p91phox и p22phox (phox – phagocyte oxidase, что подчеркивает фагоцитарную роль фермента). Субъединица p91phox содержит участок связывания NADPH и простетическую группу FAD в С-концевой части. В процессе активации NOX к мембранным субъединицам присоединяются цитоплазматические субъединицы (p40phox, p47phox, p67phox), а также малый G-белок Rac1 [27]. Процесс сборки комплекса начинается с белка p47phox, который заранее должен быть фосфорилирован протеинкиназой С. Данный процесс запускают сигналы от рецепторов фагоцитов, отвечающих за распознавание патогенов. В результате

сборка ферментативного комплекса приводит к тому, что gp91phox приобретает конформацию, которая способна передавать электрон, полученный от цитоплазматического NADPH, на молекулу кислорода O_2 . В результате этой реакции образуется супероксид-анион, обладающий низкой антибактериальной активностью [27]. В последующей реакции в присутствии супероксиддисмутазы супероксид-анион взаимодействует с H^+ в присутствии супероксиддисмутазы, в результате чего образуется перекись водорода, которая обладает выраженной антимикробной активностью. H_2O_2 вызывает окисление SH-групп белков и способствует перекисному окислению ненасыщенных жирных кислот. В присутствии миелопероксидазы формируются производные галогенов (например, хлорноватистая кислота, обладающая выраженным антимикробным эффектом) [27]. Так при взаимодействии $HOCl$ с аминокислотами проис-

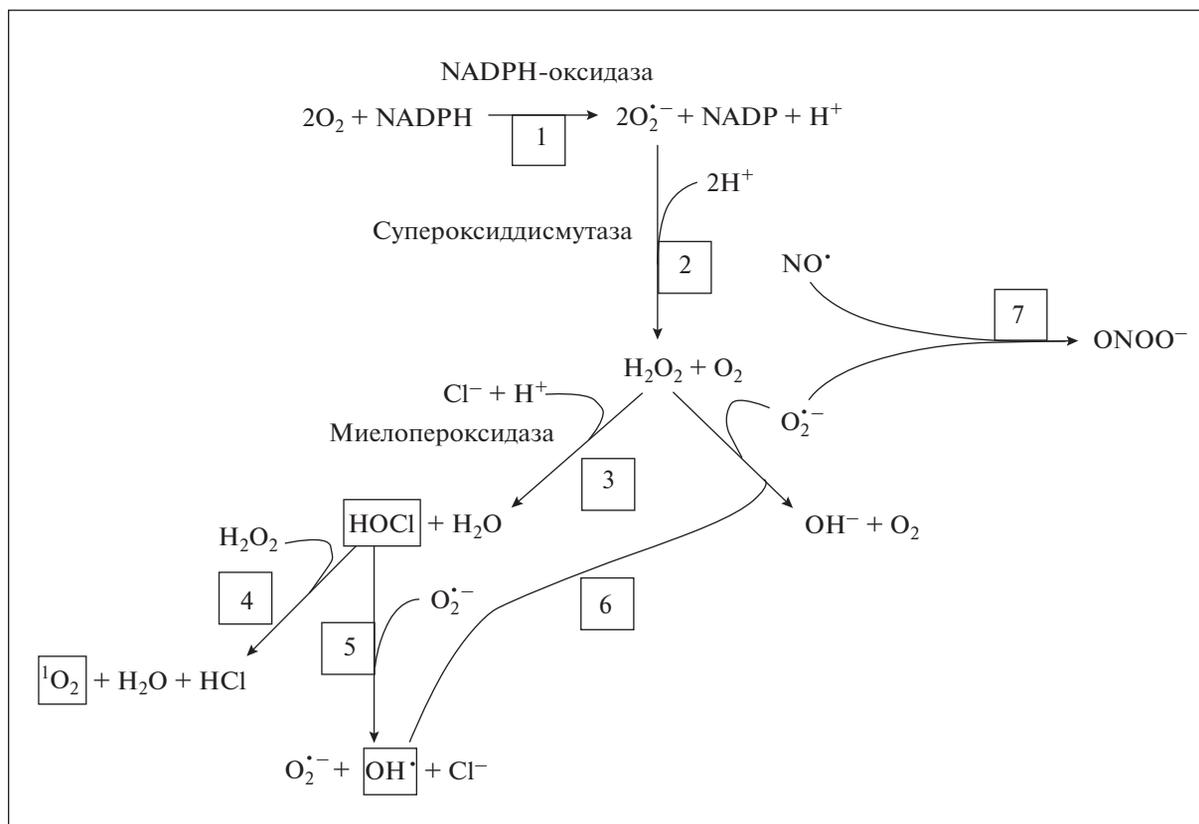


Рис. 2. Механизм синтеза АФК фагоцитирующими клетками. Реакция 1 – gp91phox приобретает конформацию, способную передавать электрон, полученный от цитоплазматического NADPH, на молекулу кислорода O_2 . В результате этой реакции образуется короткоживущий супероксид-анион ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Реакция 2 – супероксид-анион взаимодействует с H^+ , в результате чего образуется H_2O_2 , обладающая выраженной антимикробной активностью. Эта реакция протекает в присутствии фермента супероксиддисмутазы. Реакция 3 – в присутствии миелопероксидазы формируются производные галогенов. При наличии H^+ и Cl^- реакция протекает с образованием хлорноватистой кислоты (HOCl), которая обладает выраженным антимикробным эффектом. Реакция 4 – HOCl способна окисляться H_2O_2 с образованием синглетного кислорода (${}^1\text{O}_2$). Реакция 5 – HOCl может взаимодействовать с $\text{O}_2^{\bullet-}$, в результате чего образуется гидроксильный радикал (OH^{\bullet}) – один из самых токсичных производных кислорода. Реакция 6 – спонтанная дисмутация в присутствии ионов железа (реакция Фентона). Реакция 7 – формирование пероксинитрита.

ходит образование хлораминов, обладающих микробоцидным действием. HOCl может окисляться H_2O_2 с образованием синглетного кислорода (${}^1\text{O}_2$), который окисляет полиненасыщенные жирные кислоты, в результате чего происходит разрушение поверхностной мембраны микроорганизмов [27]. Хлорноватистая кислота способна взаимодействовать с супероксид-анионом, что приводит к образованию гидроксильного радикала. OH^{\bullet} образуется также в процессе спонтанной дисмутации, которая протекает в присутствии ионов железа [27]. Гидроксильный радикал – один из самых токсичных производных кислорода: он разрушает нити ДНК и пептидные связи внутри белковых молекул, окисляет сульфгидрильные группы и т.д. $\text{O}_2^{\bullet-}$ участвует в формировании пероксинитрита (OONO^-),

который окисляет SH-группы различных молекул. Кроме того, при взаимодействии супероксид-аниона с водой формируется молекула озона (O_3), обладающего широким микробоцидным действием [27].

Необходимо рассмотреть характерные черты и биологические функции основных представителей АФК и АФА.

ПЕРЕКИСЬ ВОДОРОДА (H_2O_2)

Перекись водорода является основным видом АФК, образующимся в качестве побочного продукта во время разнообразных клеточных процессов и являющимся конечным продуктом многочисленных метаболических реакций. H_2O_2 спо-

собна передавать клеточные сигналы, но в избытке может наносить вред клеткам и тканям. H_2O_2 является сильным двухэлектронным окислителем [28]. Она является более сильным окислителем, чем хлорноватистая кислота или пероксинитрит, но в отличие от этих высокореактивных веществ H_2O_2 имеет высокий энергетический барьер активации, который необходимо преодолеть для проявления окислительной способности. Переходные металлы, такие, как железо(II) и медь(I), могут расщеплять связь O—O H_2O_2 с образованием гидроксильных радикалов или комплексных соединений с металлом [28].

Перекись водорода является продуктом таких многочисленных метаболических процессов, как спонтанная дисмутация супероксидных радикалов, катаболизм полиаминов, тимидина, каталитический цикл цитохрома, работой таких ферментов, как NOXs, моноаминоксидазы, лизилоксидазы, дигидрооротатдегидрогеназа, пероксисомальные ферменты (ацил-КоА-оксидазы, d-аминокислотная оксидаза, d-аспартат-оксидаза и др.), система микросомальной монооксигеназы, фолдинг белков (ответ развернутого белка), метаболизм полиненасыщенных жирных кислот [1].

Перекись водорода способна участвовать в таких окислительных процессах, как деградация гемовых белков, выделение железа, инактивация ферментов и окисление ДНК, липидов, селенопротеинов, тиоловых групп и кетокислот [29].

Было показано, что добавление экзогенной H_2O_2 способствует активации внутриклеточных процессов, сопутствующих рецептор-зависимой стимуляции клеток. В эндотелиальных клетках низкие дозы H_2O_2 активируют эндоцитоз, как показано на примере флуоресцентно меченного декстрана. H_2O_2 также активирует сигнальные каскады тирозинкиназных рецепторов [30]. Внеклеточно добавленный H_2O_2 подобно инсулину активировал PI3-киназу и ее мишень — киназу Akt/PKB — в инсулин-чувствительных преадипоцитах 3T3-L1 [30].

Небольшие количества H_2O_2 (1–10 μM) не вызывают видимых повреждений клетки, но в то же время оказывают митогенный эффект: при добавлении к смешанной культуре лимфоцитов 10 μM H_2O_2 наблюдался значительный рост включения H^3 -тимидина (маркера пролиферативной активности клеток) [30].

ГИДРОКСИЛЬНЫЙ РАДИКАЛ (OH^\cdot)

Источники гидроксильного радикала — реакции с переходными металлами (реакция Фентона и Фентон-подобные реакции), пероксисомы, реакция $HOCl$ и OH^- , метаболизм тимидина [1]. OH^\cdot — высокоагрессивный вид радикалов, ответственный за окислительное повреждение большин-

ства биомолекул [1]. Агрессивные гидроксильные радикалы, возникающие в результате Фентон-подобных реакций, могут также образовываться в результате радиолиза воды. Сообщалось, что OH^\cdot является самым мощным окислительным радикалом, который может взаимодействовать в месте своего образования с большинством органических и неорганических молекул — ДНК, белков, липидов, аминокислот, сахаров и металлов [13]. Эти реакции характеризуются высокой скоростью из-за реактивности и короткого периода существования гидроксильных радикалов (период полураспада гидроксильных анионов составляет 10^{-9} секунд). Гидроксильный радикал — высокотоксичное вещество для клетки. Биологическая роль OH^\cdot неизвестна [13].

СУПЕРОКСИД-АНИОН (O_2^-)

Основными источниками супероксид-аниона являются митохондриальная цепь переноса электронов и мембраносвязанная NOX, а также супероксиддисмутазы, каталитический цикл цитохрома, митохондриальные ферменты (глицерол-3-фосфатдегидрогеназа, 2-оксоглутаратдегидрогеназа, NADH-цитохром b5 редуктаза и др.), ксантиноксидоредуктаза [1].

Разнообразные гормоны, включая факторы роста (тромбоцитарный фактор роста (PDGF), эпидермальный фактор роста (EGF), инсулин и IGF) и цитокины (ФНО- α и ангиотензин II) могут стимулировать выработку O_2^- NADPH-оксидазами неиммунных клеток [31]. O_2^- , образованный NOX, затем быстро превращается в H_2O_2 с помощью SOD.

Митохондриальный O_2^- участвует в таких процессах, как

1) инактивация митохондриальной аконитазы (редокс-регулируемый фермент цикла Кребса) посредством разрушения железо-серного кластера данного фермента и

2) индукция митохондриального перекисного окисления липидов (данный процесс происходит после реакций H_2O_2 с цитохромом c, что в свою очередь приводит к цитозольному высвобождению проапоптотических факторов [13]) [32].

После синтеза супероксид подвергается либо быстрой детоксикации с помощью митохондриальной MnSOD (Mn-зависимой супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1)) (MnSOD также разрушает перекись водорода), либо транспорту через митохондриальную мембрану, при этом супероксид проходит через вольтаж-зависимый анионный канал (митохондриальный порин) [13].

СИНГЛЕТНЫЙ КИСЛОРОД ($^1\text{O}_2$)

Синглетный кислород ($^1\text{O}_2$) — это электронно-возбужденная форма кислорода [33, 34].

Различные нефотосенсибилизированные механизмы его образования встречаются в биологических системах, но важность эндогенного образования синглетного кислорода имеет противоречивую историю [34]. Совсем недавно было показано, что антитела или аминокислоты катализируют превращение синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$) в озон (O_3) и что эта реакция происходит во время уничтожения бактерий активированными нейтрофилами [33].

Под действием солнечного света происходит генерация окислителей электронным возбуждением. Фотовозбуждение эндогенных или экзогенных молекул сенсibilизатора (фотосенсибилизация) приводит к образованию реакционноспособных частиц, в частности синглетного молекулярного кислорода, электронно-возбужденных карбониллов и супероксидных анионных радикалов; это может вызвать молекулярное повреждение. Волнами, имеющими биологическое значение, являются ультрафиолетовое бета-излучение (290–320 нм) и ультрафиолетовое альфа-излучение (320–400 нм). Известно, что видимый свет и даже инфракрасное альфа-излучение вызывают фотобиологические реакции [33].

С точки зрения здоровья человека, наиболее подвержены воздействию ультрафиолета такие ткани, как кожа и глаза. Синглетный кислород опосредует общую делецию митохондрий (образуются мутации в ДНК митохондрий), связанную с фотостарением [33]. Одним из генерирующих синглетный кислород фотосенсибилизаторов является липофусцин, который образуется в пигментном эпителии сетчатки с возрастом или в связи с такими генетическими нарушениями, как болезнь Старгардта [33]. Основным продуктом окисления митохондриальной ДНК является 7,8-дигидро-8-оксогуанин (8-охоG), а синглетный кислород способствует преимущественно образованию этого соединения в ДНК. Хотя реакция гидроксильного радикала с ДНК также приводит к образованию некоторого количества 8-охоG, однако эта реакция малозначима. Кроме того, генерация синглетного кислорода в присутствии карбониллов, аминокислот и белков в митохондриях обеспечивает среду для генерации митохондриального озона, который может способствовать разрывам двухцепочечной митохондриальной ДНК [33].

ПЕРОКСИНИТРИТ (OONO^-)

Пероксинитрит (ONOO^-) является сильным биологическим окислителем, образуется в результате диффузионно-ограниченной реакции окси-

да азота (NO^\bullet) и супероксид-аниона ($\text{O}_2^{\bullet-}$) [35]. Его относительно большой биологический период полураспада и высокая реакционная способность позволяют пероксинитриту окислять ряд различных мишеней в клетке [36]. В физиологических условиях пероксинитрит может непосредственно реагировать с тиолами, или радикальные продукты разложения пероксинитрита могут косвенно окислять другие клеточные компоненты, например, липиды, белки и ДНК. Окисленные модификации, образовавшиеся под действием пероксинитрита, запускают гибель клеток различными механизмами в зависимости от концентрации окислителя [36]. Пероксинитрит стимулирует некроз, апоптоз, аутофагию, партанатоз (форма программируемой клеточной гибели, характеризующаяся гиперактивацией поли(АДФ-рибоза)полимеразы 1-белка, участвующего в клеточном ответе на повреждение ДНК) и некроптоз [36]. Помимо концентрации пероксинитрита вид клеточной гибели определяется также типом клеток. Низкая концентрация пероксинитрита активирует сигнальные пути гибели клеток, что приводит к апоптозу. Высокая концентрация пероксинитрита стимулирует некроз. Пероксинитрит может активировать различные виды гибели клеток в одном типе клеток, например, апоптоз и партанатоз в корковых нейронах [36].

ОКСИД АЗОТА(II) (NO^\bullet)

Оксид азота — молекула с неспаренным электроном, довольно слабый окислитель. NO^\bullet вырабатывается из L-аргинина тремя основными изоформами синтазы оксида азота (NOS): эндотелиальной NOS (eNOS), связанной с вазодилатацией и регуляцией сосудов; нейрональной NOS (nNOS), которая связана с внутриклеточной передачей сигналов; и индуцибельной NOS (iNOS), которая имеет различные функции в зависимости от метаболических потребностей [37, 38]. В то время как выработка оксида азота с помощью nNOS и eNOS жестко регулируется кальцием с помощью кальмодулин-зависимого механизма, iNOS активируется в ответ на различные сигналы эндотоксина или цитокинов, что может привести к быстрому образованию больших потоков оксида азота [38].

Взаимодействие NO с окислителями и восстановителями может привести к появлению таких АФА, как нитроксильный анион (NO^- ; образуется при восстановлении NO^\bullet), высшие оксиды азота (NO_2 , N_2O_4 и т.д.), S-нитрозотиолы (RSNO), и динитрозильные комплексы с Fe. Удаление одного электрона NO^\bullet приводит к образованию катиона нитрозония (NO^+), который способен реагировать с нуклеофильными центрами, образуя нитрозосоединения. Нитрозилгалогениды выделяются, когда NO^\bullet реагирует с фтором, хлором или бромом [37].

Зависимая от оксида азота продукция цГМФ имеет широкий спектр мишеней, играет роль в регуляции ряда функций в нервной системе. Однако не все функции оксида азота опосредованы продукцией цГМФ [38]. Окислительные продукты оксида азота вскоре были обнаружены в макромолекулах и ряде белков. Было описано несколько механизмов нитрозилирования, включая окислительное S-нитрозирование, транс-нитрозилирование [38]. Нитрозилирование регулирует разнообразные процессы, происходит в функционально разнообразной группе белков в различных субклеточных структурах [38].

ХЛОРНОВАТИСТАЯ КИСЛОТА (HOCl)

Фермент миелопероксидаза превращает H_2O_2 и хлорид-ионы в HOCl, высокоактивная форма хлора, реагирующая с большинством биологически значимых соединений. HOCl (включая ее соль — гипохлорит натрия (NaOCl)) в качестве молекулярного (2-электронного) агента обладает сильной окислительной и хлорирующей способностью для обеспечения ярко выраженных бактерицидных и цитотоксических свойств [39]. Это делает HOCl одним из самых мощных окислителей *in vivo* [39].

БРОМНОВАТИСТАЯ КИСЛОТА (HOBr)

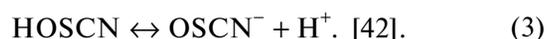
Эозинофильная пероксидаза (главный основной белок) и миелопероксидаза являются металлопротеидами, которые могут катализировать выработку HOBr [40, 41]. Реакция HOBr с гликозаминогликанами (гепарансульфатом, гепарином, хондроитинсульфатом и гиалуронатом) дает производные полимера N-бромпроизводные (бромамины, дибромамины, N-бромсульфонамиды и бромамиды). Разложение этих частиц, которое может происходить самопроизвольно и/или путем одноэлектронного восстановления низковалентными ионами переходных металлов (Cu^+ и Fe^{2+}), приводит к фрагментации и модификации полимера [40]. Реакция HOBr с белками приводит к генерации производных N-брома, а также к фрагментации полипептидного остова [40]. Реакция HOBr с внеклеточным матриксом, синтезируемым гладкомышечными клетками *in vitro*, индуцирует высвобождение углеводных и белковых компонентов. Разложение гликозаминогликанов и белков внеклеточного матрикса HOBr может способствовать повреждению ткани, связанному с такими воспалительными заболеваниями, как астма [40].

HOBr и HOCl окисляют тиолы, они также эффективно воздействуют на амины с образованием галоаминов в боковых цепях белка, свободных аминокислотах, нуклеиновых кислотах и аминокислотных фосфолипидах или с образованием

галоамидов на боковых цепях гликозаминогликанов [41]. Эти галоамины и галогенамиды сохраняют окислительную способность исходной гипогалогенной кислоты и, следовательно, могут генерировать последующие окислительные модификации [41]. HOBr и HOCl также эффективно реагируют с ароматическими кольцами в таких аминокислотах, как тирозин, триптофан и нуклеиновые кислоты. Их реакция с тирозином с образованием соответствующих 3-галотирозина и 3,5-дигалотирозина количественно незначительна, но примечательна как специфический биомаркер окислительного повреждения, вызванного HOBr и HOCl [41].

ГИПОТИОЦИАНОВАЯ КИСЛОТА (HOSCN)

Гипотиоциановая кислота (HOSCN) вырабатывается из тиоцианата (SCN^-) в биологических системах под действием ферментов пероксидазы [42, 43].



HOSCN играет важную роль в защитных механизмах млекопитающих благодаря своим антибактериальным свойствам. HOSCN также может генерироваться *in vivo* посредством реакции SCN^- с HOCl и HOBr. SCN^- присутствует в миллимолярных уровнях в таких биологических жидкостях, как слюна, молоко и слеза. SCN^- является основным субстратом для лактопероксидазы и близкородственной пероксидазы слюны, предпочтительным субстратом для миелопероксидазы и пероксидазы эозинофилов и также легко окисляется пероксидазой желудка и пероксидазой щитовидной железы [42].

Тиолы с низкой молекулярной массой, например, восстановленный глутатион GSH, являются важными мишенями для HOSCN. Это приводит к образованию нестабильных производных сульфенилтиоцианата ($RS-SCN$) [42]. При физиологическом pH эти вещества легко реагируют с другими молекулами тиола с образованием дисульфидов. Окисленный глутатион (GSSG) является единственным продуктом, наблюдаемым при обработке GSH с помощью HOSCN [42]. HOSCN реагирует преимущественно с тиоловыми группами белков, как было показано в исследованиях с изолированными белками и биологическими жидкостями, например, плазмой. Это приводит к генерации производных белка, содержащих группу $RS-SCN$, о чем свидетельствует обратимое включение в продукты реакции ^{14}C из $HOS^{14}CN$ [42].

НОSCN часто называют относительно мягким окислителем, который безвреден для клеток млекопитающих. Сообщается, что присутствие SCN⁻ и образование НОSCN пероксидазами является важным механизмом детоксикации, ответственным за удаление потенциально более вредных окислителей, таких как H₂O₂ или HOCl [42]. Однако НОSCN может вызывать лизис эритроцитов, действовать как вирулицидный агент, вызывать остановку роста или ингибировать деление клеток в ряде бактериальных клеток, ингибировать гликолиз и дыхание и снижение поглощения глюкозы [42]. Способность НОSCN вызывать гибель клеток через апоптоз и некроз, а также экспрессию тканевого фактора и молекул адгезии моноцитов показывает, что этот окислитель обладает значительным вредным воздействием. Воздействие на клетки млекопитающих [42]. В частности, индукция ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1, также CD54), VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule 1, “вазкулярная молекула клеточной адгезии 1”) и E-селектина (гликопротеин, находящийся на клеточной поверхности, относится к классу молекул клеточной адгезии; рецептор к некоторым углеводным лигандам лейкоцитов крови), вероятно, играет значительную роль в развитии атеросклеротического поражения и поддерживает недавние исследования, которые предоставляют *in vivo* доказательства участия SCN⁻ — производных в патогенезе заболеваний коронарных артерий [42, 43].

Таким образом, существует большое разнообразие форм АФК и АФА, которые обладают уникальными характеристиками и метаболическими особенностями.

Клетки имеют антиоксидантные защитные механизмы, позволяющие инактивировать чрезмерно продуцируемые АФК и АФА. Баланс между продукцией и устранением АФК и АФА приводит к внутриклеточному гомеостазу, в то же время чрезмерное отклонение концентраций АФК и АФА в ту или иную сторону приводит к повреждению клетки, что в дальнейшем может приводить к различным негативным последствиям (в т.ч. их гибели, трансформации в опухолевую клетку, инсулинорезистентности и т.д.) [1, 3, 13, 14]. В умеренных концентрациях данные свободные радикалы являются посредниками реакций, с помощью которых уничтожаются поврежденные клетки и продукты их распада выводятся из организма [3]. В случае уменьшения концентрации АФК и АФА в организме есть вероятность столкнуться с изменением в таких необходимых защитных механизмах, как апоптоз, фагоцитоз и детоксикация [13]. Хорошо известно, что АФК и АФА в низких концентрациях являются сигнальными молекулами, модулирующими пролиферацию клеток и экспрессию генов посредством активации таких фак-

торов транскрипции, как NF-каппа-B и индуцируемый гипоксией фактор-1α (HIF-1α) [23]. Повышение продукции АФК в результате действия на клетку различных провоспалительных молекул (ФНО-α, липополисахариды, тромбин) может опосредовать активацию NF-κB и последующую индукцию воспалительных генов, изменяя активность протеасом, транскрипцию антиоксидантных генов, активацию воспалительных процессов и секрецию цитокинов (например, митоген-активируемые протеинкиназы (MAPKs) (КФ 2.7.11.24), которые активируют факторы транскрипции AP-1, и IκB киназы (IKK), которые затем осуществляют активацию NF-каппа-B и интерлейкина-1-бета (IL-1β)) [1, 3, 13, 23]. Провоспалительные цитокины, ФНО-α, IL-1β и IFN-γ, могут дополнительно усиливать окислительный стресс у человека, вызывая выработку АФК [23]. Кроме этого, АФК играют важную роль в процессах передачи сигналов клеток сосудов, включая активацию эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) (КФ 1.14.13.39) (H₂O₂ индуцирует экспрессию гена eNOS в эндотелиальных клетках посредством Ca²⁺/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II/янус киназа 2 (нерецепторная тирозинкиназа)-зависимого пути) и стимуляцию роста и миграцию клеток посредством модуляции внутриклеточного кальция, активации NF-каппа-B и p38 митоген-активируемой протеинкиназы (p38MAPK) ((КФ 2.7.11.24) и протеинкиназы B (PKB) (КФ 2.7.11.1) [5, 10, 11].

АФК И ФЕРРОПТОЗ

АФК задействованы в многочисленных клеточных процессах, это подтверждается еще одной их важной ролью: активация апоптоз-независимой клеточной смерти — ферроптоза [44]. Ферроптоз является регулируемой формой гибели клеток, вызванной потерей активности фермента репарации липидов глутатионпероксидазы 4 (GPX4) и последующим накоплением активных форм кислорода на основе липидов (АФК), в частности гидропероксидов липидов (липидов, подвергшихся окислению перекисью водорода). Эта форма железозависимой гибели клеток генетически, биохимически и морфологически отличается от других форм гибели клеток (апоптоза, нерегулируемого некроза и некроптоза) [44].

Активация митохондриальных вольтаж-зависимых анионных каналов и MAPKs, стрессорное воздействие на эндоплазматический ретикулум и ингибирование цистин — глутаматного антипортера вовлечены в индукцию ферроптоза [45, 46]. Этот процесс характеризуется накоплением продуктов перекисного окисления липидов (ППОЛ) и АФК, образовавшихся в результате метаболизма железа (реакция Фентона). ППОЛ оказывают токсическое воздействие через два основных меха-

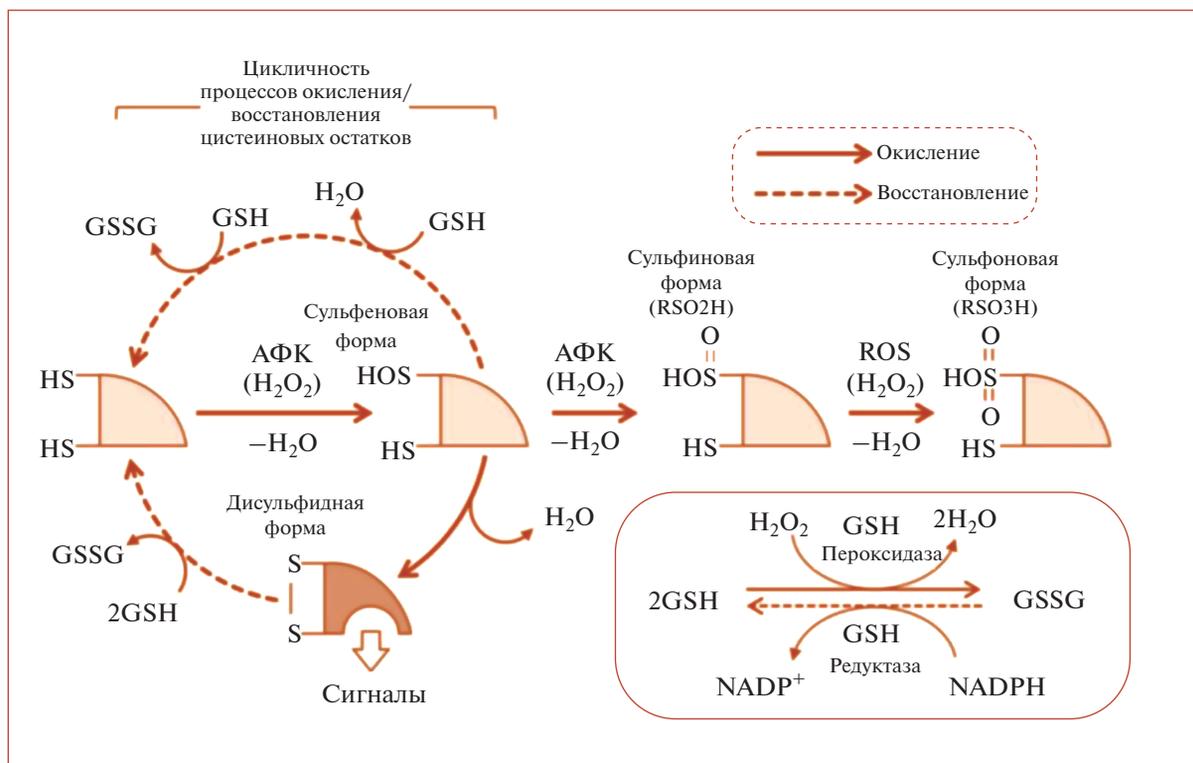


Рис. 3. Окисление остатков цистеина активными формами кислорода и образование глутатионилированных белков. Цистеиновые остатки белка окисляются, при этом образуются сульфеновые группы. Последние могут образовывать дисульфидную связь с SH-группой другого цистеинового остатка. Сульфеновая группа и дисульфидная связь могут быть редуцированы с помощью различных антиоксидантов в клетках, таких как глутатион (GSH). Таким образом, белок может быть избирательно и обратимо окислен АФК, а такой измененный белок способен генерировать клеточные сигналы. Сульфеновая группа может быть в дальнейшем окислена с образованием сульфиновой и сульфонильной групп, которые не могут быть восстановлены в нормальной внутриклеточной системе.

низма. Поскольку липиды отвечают за поддержание целостности клеточных мембран, ППОЛ изменяют состав, структуру и динамику липидных мембран. Будучи высокореактивными соединениями, ППОЛ также могут способствовать большему образованию АФК или превращаться в реакционноспособные соединения, способные сшивать ДНК и белки [46]. Ферроптоз может быть фармакологически ингибирован хелаторами железа (например, дефероксамином и мезилатом десферриоксамина) и ингибиторами перекисного окисления липидов (например, ферростатином, липроксстатином) [46]. Глутатионпероксидаза 4, белок теплового шока бета-1 и эритроидный ядерный фактор (Nrf2) функционируют как подавляющие ферроптоз факторы, ограничивая выработку АФК и снижая клеточное поглощение железа. Напротив, NADPH-оксидаза и p53 (особенно мутантный p53 с дефектом ацетилирования) [45] действуют в качестве активаторов ферроптоза, стимулируя продукцию АФК и ингибируя экспрессию SLC7A11 (специфическая легко-цепочечная субъединица цистин/глутаматного антипортера) соответственно [46].

АФК КАК ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ МЕССЕНДЖЕРЫ

АФК способны действовать как внутриклеточные мессенджеры, т.е. изменять внутриклеточное окислительно-восстановительное состояние и/или структуру и функцию белка путем модификации аминокислотных остатков, а редокс-состояние ряда белков может влиять на клеточный метаболизм [47–49]. Среди АФК перекись водорода представляет собой небольшой, незаряженную, свободно диффундирующую молекулу, которая может быть синтезирована и быстро разрушена в ответ на внешние раздражители. Эти свойства молекулы соответствуют всем важным критериям внутриклеточного мессенджера. Многочисленные исследования подтверждают тот факт, что перекись водорода – это повсеместный внутриклеточный мессенджер [47–50].

Другой вид АФК, гидроксильный радикал (OH[•]), является наиболее реакционноспособным ввиду его наименьшего периода полураспада в тканях (10⁻⁹ с) по сравнению с другими АФК [1]. Он окисляет практически любой клеточный ком-

понент, с которым сталкивается, и является токсичным для клетки соединением из-за высокой вероятности окислительного повреждения. Ввиду этой реакционной способности и отсутствия специфичности считается, что гидроксильный радикал не играет сигнальной роли в клетках [49].

Перекись водорода – это наиболее стабильная форма АФК, с предполагаемым периодом полураспада в клетках примерно 1 мс. H_2O_2 способна диффундировать через мембраны. Клетки, по-видимому, регулируют транспорт H_2O_2 путем изменения липидного состава мембран, тем самым поддерживая клеточную концентрацию H_2O_2 [51]. Мембранный транспорт перекиси водорода дополнительно облегчается аквапориновыми каналами [52, 53].

Таким образом, данные о молекуле дают основание предположить, что перекись водорода является основной формой АФК, участвующей в окислительно-восстановительной передаче сигналов у эукариот. Рассмотрим отличия клеточных мишеней супероксида и перекиси водорода. В клетках бактерий одной из мишеней супероксида являются железо-серные кластеры в белках, как это видно при супероксид-опосредованной инактивации митохондриального фермента аконитазы (КФ 4.2.1.3) [54]. Известно, что различные железо-серные белки участвуют в репликации, транскрипции и репарации ДНК [55]. Еще один представитель семейства АФК, супероксид-анион, несет отрицательный заряд, что ограничивает его способность к диффузии через мембраны [49]. “Однако существуют доказательства того, что супероксид может транспортироваться из митохондрий в цитоплазму с помощью вольтаж-зависимого анионного канала” [49]. Супероксид обладает высокой реакционной способностью в отношении железо-серных кластеров в белках и реагирует с ними со скоростью, ограниченной только диффузией [49]. Данные реакции могут способствовать высвобождению свободного железа и вызывать структурные изменения, что в результате приводит к изменению активности белка. В растворах очищенных белков супероксид реагирует с остатками цистеина с образованием тиольного радикала [49]. Последующая реакция тиольного радикала с кислородом приводит к образованию супероксида, который затем превращается в пероксид водорода. *In vivo* скорость спонтанной или катализируемой ферментами реакции дисмутации супероксида в пероксид водорода очень высокая, что делает участие супероксида в окислении тиолов белков маловероятным способом окислительно-восстановительной сигнализации [49].

Супероксид может реагировать с оксидом азота с образованием пероксинитрита с различными последствиями. Основной мишенью окислительно-

восстановительной передачи сигнала перекисью водорода являются остатки цистеина в белках [49].

Одним из правил в путях передачи сигнала является то, что образуемые модификации регуляторных молекул должны быть обратимыми; то есть каждый компонент клеточной сигнализации имеет два возможных состояния: включенное и выключенное. Двухэлектронное окисление остатков цистеина перекисью водорода приводит к образованию сульфеновой кислоты. Это промежуточное соединение может образовывать меж- или внутримолекулярные дисульфидные связи или образовывать ковалентную связь с глутатионом. Тирозинфосфатазы являются хорошо известными мишенями для перекиси водорода. Эти белки обычно отключают пути передачи сигналов тирозинкиназы и, следовательно, их инактивация может приводить к передаче сигналов [36, 49].

Второе правило в путях передачи сигнала – это специфичность. Центральные вопросы в области окислительно-восстановительного баланса в отношении этого правила:

- 1) какие белки нацелены на АФК для инициирования сигнального пути;
- 2) как достигается специфичность.

Стоит подчеркнуть одно ключевое различие между окислительно-восстановительной передачей сигналов и традиционными путями передачи сигнала. Последние начинаются со связывания лиганда, например, факторов роста, цитокинов или стероидных гормонов с мембранными или внутриклеточными рецепторами. Гироксилирование крупных молекулярных структур приводит к индуцированному соответствию [49]. Напротив, окислительно-восстановительная передача сигналов инициируется через ковалентное взаимодействие, перекись водорода реагирует с тиольной группой определенного остатка цистеина [49]. В клетках содержится большое количество цистеин-содержащих белков, которые являются носителями большого количества потенциальных рецепторов, и это ставит вопрос о том, как можно достичь специфичности [49]. Ограничения, налагаемые критериями передачи сигналов, дают ответ на то, как достигается специфичность редокс-сигнализации: ключевые взаимодействия ограничены быстрыми реакциями, нацеленными на специфический цистеин в определенном белке [49]. Вероятность окисления уникального остатка цистеина в определенном белке зависит от концентрации этого остатка/белка в клетке, аминокислот, окружающих цистеин, расположения белка относительно источника образования перекиси водорода [49].

Пероксиредоксины (КФ 1.11.1.15) представляют собой семейство белков, которые проявляют особенно высокие константы скорости реакции с перекисью водорода, порядка 10^5 – 10^7 $M^{-1} s^{-1}$ [56].

Они присутствуют в клетках в относительно высокой концентрации для белков: приблизительно 20 μM [57]. Модельные исследования показывают, что уникальная белковая среда вокруг каталитического остатка цистеина в пероксиредоксине стабилизирует переходное состояние реакции, что делает эти белки особенно хорошо приспособленными к реакции с перекисью водорода [49]. Тиолы в белках частично окружены водной, но все же их основным окружением являются белковые структуры. При этом белковые аминокислотные остатки обеспечивают взаимодействия зарядов, диполей и водородных связей, которые окружают тиолы [49].

Высокая реакционная способность, относительно большое количество и распределение членов семейства пероксиредоксинов по разным клеточным компартментам соответствуют ожидаемым критериям для белков, которые участвуют в клеточных сигнальных путях. Расположение потенциальных мишеней относительно источника генерации перекиси водорода является еще одним компонентом специфичности в редокс-сигнализации [49]. Это иллюстрируется протеин-тирозин-фосфатазой (РТР1В) (КФ 3.1.3.48) и окислительно-восстановительной передачей сигналов после связывания лиганда с рецепторной тирозинкиназой. РТР1В должен конкурировать с пероксиредоксинами в качестве мишени для перекиси водорода [49]. Константы скорости реакции перекиси водорода с $\text{P}r\text{x}2$ (пероксиредоксином) и РТР1В составляют 2×10^7 и $20 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ соответственно [49]. Согласно “модели шлюза” (рис. 4), передача сигналов достигается посредством локальной инактивации пероксиредоксинов. Связывание лиганда с рецепторами тирозинкиназы приводит к фосфорилированию и инактивации $\text{P}r\text{x}1$. Переокисление таргетированного остатка цистеина в $\text{P}r\text{x}2$ превращает тиоловую группу в сульфоновую кислоту и инактивирует этот фермент. В результате могут накапливаться достаточно высокие уровни перекиси водорода для таргетирования белков сигнального пути (таких, как РТР1В) [49].

АФК передают сигналы во многих метаболических путях, таких как:

1) пути, определяющие пролиферацию и срок жизни клеток через MAP-киназы, PI3-киназу (КФ 2.7.1.137), PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10, фосфатаза с двойной субстратной специфичностью) (КФ 3.1.3.67) и протеин-тирозин-фосфатазы (КФ 3.1.3.48) [59–61];

2) гомеостаз АФК и регуляция антиоксидантных генов с помощью Ref-1 (англ. redox factor-1), Nrf-2, тиоредоксина и др. [62, 63];

3) старение, процесс опосредован p66Shc (данный белок участвует в регуляции клеточного уровня АФК) [64];

4) реакция повреждения ДНК – через киназу АТМ (англ. ataxia telangiectasia mutated, серин/треонинная протеинкиназа, которая рекрутируется и активируется дунитевыми разрывами ДНК) (КФ 2.7.11.1); это может способствовать ингибированию mTORC1, что приведет к подавлению синтеза белка и активации аутофагии [65, 66];

5) гомеостаз железа – с помощью железорегуляторных белков (IRP) и чувствительных к железу элементов (IRE) и т.д. [67, 68];

6) модуляция HIF-сигналинга [69–71].

АНТИОКСИДАНТНАЯ ЗАЩИТА КЛЕТОК. СТАРЕНИЕ

Антиоксидантная защита человека сложна и выполняет задачу установления физиологически важного уровня АФК в клетке с возможностью функционирования клеточной передачи сигналов, в то же время минимизирует уровни АФК, чтобы не допустить окислительного повреждения.

Клеточное окислительно-восстановительное равновесие тщательно поддерживается эндогенной антиоксидантной защитной системой, которая включает эндогенные антиоксидантные ферменты и участники этих реакций, такие как супероксиддисмутаза (SOD) (КФ 1.15.1.1), каталаза (CAT) (КФ 1.11.1.6), глутатионпероксидаза (GPx) (КФ 1.11.1.9), глутатион (GSH), глутатионредуктаза (GR) (КФ 1.8.1.7), частично фермент глутатион-S-трансфераза (GST) (КФ 2.5.1.18), белки и неферментативные низкомолекулярные акцепторы (мочевая кислота, коэнзим Q и липоевая кислота). Данными свойствами обладают также экзогенные антиоксиданты: бутилированный гидроксианизол (BHA), бутилированный гидрокситолуол (BHT), пропилгаллат (PG) и трет-бутилгидрохинон (TBHQ) [3, 13, 23].

Антиоксидантную защиту в клетке можно разделить на два вида в соответствии с механизмом действия.

Первая группа – антиоксиданты, которые снижают возможность образования новых свободных радикалов или предотвращают развитие цепных реакций. Антиоксиданты имеют эндогенное и экзогенное происхождение и составляют гетерогенную группу, которая включает супероксиддисмутазу (SOD), каталазу (CAT) и глутатионпероксидазу (GPX), глутатион, альбумин, белки, которые связывают металлы (ферритин и церулоплазмин), ионы металлов (Se, Cu и Zn) [9, 29], витамины С и Е, каротиноиды и флавоноиды [9, 30]. Вторая группа – ферменты, которые восстанавливают повреждение, вызванное свободными радикалами. Это липазы, протеазы, ферменты репарации ДНК, трансферазы и метионин-сульфоксидредуктазы (КФ 1.8.4.11) [72–74].

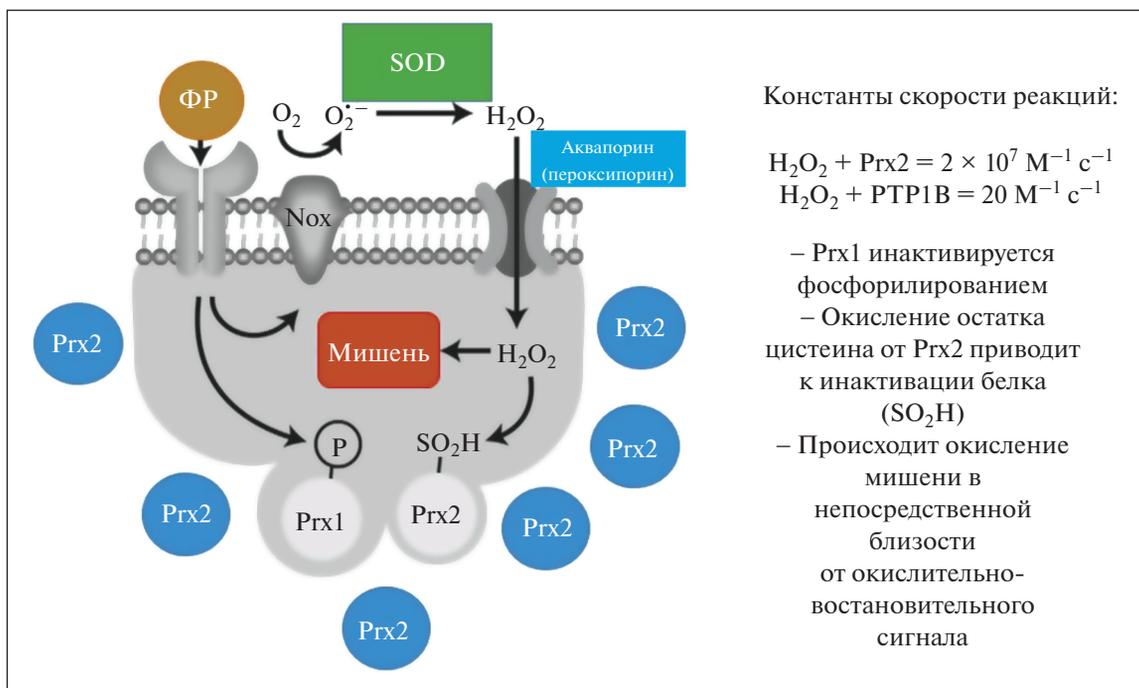


Рис. 4. В так называемой модели шлюза преодолены кинетические ограничения окислительно-восстановительной сигнализации, а специфичность достигается благодаря непосредственной близости сигнальной мишени и источника генерации перекиси водорода [58]. Модель шлюза показана здесь с протеин-тирозин-фосфатазой 1В (PTR1B) в качестве сигнальной мишени. Пероксиредоксины (Prx) присутствуют в клетках в относительно высоких концентрациях и очень эффективно разрушают перекись водорода по сравнению со скоростью реакции PTR1B и перекиси водорода. Однако для окисления PTR1B может накапливаться достаточное количество перекиси водорода, тем не менее, после инактивации Prx1 фосфорилированием, вызванным активацией рецепторной тирозинкиназы факторами роста (ФР), остаток цистеина, принадлежащий Prx2, необратимо окисляется до сульфоновой кислоты (SO₂H) [49].

Интересно отметить, что в физиологических условиях баланс между прооксидантными и антиоксидантными веществами поддерживается с перевесом в пользу прооксидантных продуктов, что способствует умеренному окислительному стрессу, так как данное состояние необходимо для оптимального функционирования иммунной системы и процессов передачи сигналов в клетке [23]. Однако ввиду непрерывного образования АФК и поддержания его на физиологическом уровне постоянно происходят небольшие повреждения внутри клетки. Именно поэтому существует потребность во второй группе эндогенной антиоксидантной системы защиты, которая удаляет или восстанавливает поврежденные биомолекулы до того, как произошло их накопление, что привело бы к изменению клеточного метаболизма и необратимому повреждению [75]. Поврежденные таким образом нуклеиновые кислоты восстанавливаются специфическими ферментами, окисленные белки удаляются протеолитическими системами, а окисленные липиды восстанавливаются фосфолипазами, пероксидазами и ацилтрансферазами [76].

Установлено, что нарушения в некоторых или во всех восстановительных системах в большей степени способствуют старению и возникновению возрастных заболеваний, чем умеренные колебания уровня веществ с антиоксидантными свойствами и образование АФК [2, 14]. В стареющих клетках значительно снижается эффективность работы многих систем репарации, накапливаются повреждения клеток, например, происходит накопление липофусцина в цитоплазме [2]. Возрастные окислительные изменения наиболее заметны в непролиферирующих клетках, таких как нейроны и кардиомиоциты, так как у них не происходит “разбавления” поврежденных структур посредством деления клеток [2, 77, 78].

Сложный процесс биологического старения является результатом действия генетических и экологических факторов, а также времени. Ключевыми изменениями во время старения являются воспаление, иммунное старение и клеточное старение. Старение — это необратимая форма длительной остановки клеточного цикла, вызванная чрезмерным внутриклеточным или внеклеточным стрессом, или повреждением [79]. Цель этой остановки клеточных циклов — ограничение пролиферации

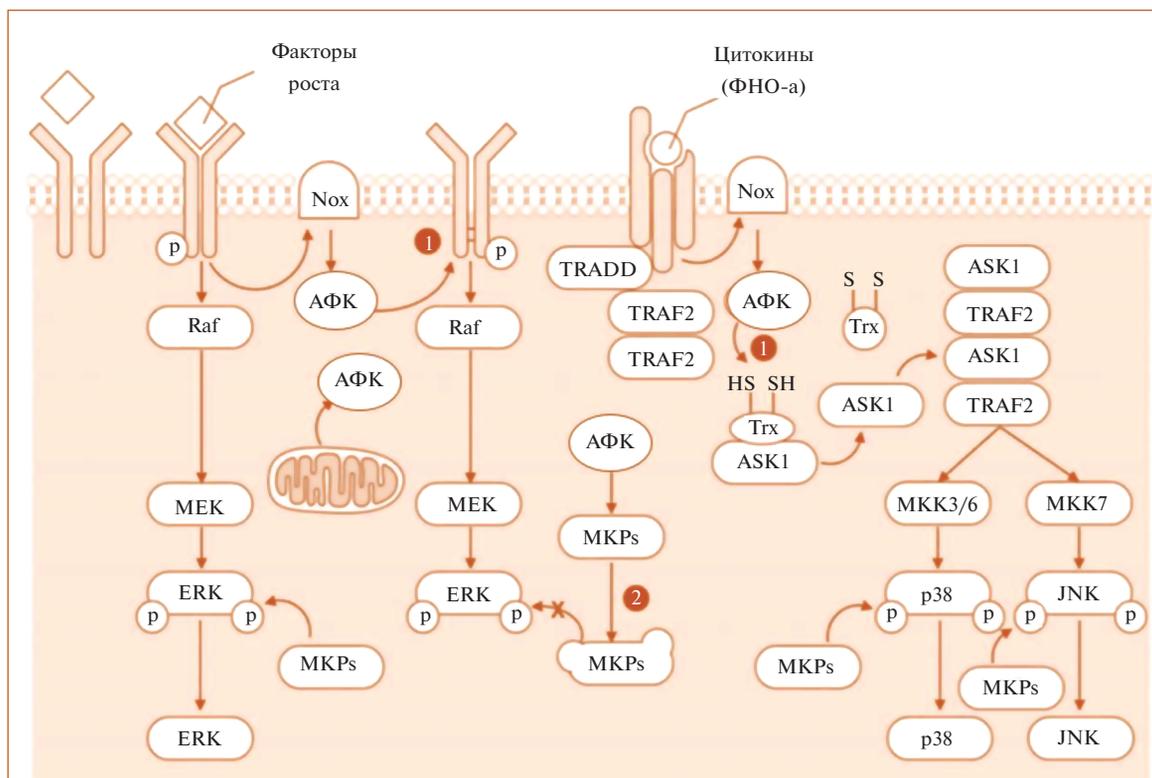


Рис. 5. Предполагаемые механизмы АФК-опосредованной активации путей MAPK. АФК генерируются в процессе реакций с различными NOX, которые активируются факторами роста, цитокинами и разнообразными стрессорами и быстро удаляются внутриклеточными антиоксидантами. АФК (как только выработка АФК превышает способность антиоксидантов) могут индуцировать окислительную модификацию сигнальных белков MAPK, включая RTKs и MAP3K (см. путь 1), тем самым приводя к активации MAPK. АФК могут активировать пути MAPK посредством ингибирования и/или деградации МКР (см. путь 2). МКPs – MAPK фосфатазы, они дефосфорилируют MAPKs, тем самым инактивируя их. MAPK фосфатазы обеспечивают отрицательную обратную связь, тем самым модулируя продолжительность, величину и пространственно-временной профиль активности MAPK в ответ на физиологические и патологические стимулы [72].

поврежденных клеток, устранение накопленных вредных факторов и предотвращение трансформации злокачественных клеток. Поскольку биологический возраст не обязательно должен соответствовать хронологическому возрасту, важно найти конкретные признаки и биомаркеры, которые могли бы объективно определять темп старения человека [79]. Эти биомаркеры могут быть ценными показателями физиологического возраста. Биомаркеры должны соответствовать нескольким критериям. Например, они должны предсказывать скорость старения, контролировать основную процесс, лежащий в основе процесса старения, иметь возможность многократно тестироваться, не нанося вреда человеку [79]. Кроме того, биомаркеры должны быть индикаторами биологических процессов, патогенных процессов или фармакологических реакций на терапевтическое вмешательство. Считается, что длина теломера является недостаточно объективным биомаркером (с плохой прогностической точностью), и в

настоящее время нет надежного биомаркера, отвечающего всем необходимым критериям [79].

С возрастом увеличивается продукция АФК, при этом эффективность работы некоторых эндогенных защитных механизмов снижается [2, 80–82]. Например, взаимодействие митохондрий с ядром и изменения митохондриального гомеостаза приводят к возрастным изменениям. Неэффективный контроль АФК над митохондриальными суперкомплексами вызывает изменение сигнала АФК, направляя реакцию клеток на стресс в сторону возрастозависимого повреждения [83, 84]. Прогрессирующее снижение АФК-поглотителей приводит к сдвигу статуса стареющих клеток в сторону прооксидантного статуса [85]. Именно поэтому существует потребность во второй группе эндогенной антиоксидантной системы защиты, которая удаляет или восстанавливает поврежденные биомолекулы до того, как произошло их накопление, что привело бы к изменению клеточного метаболизма и необратимому повреждению [85, 86].

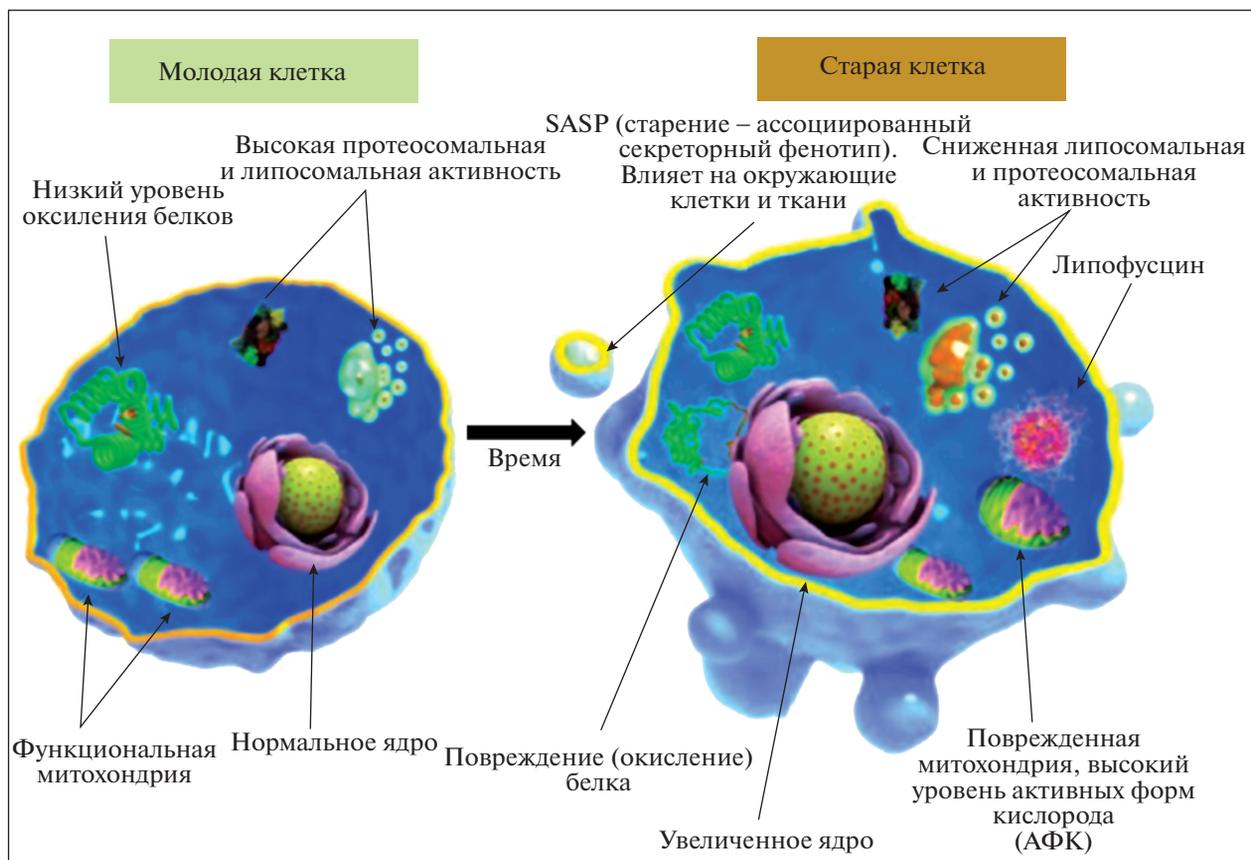


Рис. 6. Сравнение структур молодой и старой клеток: в старых клетках выражены процессы окисления, накопление липофусцина, повреждение органоидов.

Этот дисбаланс приводит к прогрессирующему повреждению клеточных структур, предположительно приводящему к фенотипу старения. Данное предположение поддерживается двумя направлениями исследований [87–89].

Первое направлено на измерение концентрации продуктов/маркеров окислительного стресса в стареющих клетках, тканях или организмах. Было показано, что карбонилированные белки (маркеры тяжелого и хронического окислительного стресса) находятся в повышенных концентрациях в последней трети жизни. Эти белки были обнаружены в культуре тканей дермальных фибробластов человека, хрусталике глаза и мозге человека, полученных при вскрытии, печени крысы и цельных мухах [90–92].

Другое направление исследований основано на искусственном индуцировании окислительного стресса в клетках с помощью окислительных веществ. В модели, названной стресс-индуцированным преждевременным старением, клетки были смешаны с субтоксическими концентрациями оксиданта H_2O_2 или генераторами оксидантов (паракват, УФ, железо или медь) [93–95]. Таким образом,

индуцировалась реакция хронического стресса, что приводило к фенотипическому старению. При этом проявляются общие особенности старения: сверхэкспрессия p21 и p16INK4a, увеличение активности SA- β -Gal, увеличение клеточного объема и приобретение клеткой круглой формы [96, 97]. Кроме того, в эксперименте, в котором клетки были подвержены гипероксии (как известно, она индуцирует хронический окислительный стресс), было показано сходство паттерна экспрессии генов у клеток с индуцированным окислительным стрессом по сравнению со стареющими фибробластами [98, 99]. Существуют и другие способы воспроизведения отдельных признаков клеточного старения, например, накопление внутриклеточного белка путем искусственного воздействия липофусцином на клетки [2, 100].

Однако, еще раз подчеркнем, старение – это многофакторный естественный процесс, зависящий от времени, с характерным прогрессирующим снижением большинства физиологических функций. Старение связано с повышенным уровнем окислительного стресса, различными типами макромолекулярных изменений, накоплением продуктов метаболизма, которые могут оказывать негатив-



Рис. 7. Схема концепции геронтологии. Представлен подход к изучению патогенеза возрастных заболеваний. Факторы окружающей среды и генетические факторы оказывают влияние на ряд ключевых клеточных процессов и путей, которые недавно были определены как отличительные признаки старения. Многие из этих путей способствуют возникновению хронического воспаления и старению [111].

ный эффект, повреждений дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), например, из-за совершения ошибок в ходе репликации ДНК-полимеразами, сбоя работы репарационных систем [101]. Поскольку большинство клеточных функций выполняется белками, старение может быть в какой-то степени следствием нарушения регуляции протеостаза или изменением функционирования протеома [2]. Более того, не все клеточные белки могут быть ресинтезированы из-за возникающих в результате старения повреждений ДНК [2, 101, 102].

В случае преждевременного возникновения окислительного стресса происходит накопление внутриклеточных повреждений, обычно наблюдаемых в пожилом возрасте — это так называемое преждевременное старение. Преждевременное старение чаще затрагивает определенные ткани/органы, а не организм в целом. Например, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), вызванная курением, вероятно, является результатом ускоренного старения легких, вызванного сигаретным дымом [103, 104]. Ожирение и диабет могут способствовать возникновению сердечно-сосудистых заболеваний и заболеваний почек, потенциально это происходит через индукцию преждевременного старения клеток в других тканях [105]. Было показано, что высокий уровень глюкозы, связанный с диабетом, способствует старению эпителиальных клеток *in vitro*. Высокий уровень глюкозы в крови может привести к гликированию белков, что нарушает их нормальную функцию. Кроме того, конечные продукты гликирования (белки или липиды, которые подверглись гликированию углеводами) могут взаимодействовать с мембранными рецепторами клеток, которые изменяют внутриклеточную передачу сигналов и способствуют выработке провоспалительных цитокинов и АФК [106, 107]. Было проведено ограниченное количество исследований, которые предпо-

лагают, что конечные продукты гликирования могут выступать в качестве пускового механизма для стимулирования старения клеток [108, 109].

Факторы, способствующие ускорению старения, включают генетические, хронические, а также такие связанные с образом жизни заболевания, как ожирение, сердечно-сосудистые заболевания и диабет 2 типа [2, 110].

ВЫВОДЫ

- 1) Активные формы кислорода и азота, постоянно генерируемые в организме, необходимы для осуществления регуляторных механизмов в клетке и защиты от микроорганизмов, но также являются и причиной некоторых патологических состояний, включая рак;
- 2) Активные АФК непрерывно продуцируются во время нормального клеточного метаболизма;
- 3) Антиоксидантная защита человека сложна и выполняет задачу установления физиологически важного уровня АФК в клетке с возможностью функционирования клеточной передачи сигналов, в то же время минимизирует уровни АФК, чтобы не допустить окислительного повреждения;
- 4) Старение ассоциировано с окислительным стрессом, различными изменениями в клеточных структурах и макромолекулах, а также повреждением ДНК;
- 5) Несмотря на новые открытия на клеточном и молекулярном уровне, понимание процесса старения все еще ограничено.

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. *Snezhkina A., Kudryavtseva A., Kardymon O., Savvateva M.V., Melnikova N.V., Krasnov G.S.* // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019. V. 2019. P. 1–17.
<https://doi.org/10.1155/2019/6175804>
2. *Höhn A., Weber D., Jung T., Ott C., Hugo M., Kochlik B., Kehm R., König J., Grune T., Castro J.P.* // *Redox. Biol.* 2017. V. 11. P. 482–501.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.001>
3. *Poljsak B.* // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2011. V. 2011. P. 1–15.
<https://doi.org/10.1155/2011/194586>
4. *Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Cross C.E.* // *J. Lab. Clin. Med.* 1992. V. 119. P. 598–620.
5. *Gutteridge J.M.C.* // *Free Radic. Res. Commun.* 1993. V. 19. P. 141–158.
<https://doi.org/10.3109/10715769309111598>
6. *Scriven P., Brown N.J., Pockley A.G., Wyld L.* // *J. Mol. Med.* 2007. V. 85. P. 331–341.
<https://doi.org/10.1007/s00109-006-0150-5>
7. *Santos C.X.C., Tanaka L.Y., Wosniak J., Laurindo F.R.M.* // *Antioxid. Redox. Sign.* V. 11. P. 2409–2427.
<https://doi.org/10.1089/ars.2009.2625>
8. *Pegg A.E.* // *IUBMB Life.* 2009. V. 61. P. 880–894.
<https://doi.org/10.1002/iub.230>
9. *Elamin Y.Y., Rafee S., Osman N., O'Byrne K.J., Gately K.* // *Cancer Microenviron.* 2016. V. 9. P. 33–43.
<https://doi.org/10.1007/s12307-015-0173-y>
10. *Tabata S., Yamamoto M., Goto H., Hirayama A., Ohishi M., Kuramoto T., Mitsuhashi A., Ikeda R., Haraguchi M., Kawahara K., Shinsato Y., Minami K., Saijo A., Hanibuchi M., Nishioka Y., Sone S., Esumi H., Tomita M., Soga T., Furukawa T., Akiyama S.* // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 6760–6767.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-25189-y>
11. *Brown N.S., Jones A., Fujiyama C., Harris A.L., Bicknell R.* // *Cancer Res.* 2000. V. 60. P. 6298–6302.
12. *Halliwell B.* // *Trends Pharmacol. Sci.* 2011. V. 32. P. 125–130.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.12.002>
13. *Tafani M., Sansone L., Limana F., Arcangeli T., De Santis E., Polese M., Fini M., Russo M.A.* // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016. V. 2016. P. 1–18.
<https://doi.org/10.1155/2016/3907147>
14. *Sosnowska B., Mazidi M., Penson P., Gluba-Brzózka A., Rysz J., Banach M.* // *Atherosclerosis.* 2017. V. 265. P. 275–282.
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.08.027>
15. *Brand M.D.* // *Exp. Gerontol.* 2010. V. 45. P. 466–472.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.01.003>
16. *Yasui H., Hayashi S., Sakurai H.* // *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2005. V. 20. P. 1–13.
<https://doi.org/10.2133/dmpk.20.1>
17. *Whatley S.A., Curti D., Gupta F.D., Ferrier I.N., Jones S.J., Taylor C., Marchbanks R.M.* // *Mol. Psychiatry.* 1998. V. 3. P. 227–237.
<https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000375>
18. *Hey-Mogensen M., Goncalves R.L.S., Orr A.L., Brand M.D.* // *Free Radic. Biol. Med.* 2014. V. 72. P. 149–155.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.007>
19. *Zhang L., Yu L., Yu C.A.* // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 33972–33976.
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.51.33972>
20. *Kaludercic N., Mialet-Perez J., Paolocci N., Parini A., Di Lisa F.* // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2014. V. 73. P. 34–42.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.12.032>
21. *Wang S.* // *Dyes and Pigments.* 2008. V. 76. P. 714–720.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2007.01.012>
22. *Narváez R., Bandala O., Sol E., Hernández L., Manuel J.* // *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2018. V. 16. P. 1515–1526.
<https://doi.org/10.1007/s13762-018-1764-1>
23. *Poljsak B., Šuput D., Milisav I.* // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013. V. 2013. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1155/2013/956792>
24. *Hunt P.R., Son T.G., Wilson M.A., Yu Q.S., Wood W.H., Zhang Y., Becker K.G., Greig N.H., Mattson M.P., Camandola S., Wolkow C.A.* // *PLoS One.* 2011. V. 6. P. e21922.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021922>
25. *Deng W.-M.* // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019. V. 1167. P. 8–250.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021922>
26. *Mut-Salud N., Álvarez P., Garrido J., Carrasco E., Aránega A., Rodríguez-Serrano F.* // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016. V. 2016. P. 1–19.
<https://doi.org/10.1155/2016/6719534>
27. *Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Борисов А.Г.* // *Инфекция и иммунитет.* 2017. Т. 7. С. 327–340. [*Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V., Borisov A.G.* // *J. Infect.* 2017. V. 7. P. 327–340.]
<https://doi.org/10.15789/2220-7619-2017-4-327-340>
28. *Winterbourn C.C.* // *Antioxid. Redox. Sign.* 2018. V. 29. P. 541–551.
<https://doi.org/10.1089/ars.2017.7425>
29. *Son Y., Kim S., Chung H.-T., Pae H.-O.* // *Methods Enzymol.* 2013. V. 528. P. 27–48.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-405881-1.00002-1>
30. *Ткачук В.А., Тюрин-Кузьмин П.А., Белоусов В.В., Воротников А.В.* // *Биол. мембраны.* 2012. Т. 29. С. 21–37. [*Tkachuk V.A., Tyurin-Kuzmin P.A., Belousov V.V., Vorotnikov A.V.* // *Biol. Membrany.* 2012. V. 29. P. 21–37.]
31. *Veal E.A., Day A.M., Morgan B.A.* // *Mol. Cell.* 2007. V. 26. P. 1–14.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.016>
32. *Radi R.* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2018. V. 115. P. 5839–5848.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1804932115>
33. *Onyango A.N.* // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016. V. 2016. P. 1–22.
<https://doi.org/10.1155/2016/2398573>
34. *Stanley C.P., Maghzal G.J., Ayer A., Talib J., Giltrap A.M., Shengule S., Wolhuter K., Wang Y., Chadha P., Suarna C.,*

- Prysyazhna O., Scotcher J., Dunn L.L., Prado F.M., Nguyen N., Odiba J.O., Baell J.B., Stasch J.P., Yamamoto Y., Mascio P.D., Eaton P., Payne R.J., Stocker R.* // Nature. 2019. V. 566. P. 548–552.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-0947-3>
35. *Radi R.* // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. P. 26464–26472.
<https://doi.org/10.1074/jbc.r113.472936>
36. *Ramdiel K., Franco M.C., Estevez A.G.* // Brain Res. Bull. 2017. V. 133. P. 4–11.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.05.008>
37. *Alhasawi A., Legendre F., Jagadeesan S., Appanna V., Appanna V.* // Microb. Divers. Genom. Era. 2019. V. 2017. P. 153–169.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814849-5.00010-1>
38. *Adams L., Franco M.C., Estevez A.G.* // Exp. Biol. Med. 2015. V. 240. P. 711–717.
<https://doi.org/10.1177/1535370215581314>
39. *Schröter J., Schiller J.* // Oxid. Med. Cell. Longev. 2016. V. 2016. P. 1–26.
<https://doi.org/10.1155/2016/8386362>
40. *Rees M.D., McNiven T.N., Davies M.J.* // J. Biochem. 2007. V. 401. P. 587–596.
<https://doi.org/10.1155/2016/8386362>
41. *Colon S., Page-McCaw P., Bhave G.* // Antioxid. Redox Sign. 2017. V. 27. P. 839–854.
<https://doi.org/10.1089/ars.2017.7245>
42. *Hawkins C.L.* // Free Radic. Res. 2009. V. 43. P. 1147–1158.
<https://doi.org/10.3109/10715760903214462>
43. *Ismael F.O., Barrett T.J., Sheipouri D., Brown B.E., Davies M.J., Hawkins C.L.* // PLoS One. 2016. V. 11. P. e0168844.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168844>
44. *Yang W.S., Stockwell B.R.* // Trends Cell Biol. 2016. V. 26. P. 165–176.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.10.014>
45. *Jiang L., Kon N., Li T., Wang S.J., Su T., Hibshoosh H., Baer R., Gu W.* // Nature. 2015. V. 520. P. 57–62.
<https://doi.org/10.1038/nature14344>
46. *Xie Y., Hou W., Song X., Yu Y., Huang J., Sun X., Kang R., Tang D.* // Cell Death Differ. 2016. V. 23. P. 369–379.
<https://doi.org/10.1038/cdd.2015.158>
47. *Schieber M., Chandel N.S.* // Curr. Biol. 2014. V. 24. P. R453–R462.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
48. *Saha S., Lee S., Won J., Choi H.Y., Kim K., Yang G.-M., Dayem A.A., Cho S.-G.* // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18. P. 1544–1574.
<https://doi.org/10.3390/ijms18071544>
49. *Briehl M.* // Redox Biol. 2015. V. 5. P. 124–139.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.04.002>
50. *Nikolenko V.N., Gridin L.A., Oganessian M.V., Rizaeva N.A., Podolskiy Y.S., Kudryashova V.A., Kochurova E.V., Kostin R.K., Tyagunova E.E., Mikhaleva L.M., Avila-Rodriguez M., Somasundaram S.G., Kirkland C.E., Aliev G.* // Curr. Top. Med. Chem. 2019. V. 19. P. 2991–2998.
<https://doi.org/10.2174/1568026619666191127122452>
51. *Bienert G.P., Schjoerring J.K., Jahn T.P.* // Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 2006. V. 1758 P. 994–1003.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.015>
52. *Sies H.* // Redox Biol. 2017. V. 11. P. 613–619.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>
53. *Hara-Chikuma M., Satooka H., Watanabe S., Honda T., Miyachi Y., Watanabe T., Verkman A.S.* // Nat. Commun. 2015. V. 6. P. 7454.
<https://doi.org/10.1038/ncomms8454>
54. *Gardner P.R., Raineri I., Epstein L.B., White C.W.* // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 13399–13405.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.22.13399>
55. *White M.F., Dillingham M.S.* // Curr. Opin. Struct. Biol. 2012. V. 22. P. 94–100.
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2011.11.004>
56. *Winterbourn C.C.* // Nat. Chem. Biol. 2008. V. 4. P. 278–286.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.85>
57. *Ferrer-Sueta G., Manta B., Botti H., Radi R., Trujillo M., Denicola A.* // Chem. Res. Toxicol. 2011. V. 24. P. 434–450.
<https://doi.org/10.1021/tx100413v>
58. *Dickinson B.C., Chang C.J.* // Nat. Chem. Biol. 2011. V. 7. P. 504–511.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.607>
59. *Marinho H.S., Real C., Cyrne L., Soares H., Antunes F.* // Redox Biol. 2014. V. 2. P. 535–562.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.02.006>
60. *McCord J.M., Fridovich I.* // Antioxid. Redox Sign. 2014. 20. P. 1548–1549.
<https://doi.org/10.1089/ars.2013.5547>
61. *Sarsour E.H., Kalen A.L., Goswami P.C.* // Antioxid. Redox Sign. 2014. 20. P. 1618–1627.
<https://doi.org/10.1089/ars.2013.5303>
62. *Moldogazieva N.T., Mokhosoev I.M., Feldman N.B., Lutsenko S.V.* // Free Radic. Res. 2018. V. 52. P. 507–543.
<https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1457217>
63. *Zhu L., Lu Y., Zhang J., Hu Q.* // Adv. Exp. Med. Biol. 2017. V. 967. P. 385–398.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-63245-2_25
64. *Ferrer-Sueta G., Manta B., Botti H., Radi R., Trujillo M., Denicola A.* // Chem. Res. Toxicol. 2011. V. 24. P. 434–450.
<https://doi.org/10.1021/tx100413v>
65. *Prasad S., Gupta S., Pandey M., Tyagi A.K., Deb L.* // Oxid. Med. Cell. Longev. 2016. V. 2016. P. 1.
<https://doi.org/10.1155/2016/5010423>
66. *Balani S., Nguyen L.V., Eaves C.J.* // Nat. Commun. 2017. V. 8. P. 1–10.
<https://doi.org/10.1038/ncomms15422>
67. *Ray P.D., Huang B.-W., Tsuji Y.* // Cell Signal. 2012. V. 24. P. 981–990.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>
68. *Geybels M.S., van den Brandt P.A., van Schooten F.J., Verhage B.A.J.* // Cancer Epidem. Biomar. 2015. V. 24. P. 178–186.
<https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-14-0968>
69. *Jaramillo M.C., Zhang D.D.* // Gene Dev. 2013. V. 27. P. 2179–2191.
<https://doi.org/10.1101/gad.225680.113>
70. *Carocho M., Ferreira I.C.F.R.* // Food Chem. Toxicol. 2013. V. 51. P. 15–25.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>

71. Jungwoon L., Yee S.C., Haiyoung J., Inpyo C. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018. V. 2018. P. 1–13. <https://doi.org/10.1155/2018/4081890>
72. Boutros T., Chevet E., Metrakos P. // *Pharmacol. Rev.* 2008. V. 60. P. 261–310. <https://doi.org/10.1124/pr.107.00106>
73. Zhong S., Jeong J.-H., Chen Z., Chen Z., Luo J.-L. // *Transl. Oncol.* 2020. V. 13. P. 57–69. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2019.10.001>
74. Doppler H., Storz P. // *Front. Oncol.* 2017. V. 7. P. 1–41. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00041>
75. Carrier A. // *Antioxid. Redox Signal.* 2017. V. 26. P. 429–431. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6929>
76. Kallaur A.P., Reiche E.M.V., Oliveira S.R., Simao A.N.C., Pereira W.L.D.J., Alfieri D.F., Flauzino T., Proenca C.D., Lozovoy M.A.B., Kaimen-Maciel D.R., Maes M. // *Mol. Neurobiol.* 2017. V. 54. P. 31–44. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9648-6>
77. Lindqvist D., Dhabhar F.S., James S.J., Hough C.M., Jain F.A., Bersani F.S., Reus V.I., Verhoeven J.E., Epel E.S., Mahan L., Rosser R., Wolkowitz O.M., Mellon S.H. // *Psychoneuroendocrinology.* 2017. V. 76. P. 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.11.031>
78. Krakhmal N.V., Zavyalova M.V., Denisov E.V., Viorushin S.V., Perelmutter V.M. // *Acta Naturae.* 2015. V. 7. P. 17–28. <https://doi.org/10.32607/20758251-2015-7-2-17-28>
79. Dodig S., Čepelak I., Pavić I. // *Biochem. Med. (Zagreb).* 2019. V. 29. P. 483–497. <https://doi.org/10.11613/bm.2019.030501>
80. Rinnerthaler M., Bischof J., Streubel M.K., Trost A., Richter K. // *Biomol.* 2015. V. 5. P. 545–589. <https://doi.org/10.3390/biom5020545>
81. Espinosa-Diez C., Miguel V., Mennerich D., Kietzmann T., Sánchez-Pérez P., Cadenas S., Lamas S. // *Redox Biol.* 2015. V. 6. P. 183–197. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.008>
82. Sies H., Berndt C., Jones D.P. // *Annu. Rev. Biochem.* 2017. V. 86. P. 715–748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>
83. Yang L., Zheng L., Tian Y., Zhang Z.Q., Dong W.L., Wang X.F., Zhang X.Y., Cao C. // *Exp. Cell. Res.* 2015. V. 332. P. 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.12.017>
84. Harisa G.I. // *Saudi Pharm. J.* 2015. V. 23. P. 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2014.04.006>
85. Hall S.R., Blundon H.L., Ladda M.A., Robertson A.W., Martinez-Farina C.F., Jakeman D.L., Goralski K.B. // *Pharmacol. Res. Perspect.* 2015. V. 3. P. e00110. <https://doi.org/10.1002/prp2.110>
86. Wilson A.J., Kerns J.K., Callahan J.F., Moody C.J. // *J. Med. Chem.* 2013. V. 56. P. 7463–7476. <https://doi.org/10.1021/jm400224q>
87. Corcoran A., Cotter T.G. // *FEBS J.* 2013. V. 280. P. 1944–1965. <https://doi.org/10.1111/febs.12224>
88. Truong T.H., Carroll K.S. // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2013. V. 48. P. 332–356. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.790873>
89. Sabharwa S.S., Schumacker P.T. // *Nat. Rev. Cancer.* 2014. V. 14. P. 709–721. <https://doi.org/10.1038/nrc3803>
90. Porter K.M., Kang B.-Y., Adesina S.E., Murphy T.C., Hart C.M., Sutliff R.L. // *PLoS One.* 2014. V. 9. P. e98532. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098532>
91. Zhao W., Ma G., Chen X. // *Vascul. Pharmacol.* 2014. V. 63. P. 162–172. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2014.06.008>
92. Spencer N.Y., Engelhardt J.F. // *Biochem.* 2014. V. 53. P. 1551–1564. <https://doi.org/10.1021/bi401719r>
93. Dang W. // *Drug Discov. Today Technol.* 2014. V. 12. P. e9–e17. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2012.08.003>
94. Woo H.A., Yim S.H., Shin D.H., Kang D., Yu D.Y., Rhee S.G. // *Cell.* 2010. V. 140. P. 517–528. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.009>
95. Koppenol W.H., Bounds P.L., Dang C.V. // *Nat. Rev. Cancer.* 2011. V. 11. P. 325–337. <https://doi.org/10.1038/nrc3038>
96. Reuter S., Gupta S.C., Chaturvedi M.M., Aggarwal B.B. // *Free Radic. Biol. Med.* 2010. V. 49. P. 1603–1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>
97. Rudolf E., Rudolf K. // *Apoptosis.* 2015. V. 20. P. 1651–1665. <https://doi.org/10.1007/s10495-015-1182-5>
98. Zeng L., Yang Y., Hu Y., Sun Y., Du Z., Xie Z., Zhou T., Kong W. // *PLoS One.* 2014. V. 9. P. e88019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088019>
99. Castro J.P., Grune T., Speckmann B. // *Biol. Chem.* 2016. V. 397. P. 709–724. <https://doi.org/10.1515/hsz-2015-0305>
100. Pernodet N., Dong K., Pelle E. // *Int. J. Cosmet. Sci.* 2016. V. 67. P. 13–20.
101. König J., Besoke F., Stuetz W., Malarski A., Jahreis G., Grune T., Höhn A. // *BioFactors.* 2016. V. 42. P. 307–315. <https://doi.org/10.1002/biof.1274>
102. Kudryavtseva A.V., Krasnov G.S., Dmitriev A.A., Alekseev B.Y., Kardymon O.L., Sadritdinova A.F., Snezhkina A.V. // *Oncotarget.* 2016. V. 7. P. 7–25. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9821>
103. Mercado N., Ito K., Barnes P.J. // *Thorax.* 2015. V. 70. P. 482–489. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2014-206084>
104. Hepple R.T. // *Free Radic. Biol. Med.* 2016. V. 98. P. 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.017>
105. Burton D.G.A., Faragher R.G.A. // *Biogerontology.* 2018. V. 19. P. 447–459. <https://doi.org/10.1007/s10522-018-9763-7>
106. Singh V.P., Bali A., Singh N., Jaggi A.S. // *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 2014. V. 18. P. 1–14. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2014.18.1.1>
107. Reeg S., Jung T., Castro J.P., Davies K., Henze A., Grune T. // *Free Radic. Biol. Med.* 2016. V. 10. P. 153–166. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.002>

108. *Toda N., Okamura T.* // J. Clin. Pharmacol. 2013. V. 53. P. 1228–1239.
<https://doi.org/10.1002/jcph.179>
109. *Flohe L.* // Free Radic. Res. 2016. V. 50. P. 126–142.
<https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1046858>
110. *Sies H.* // Redox biol. 2015. V. 4. P. 180–183.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>
111. *Campisi J., Kapahi P., Lithgow G.J., Melov S., Newman J.C., Verdin E.* // Nature. 2019. V. 571. P. 183–192.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1365-2>

Reactive Oxygen Species: Involvement in Cell Processes and Progression of Pathology

T. I. Shlapakova*, R. K. Kostin*, #, and E. E. Tyagunova*

*Phone: +7 (950) 768-48-78; e-mail: rkostin2000@mail.ru

*Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Trubetskaya ul. 8/2, Moscow, 119991 Russia

Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) are not only by-products of chemical reactions, but also players in various cellular processes: protection against pathogenic microorganisms (H_2O_2 , HOCl, ONOO⁻, O₂⁻, OH[•]), fertilization (H_2O_2), cell division (O₂⁻), apoptosis (H_2O_2), regeneration (H_2O_2), direction coordination of cellular movement, regulation of vascular tone (NO[•]), etc. The balance between the production and elimination of ROS and RNS leads to intracellular homeostasis, while their excessive formation leads to cell damage and, most likely, a change in their metabolism. ROS and RNS are able to act as intracellular messengers or change the intracellular redox state and/or protein structure and function by modifying amino acid residues (mainly cysteine), affecting cellular metabolism. Hydrogen peroxide is the main form of ROS involved in redox signalling in eukaryotes. Alterations in antioxidant systems are linked to aging and the occurrence of age-related diseases. Aging is primarily associated with increased levels of oxidative stress, various types of macromolecular changes and the accumulation of damage to deoxyribonucleic acid (DNA). Since most of the cellular functions are performed by proteins, aging can be to some extent a consequence of proteostasis dysregulation or a change in the functioning of the proteome. Moreover, not all cellular proteins can be resynthesized due to DNA damage resulting from aging. Thus, the reactive forms of oxygen and nitrogen, constantly generated in the body, are very important factors in various regulatory mechanisms of the cell, but they are also the cause of some pathological conditions, including cancer. It is known that ROS regulate the metabolism of signalling molecules necessary for the implementation of the cell cycle. Moreover, ROS are able to change the activity of iron-containing proteins. Aging as a result of ineffective antioxidant defense work is associated with oxidative stress, various changes in cell structures, macromolecules and DNA damage.

Keywords: reactive oxygen species, reactive nitrogen species, antioxidant defense, intracellular messengers, redox signaling, hydrogen peroxide, superoxide anion, hydroxyl radical, hypochlorous acid, hypobromous acid, hypochlorous acid, peroxyxynitrite, nitric oxide, ferroptosis, iron-sulfur clusters, aging, antioxidants



УДК 576.1+551.7

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ – ВЕРОЯТНЫЕ РОДОНАЧАЛЬНИКИ ЖИЗНИ

© 2020 г. С. П. Коваленко[#]*Институт микробиологии НАН Беларуси, Республика Беларусь, 220141 Минск, ул. акад. В.Ф. Купревича, 2*

Поступила в редакцию 31.12.2019 г.

После доработки 17.02.2020 г.

Принята к публикации 20.02.2020 г.

Проанализированы материальные и энергетические ресурсы, способные обеспечить абиотические синтезы веществ, из которых сформировались предбиологические структуры. Показано, что основными исходными веществами могли быть одноуглеродные соединения, в том числе формальдегид и цианистый водород. В качестве возможных энергетических ресурсов рассматриваются вулканическая активность и фотохимическое действие солнечных УФ-лучей. В результате реакций между исходными веществами и фоторедукции их продуктов в серосодержащих водоемах синтезировались аминокислоты, липиды, углеводы и нуклеотиды. Циклы увлажнения/высушивания водоемов благоприятствовали полимеризации мономеров (аминокислот и нуклеотидов). Среди возникших олигонуклеотидов могли оказаться рибозимы. Некоторые из них катализировали процессы удлинения олигонуклеотидов. Удлиненные РНК-подобные структуры приобретали новые функции, в том числе способность катализировать репликацию РНК. Слои из липидоподобных пептидов и жирных кислот исполняли роль простейших мембран, образуя протоклетки. Детали описанных процессов обсуждаются.

Ключевые слова: фоторедукция, серпентинизация, увлажнение/высушивание, гидролиз, полимеризация, конденсирующие агенты, РНК, репликация, катализаторы, рибозимы, протоклетки

DOI: 10.31857/S0132342320040144

ВВЕДЕНИЕ

Человечество всегда интересовалось, как появились на Земле живые существа, создавая множество мифов. Первая научная теория происхождения жизни предложена русским биохимиком А.И. Опариным [1] еще в первой четверти прошлого века. Согласно ей из неорганических веществ в “первичном бульоне” синтезировались белковые молекулы, сформировавшие фазово-обособленные коллоидные структуры (коацерваты), которые эволюционировали под действием естественного отбора, в результате чего образовались живые клетки. Однако в то время не существовало достаточной экспериментальной базы для строго научных исследований происхождения жизни на Земле.

Наш век ознаменовался бурной интенсификацией исследований этой проблемы. Она была подготовлена величайшими достижениями второй половины двадцатого века: открытием структуры и функций ДНК и РНК, расшифровкой генетического кода, прочтением геномов многих живых существ, развитием компьютерной техники, созданием огромных баз данных о строении белков и нуклеиновых кислот филогенетически различ-

ных организмов, миниатюризацией исследовательских процессов, открытием ферментативных свойств РНК, разработкой методов искусственной эволюции нуклеиновых кислот и селекции активных рибозимов, а также большим прогрессом в области геохимии, геофизики, космохимии и других смежных наук.

В результате этих успехов идеи Ч. Дарвина относительно “маленького теплого пруда” и А.И. Опарина об “обособлении из первичного бульона предбиологических структур” стали наполняться конкретным содержанием на базе надежных экспериментальных данных.

УФ-излучение Солнца инициировало в атмосфере и наземных водоемах фотохимические процессы, в результате которых неорганические соединения стали источниками “сырья” для синтезов большого числа органических веществ. Из них образовались аминокислоты, сахара, липиды и нуклеотиды.

Расчеты показывают достаточность суммы магматических, атмосферных и космических ресурсов для поддержания непрерывного абиотического синтеза важнейших биомолекул и сборки функциональных структур.

[#] Автор для связи: (эл. почта: spkvalenko2008@mail.ru).

На русском языке проблема происхождения жизни освещается недостаточно. Со времени издания книг К.Ю. Еськова [2], Е.В. Кунина [3] и М.А. Никитина [4] прошли годы, и за это время накопилось много новых важных результатов. Например, в лаборатории Дж. Сазерленда создана система, в которой на основе всего четырех исходных веществ в результате окислительно-восстановительных процессов, инициируемых УФ-облучением, могут синтезироваться главные компоненты живых организмов [5–7]. Группе ученых во главе с Ф. Холлиджером удалось осуществить самокопирование всей нуклеотидной последовательности рибозима (правда, пока только по частям) [8] и тем самым продемонстрировать принципиальную возможность рибозимного синтеза самокопирующейся молекулы РНК. В лаборатории Дж. Шостака добились неферментативного матричного синтеза цепочек ДНК длиной до 25 нуклеотидов в модельных протоклетках [9]. Учтывая, что многие активные рибозимы имеют примерно такую же или даже меньшую длину, можно считать, что проблема их абиотического копирования решена. Дж. Шостак [10] и Р. Кришнамурти [11, 12] практически одновременно экспериментально доказали возможность формирования однородных по углеводным компонентам молекул РНК и ДНК из образовавшейся абиогенно смеси нуклеотидов с различными углеводными компонентами их молекул.

Данный обзор представляет собой попытку восполнить вышеуказанный пробел в публикациях на русском языке по проблеме происхождения жизни, а также выделить из огромного научного материала, накопленного при ее исследовании, важнейшие факты и связать их в правдоподобную систему процессов, возможно, способствовавших возникновению предбиологических структур, обладающих потенциалом для превращения в живые организмы.

РЕСУРСЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ЗАРОЖДЕНИЯ ЖИЗНИ

Для возникновения сложной системы, которую представляют собой живые существа, необходимы, как минимум, три условия:

1. Наличие разнообразных минеральных и органических веществ и их постоянный обильный приток.
2. Жидкость, в которой они могли бы растворяться, стекать в одно место и там накапливаться. Это условие одновременно накладывает ограничения на температурный диапазон и размеры участков их накопления.
3. Источники энергии для их химических преобразований.

Согласно современным геологическим и космологическим представлениям (см. [2, 13–16] и ссылки в них), Земля сформировалась 4.56 млрд лет назад из газопылевого облака. Химический состав таких облаков достаточно изучен. Водорода в них на порядок больше, чем гелия, и в 1000 раз больше, чем кислорода. Кислорода явно не хватает на окисление всех химических элементов, поскольку атомарное соотношение $O : C : N : Si : Mg : Fe : S$ (самых распространенных элементов, исключая водород и инертные газы) равняется $100 : 60 : 20 : 10 : 10 : 10 : 5$ [17]. Один только углерод мог бы связать весь кислород в CO_2 , не говоря уж о многократно превосходящем его водороде. При формировании планеты химические элементы вступали в жесткую конкуренцию за кислород. Поэтому он оказался полностью связанным в окислах, вероятно, с низшей степенью окисления, а многие металлы остались неокисленными. Образовались также простейшие соединения: гидриды, карбиды, нитриды, сульфиды, фосфиды, галогениды и др.

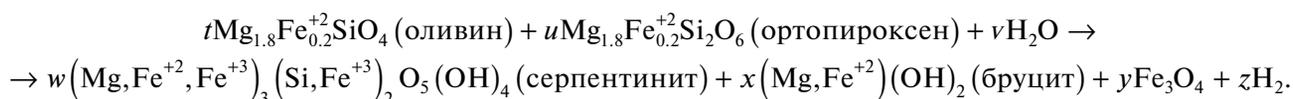
Первые полмиллиарда лет (катархейский эон) практически не оставили надежных данных, позволяющих оценить температурный режим, наличие и состав атмосферы, гидросферы, соотношение поверхностей суши и океана и т.п. Многие геологи считают, что Земля изначально оказалась обделенной водой и другими летучими веществами из-за “выдувания” их солнечным ветром, не имела гидросферы и атмосферы и лишь “поздняя тяжелая бомбардировка” метеоритами, кометами и астероидами (о времени и интенсивности которой судят по ее следам, сохранившимся на Луне) восполнила этот дефицит [13–15]. Хотя подсчитанная столь ничтожная доля воды в общей массе Земли (0.023%) [14] вполне могла бы быть ее собственной. Однако для нашей темы важен конечный результат: так или иначе, Земля получила ресурсы, необходимые для зарождения жизни.

В силу ряда причин (в том числе – столкновения с крупным небесным телом [16, 18], породившего Луну) Земля пережила период полного расплавления своей поверхности, превращения ее в “океан магмы” с температурой выше $2000^\circ C$. Атмосфера образовалась за счет выделения из этого океана газов (а при этой температуре газами становились многие твердые в привычных для нас условиях вещества, например, ZnS , $ZnCl_2$ и $FeCl_2$ с т. кип. ниже $1200^\circ C$). Неокисленные металлы (железо, никель и др.) как более тяжелые перемещались к центру, образовав ядро планеты. Одновременно всплывали легкие силикатные породы, содержащие алюминий, магний и двухвалентное железо, а также несовместимые с магмой KREEP-базальты (богатые K – калием, REE – редкоземельными элементами, P – фосфором) [2, 14, 16]. Они сформировали земную

кору, обладающую сильными восстановительными свойствами. Именно из таких пород, сохранившихся до сих пор на Луне благодаря отсутствию там воды и атмосферы, состоит ее поверхность, сформированная, как считают [16, 18], из выбитых с Земли материалов.

После остывания земной коры на ней из водяных паров конденсировалась вода вместе с растворенными в ней продуктами дегазации магмы и

атмосферных фотохимических процессов. Контакт жидкой воды с породами земной коры положил начало процессам эрозии. Наиболее важным в создании ресурсов для абиотических синтезов был процесс окисления минералов ортопироксена и оливина до трехвалентного состояния железа и одновременного восстановления воды до водорода ([16] и ссылки в ней).

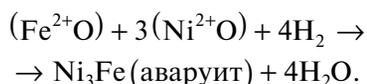


Водород восстанавливал растворенную в воде углекислоту до муравьиной кислоты, формальдегида, метанола и далее до метана. Водный раствор подщелачивался при этом до pH 9–11 [16]. Этот процесс называется *серпентинизацией* и рассматривается как один из важнейших поставщиков органических веществ.

В настоящее время такой процесс осуществляется только при излияниях вулканической лавы в воду и в местах разломов тектонических плит на океанском дне, например в регионе Lost City в Атлантическом океане. Там и до сих пор наблюдаются сильные потоки водорода, метана и других газов, что послужило основанием для гипотезы о возникновении жизни в таких гидротермальных источниках. Рассмотрение этой гипотезы не является целью данного обзора.

Ведь на молодой Земле серпентинизация происходила повсеместно, и все водоемы первоначально обладали щелочными свойствами. Растворение в них летучих окислов (углерода, серы, фосфора и др.) снижало значение pH до различных уровней, так что по этому показателю ассортимент водоемов был широким. Геохимики проводят аналогию между древними озерами и современной гидротермальной системой вулкана Kverkfjöll (Исландия), где расположено множество водоемов с различными величинами pH (2–7.5) и температуры (0–95°C) [19]. Так возникло большое разнообразие стартовых условий для начала абиотических синтезов на поверхности древней Земли.

Интересно, что процесс серпентинизации приводит также к образованию естественных сплавов железа и никеля, обладающих каталитическими свойствами [16]. Это доказано как обнаружением таких сплавов (*таенита, камацита и аваруита*) в местах, где происходит серпентинизация, так и в лабораторных имитациях этого процесса [20]:



Образовавшиеся железоникелевые сплавы катализируют восстановление водородом CO_2 , а другой продукт серпентинизации, *магнетит* (Fe_3O_4) – восстановление N_2 до NH_3 [16].

Процесс дегазации магмы продолжается до сих пор (по-видимому, с гораздо меньшей интенсивностью), проявляясь в вулканической деятельности. Сжатые огромным давлением горячие газы проникают через капиллярные поры и микротрещины в грунтовые воды. Накапливаясь там и нагревая их до кипения, они создают фумаролы и гейзеры, т.е. выбросы пара и жидкой воды вместе с растворенными веществами на земную поверхность, образуя неглубокие водоемы. П. Риммер и О. Шортл приводят химический состав этих газов [19]. Он включает как неорганические (SO_2 , H_2S , CO , HCN), так и органические вещества: метан, ацетилен, диацетилен, цианоацетилен, акрилонитрил, формальдегид и др.

Перечисленные вещества образуются в магме в результате сложных химических процессов с участием свободных радикалов, подробно описанных авторами [19]. Обращает на себя внимание высокое содержание органических веществ, ацетилена и диацетилена, суммарно превышающее даже содержание SO_2 или CO .

Авторы с сожалением отмечают, что в описанных ими процессах образуется мало цианомида, необходимого для синтеза нуклеиновых оснований. Его концентрацию в водоеме они оценивают ниже 10 мкМ, хотя рассчитанные ими концентрации других веществ довольно высоки, например, для цианоацетилена и HCN около 0.1 М, акрилонитрила и ацетилена – миллимолярные [19]. В опытах, имитирующих абиотические процессы, используются и значительно меньшие концентрации, например, 10^{-4} М [21] при синтезе пептидов и даже микромолярные при фосфорилировании альдозов амидотрифосфатом ([22] и ссылки в ней). Так что еще задолго до насыщения гидротермального источника извергаемые вещества мог-

ли сразу реагировать между собой и накапливаться в форме более устойчивых продуктов.

Например, HCN с солями железа образует гексацианоферраты, с серосодержащими газами роданиды, с формальдегидом гликолонитрил, а в присутствии NH_3 — предшественник глицина 2-аминоацетонитрил (по реакции Штрекера). При медленном гидролизе HCN образует еще более медленно гидролизуемый формамид (полупериод его гидролиза равен 199 лет при 25°C и pH 7 [23]). Цианоацетилен $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CN}$ наполовину гидролизуется через 10 дней при 30°C [23] до более стабильного к гидролизу цианоацетальдегида, который в результате реакции Штрекера превращается в предшественника аспарагиновой кислоты, ее нитрил. Ацетилен и диацетилен вступают во взаимодействие с водой, хотя и не так легко, как цианоацетилен. Ацетилен в присутствии ионов ртути превращается в предшественника жирных кислот — ацетальдегид (реакция Кучерова). Недавно были открыты более распространенные катализаторы этой реакции — соли цинка и меди [24].

Скорости реакций, конечно, были невелики, но они, как и концентрации веществ в водоеме, многократно возрастали при испарении воды. Скорее всего, полного высыхания не происходило, так как в водоеме всегда находилось небольшое количество формамида. Наверняка оставался хотя бы мультимикронный слой раствора реагентов в этом полярном высококипящем растворителе, и все реакции продолжались в нем.

Гидротермальные источники (фумаролы и гейзеры) выносят на поверхность, кроме газов, множество летучих веществ, захватываемых водяным паром или горячей водой, — оксиды, сульфиды и/или галогениды различных элементов (K, Na, Zn, Fe, Mn, B, P, Si и др.). А.Я. Мулкиджанян и др. [25, 26] установили минеральный состав конденсатов паров гидротермального поля на Камчатке. Важнейшие показатели: преобладание ионов калия над ионами натрия, высокое содержание Zn, Mn, P по сравнению с морской водой. Этот факт позволил авторам высказать идею, что в таких местах могли возникнуть первые клетки, минеральный состав которых наиболее похож на состав конденсатов паров фумарол и гейзеров.

Еще ранее автор гипотезы “цинкового мира” А.Я. Мулкиджанян [27] отмечал важную роль сульфида цинка для первоначальных абиотических синтезов. Этот минерал довольно распространен на Земле и обладает уникальными каталитическими способностями. При УФ-облучении в водной среде он восстанавливает CO_2 до муравьиной кислоты, азот — до аммиака. Он способен накапливать энергию УФ-лучей, а затем отдавать ее в темноте (фосфоресцировать). Кроме того, он, как и другие минералы-полупроводники, перехватывает энергию возбужденного состо-

яния, вызванного облучением, с молекул адсорбированных веществ за пикосекунды, в то время как фоторазрушение аденозинмонофосфата (АМФ) происходит лишь через 20 микросекунд. Таким образом, ZnS мог служить надежным убежищем от УФ-лучей для адсорбированных нуклеотидов и РНК (см. [27] и ссылки в ней).

Помимо описанных локальных источников материальных ресурсов наземные водоемы снабжались ими за счет глобальных процессов, происходящих в атмосфере. Атмосфера практически не содержала кислорода, а потому над Землей отсутствовал озоновый слой, задерживающий УФ-лучи. Поэтому в атмосфере и на поверхности Земли интенсивно происходили фотохимические реакции. Атмосфера состояла, в основном, из азота, водяного пара и углекислого газа с примесью выделяемых из недр CO , CH_4 , H_2S , COS , SO_2 и других газов. Энергия УФ-лучей, грозových разрядов и частых падений метеоритов порождала радикальные процессы, в результате которых образуются органические вещества (формальдегид и в меньшем количестве гликолевый альдегид) и продукты азотфиксации (HCN и окислы азота, преимущественно NO). Продуктивность этих процессов представлена в табл. 1.

Вместе с дождями органические соединения выпадали на поверхность и стекали в водоемы, в том числе те, о которых шла речь выше. Окислы азота восстанавливались соединениями двухвалентного железа до NH_3 , что, по мнению Д. Саммерса и С. Чанга [30], было главным источником аммиака. Поскольку авторы рассматривали именно процессы образования и накопления аммиака в океане, их вывод был довольно пессимистичен в плане обеспечения им всех необходимых абиотических синтезов: рассчитанная концентрация NH_3 оказалась слишком низкой. Но в малых водоемах, где эти процессы также происходили, ситуация была более благоприятной.

Н. Китадаи и С. Маруяма (см. [23] и ссылки в ней) высказали предположение, что азот дегазировался из магмы преимущественно в виде аммиака в первые полмиллиарда лет существования Земли. И его годовой поток в атмосферу Земли, согласно расчетам, составлял 10^{13} г азота. Аммиак в больших количествах мог образовываться также при фоторедукции нитрилов, о чем сказано ниже.

Источники фосфора были разнообразны и довольно обильны, но “проблема фосфора” заключается в плохой растворимости солей основной кислотной его формы — ортофосфата — со многими металлами. Фосфиты примерно в 1000 раз более растворимы и более реактивны [23]. Их главный источник — гидролиз фосфидов, вроде *шрайберзита* (Fe_3P). В присутствии аммиака при этом гидролизе образуются водорастворимые амиды и диамида фосфорной и фосфористой кислот [32].

Таблица 1. Потоки продуктов дегазации магмы и атмосферных фотохимических процессов*

Вещество	Глобальные потоки			Суточные потоки на 1 км ²		Ссылка
	кг/год	моль/год	см ⁻² с ⁻¹	г	моль	
HCHO	3×10^9	10¹¹	—	16.1	0.537	[28]
HCN	7.21×10^7	2.67×10^9	10⁷	0.39	0.014	[29]
NO	4.2×10^9	1.4 × 10¹¹	—	22.6	0.752	[30]
NH ₃ из NO	6.12×10^8	3.6 × 10¹⁰	—	3.3	0.193	[30]**
NH ₃ из магмы	10¹⁰	7.14×10^{11}	—	53.7	3.837	Рассчитано по [23]
SO ₂	$>1.71 \times 10^{10}$	$>2.67 \times 10^{11}$	(1–3) × 10⁹	>91.9	>1.435	[31]
H ₂ S	$>2.82 \times 10^9$	$>8.28 \times 10^{10}$	(3.1–77) × 10⁸	>15.1	>0.445	[31]

* Жирным шрифтом выделены данные авторов, остальные цифры рассчитаны нами по нижнему уровню.

** Рассчитано по данным авторов о конечной производительности суммы процессов, приводящих к преобразованию NO в аммиак. В океане, как считали авторы, за их счет создавалась очень низкая концентрация NH₃ (3.6–70 мкМ). Мы же относим эти данные к небольшим наземным водоемам, где происходили такие же процессы.

Авторы оценивают продукцию этих веществ в 10^{15} – 10^{19} моль за первый миллиард лет существования нашей планеты. Более точная оценка, к сожалению, невозможна из-за неполноты данных о содержании фосфидов на древней Земле.

Табл. 1 показывает, что только за счет фотохимических процессов в атмосфере за 100 тысяч лет (геологически небольшой срок) накопилось бы столько органических веществ, сколько содержит вся современная биосфера (6×10^{14} кг). Но абиотические синтезы биомолекул не ждали этого накопления, они начались еще с образования атмосферы.

Космос тоже обильно поставлял различные вещества в составе метеоритов, особенно во время “поздней тяжелой бомбардировки” (4 млрд лет назад или ранее). Общее количество органических веществ, полученных нашей планетой извне в тот период (за ~100 млн лет), составляет согласно расчетам 10^{16} – 10^{18} кг [33]. Это существенный вклад, несмотря на то, что большая часть космической органики нерастворима в воде и вряд ли участвовала в абиотических процессах. В метеоритах обнаружено более 170 различных органических веществ, в том числе все азотистые основания, необходимые для РНК и ДНК, 12 аминокислот, входящих в молекулы белков, и многие жирные кислоты [23]. Кроме того, некоторые исследователи [34] считают существенными каталитические активности метеоритов и выделяемую ими при падении энергию, инициирующую химические процессы в атмосфере.

Хотя дары Космоса могли в некоторых процессах облегчить формирование биоструктур, нельзя исключать, что такие же ресурсы существовали на молодой Земле. Например, важный источник фосфора шрайберзит, долго считавшийся исключительно “космическим пришельцем”, российские

и израильские геологи недавно обнаружили в древних рудных минералах, доказав его земное происхождение [35]. Следует также учесть, что, несмотря на разнообразие веществ, поставленных метеоритами, они не могли выстроить непрерывную слаженную цепь абиотических синтезов всех необходимых для жизни компонентов. Эту последовательность процессов обеспечили ресурсы нашей родной планеты.

“АБИОТИЧЕСКИЙ ПИТОМНИК”

Большая заслуга лаборатории Дж. Сазерленда (Великобритания) не только в том, что ее сотрудники нашли “обходной” путь синтеза пиримидиновых нуклеотидов и исследовали пути возможных абиотических синтезов аминокислот, углеводов, липидов и нуклеотидов. Они еще создали весьма удачную модель, имитирующую первичный “метаболизм”, обеспечивающий непрерывную поставку практически всех “строительных блоков” для синтеза будущих биологических структур. Эта модель представляет собой систему, в которой действует окислительно-восстановительный цикл на основе катализатора — металла с переменной валентностью (железа в составе комплексного иона, гексацианоферрата), восстановителя — сульфитных ионов (в более ранних работах H₂S) и источника энергии — УФ-излучения, инициирующего работу цикла [5].

Как уже говорилось выше, основными продуктами атмосферных фотохимических процессов являются формальдегид и HCN, реагирующие затем между собой с образованием гликолонитрила. Он и стал исходным веществом для последующих превращений, начинающихся с его фоторедукции до гликолевого альдегида с отщеплением аммиака.

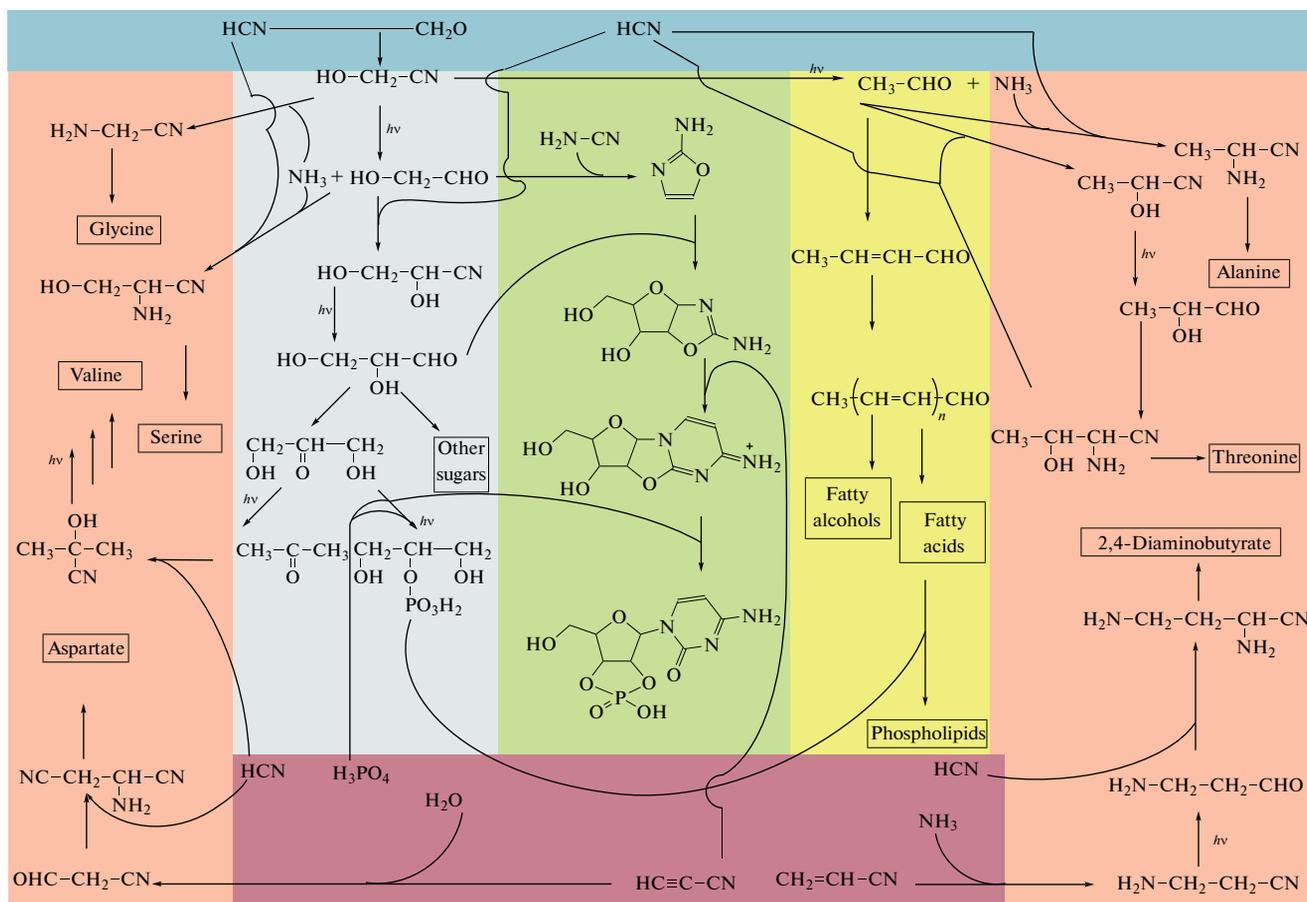
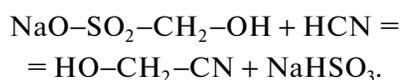


Рис. 1. Первоначальные абиотические синтезы. В розовом поле изображены синтезы аминокислот, в зеленом – нуклеотидов, в сером – углеводов, в желтом – липидов. Голубое поле показывает вещества, образующиеся в атмосфере, коричневое – вещества из недр Земли. Процессы фоторедукции отмечены значком *hν*.

Первоначально возникшее щелочное озеро при выпадении дождей и/или проникновении магматических газов насыщалось HCN, образующим с ионами Fe²⁺ комплексные ионы [Fe(CN)₆]⁴⁻. Одновременно происходило насыщение его сернистым газом и, возможно, фосфорной или фосфористой кислотой (за счет гидролиза шрайберзита и выброса вулканами триметафосфата), что приводило к снижению pH до нейтрального уровня и даже слабого подкисления. Формальдегид образовывал аддукт с бисульфитами в результате реакции [5]:



Этот аддукт вступает в реакцию с HCN так же легко, как и сам формальдегид:



Именно эту ситуацию имитировали в лаборатории Сазерленда [5, 6]. При pH 6.5 реакционную смесь (NaHSO₃, K₄[Fe(CN)₆], HO-CH₂-CN и

Na₂HPO₄) облучали ртутной лампой. Первыми продуктами фоторедукции стали гликолевый альдегид (за счет восстановления нитрильной группы до альдегидной) и аммиак, который тут же вступал с гликолонитрилом в реакцию Штрекера с образованием нитрила глицина. Гликолевый альдегид реагировал с HCN, превращаясь в глицеронитрил. Образуется также немного (от 4 до 8%) ацетальдегида (за счет восстановления не только нитрильной, но и гидроксильной группы гликолонитрила). Часть ацетальдегида тоже вступила в реакцию Штрекера, образовав нитрил аланина [5, 6]. А часть аммиака и HCN атаковала гликолевый альдегид, превратив его в нитрил серина. Так начал функционировать абиотический питомник, изображенный на рис. 1.

С новыми порциями формальдегида и HCN описанный процесс возобновлялся. Но так как уже возникли первые продукты фоторедукции, они тоже становились исходными веществами для дальнейших реакций, показанных на рис. 1.

Следует обратить внимание, что с каждым циклом количество альдегидных групп и выделившие-

гося аммиака постоянно растет. Альдегиды не убывают в реакциях с HCN: превратившись в гидроксинитрилы, они тут же регенерируются после фоторедукции. Предел этого нарастания определяется количеством HCN, поступающим из недр и атмосферы, точнее — той частью HCN, которая расходуется на реакцию с альдегидами. Ведь часть этого вещества расходуется на образование роданидов и гексацианоферратов. Зато альдегиды могут возникать при гидратации ацетиленов и фоторедукции других нитрилов (цианоацетилен и акрилонитрил). Так что указанные на рис. 1 процессы лимитирует лишь HCN.

Что касается аммиака, то его количество может нарастать постоянно. Все аминонитрилы, предшественники аминокислот, хоть и медленно (в течение нескольких лет) гидролизуются до аминокислот, высвобождая NH_3 . Этот гидролиз может сильно ускорить каталитическое действие формальдегида [36], а также реакции аминонитрилов с тиолами [21, 37] и реакция Бюхерера-Бергса, о которой будет сказано далее. А вот фоторедукционный процесс, описанный здесь, α -аминонитрилы не восстанавливает в отличие от β -аминонитрилов [38] и α -гидроксинитрилов [5]. Кстати, способность нитрильных групп β -аминонитрилов подвергаться фоторедукции открывает короткий путь к абиотическому синтезу диаминокислот. Так, из акрилонитрила может образоваться 2,4-диаминомасляная кислота (см. рис. 1). Она могла быть предшественницей других, более сложных положительно заряженных аминокислот в первичном генетическом коде.

При фоторедукции рН реакционной смеси повышается за счет высвобождения аммиака, который, хоть и расходуется на другие продукты, но образует аминонитрилы, обладающие тоже основными свойствами. Впрочем, это повышение временное, так как происходит постоянный приток кислотных газов, и рН в абиотическом питомнике постоянно колеблется между почти нейтральным и слабощелочным (по-видимому, до значений 9–10). В периоды подщелачивания создаются благоприятные условия для гомоальдолизации ацетальдегида [7]. Основным ее продуктом является кротоновый альдегид. В постепенно убывающих концентрациях образуются гексадиеналь, октатриеналь и еще более длинные ненасыщенные альдегиды [7]. При восстановлении их (никелевым катализатором, в качестве которого мог бы выступить упомянутый выше аваруит) образуется смесь насыщенных жирных спиртов, альдегидов и кислот [7].

Продукт фоторедукции глицеронитрила глицеральдегид изомеризуется в более устойчивую форму трехуглеродного сахара — дигидроксиацетон. Его фоторедукция приводит к двум продуктам — ацетону и глицерину [38]. Ацетон вовлека-

ется в абиотический синтез аминокислот (давая валин), глицерин — в синтез липидов [38]. Глицерин в растворе фосфатов и мочевины превращается в 1,2-циклофосфат, гидролиз которого дает смесь глицерин-1-фосфата и глицерин-2-фосфата. Эти же эфиры могли синтезироваться и другими путями — при взаимодействии глицерина со шрайберзитом [39] или в формамидном растворе [40] (после испарения воды). Реакция фосфатных эфиров глицерина с жирными кислотами приводит к образованию фосфолипидов (см. [7] и ссылки в ней).

Хотя процессы абиотических синтезов всех нуклеиновых оснований и рибозы в достаточной степени изучены, они мало пригодны для возникновения РНК из-за проблем в их связывании между собой (см. обзоры [12, 23]). Дж. Сазерленд и его коллеги решили эти проблемы, открыв “обходной” путь синтеза нуклеотидов [41]. Ключевое звено в цепи этих процессов — реакция гликолевого альдегида с цианамидом. Она образует 2-аминооксазол, который при реакции с глицеральдегидом дает арабино-аминооксазолин — продукт, состоящий из арабинозного пятичленного кольца, сопряженного с другим кольцом, предшественником цитозина (см. рис. 1, зеленое поле). Если гликолевый альдегид находится в избытке (что вполне возможно из-за ограниченности количества цианамидов), он реагирует с 2-аминооксазолом (вместо глицеринового альдегида), давая начало синтезу тетрозонуклеотидов [42], возможных предшественников трео-НК (ТНК).

Реакция с цианоацетиленом завершает построение цитозинового кольца. Гидролиз образовавшегося продукта в присутствии фосфатов и мочевины приводит к преобразованию арабинозного кольца в рибозное, благодаря замыканию другого пятичленного цикла (рис. 1, зеленое поле). Продукт — 2',3'-циклофосфат цитидина — является активированной формой натурального нуклеотида. УФ-облучение частично переводит его в 2',3'-циклофосфат уридина. Таким образом, была решена проблема возможности присоединения рибозы к пиримидинам и проблема его региоспецифичности.

Однако эта изящная схема столкнулась с рядом серьезных трудностей:

- 1) недостаточность ресурсов цианамидов на ранней Земле,
- 2) необходимость определенного порядка реакций, не допускающего взаимодействия цианамидов и глицеринового альдегида с образованием побочных продуктов,
- 3) невозможность получения этим же путем пуриновых нуклеотидов.

Дальнейшие усилия были направлены на поиск путей преодоления этих трудностей.

Одной из таких попыток была концепция “химии потоков”. Согласно ей многие важные этапы добиологической химии могли осуществляться не в стационарных водоемах вроде упомянутого питомника, а в местах встречи потоков различного химического состава [5]. При этом большое значение приобретает порядок, в котором встречаются разные потоки, если их несколько. Это — уязвимое место концепции, так как здесь просматривается аналогия с экспериментами, имитирующими отдельные этапы абиотических процессов в строго определенном порядке. Однако при небольшом числе потоков вероятность “нужного” порядка слияния потоков еще достаточно высока. Поскольку гидротермальных регионов множество, то в каких-нибудь из них могла сложиться благоприятная ситуация.

Авторы попытались преодолеть первую и вторую трудность чисто гипотетически. Экспериментально был установлен только факт, что 2-аминоиазол способен избирательно осаждать в разное время гликолевый и глицериновый альдегиды в виде аминалей [43]. Текущий из питомника поток (с 2-аминоиазолом) через несколько часов оставляет после себя сначала участок русла с осадком аминаля гликолевого альдегида, а ниже по течению — осадок аминаля глицеральдегида.

Цианамид действительно мог возникнуть в больших количествах в местах образования гексаацианоферратов, где преобладающие минералы содержат кальций. Гексаацианоферраты кальция при температурах 700–1000°C разлагаются с образованием кальцийцианамидов.

Дальнейшие рассуждения на основе “химии потоков” содержат слишком много допущений. Предполагается, что осажденный в каком-то месте гликолевый альдегид должен прибыть с другим потоком на место залегания кальцийцианамидов, причем в виде аддукта с бисульфитом. Количество бисульфита не должно быть выше эквивалентного количества CaCN_2 , иначе лишний бисульфит войдет в цикл образующегося 2-аминооксазола и помешает его дальнейшим превращениям. Если это условие выполнено, нерастворимый сульфит кальция освободит цианамид, который прореагирует с гликолевым альдегидом. Затем поток должен встретить осадок глицеральдегида. И так далее по рис. 1. Беда только в том, что для синтеза осадителя нужен цианамид, которого не должно быть в первом потоке.

Третью трудность (а, возможно, и все остальные) М. Поунер и сотрудники [44] пытались преодолеть, используя вместо дефицитного цианамидов тиоциановую кислоту. Роданиды накопились в питомнике, стоит только довести pH до 4, и начнется их реакция с гликолевым альдегидом, образуя оксазол-2-тион (авторы называют его 2-тиооксазолом). Он так же легко соединяется с

глицеральдегидом, как и его 2-аминоаналог. Вряд ли необходим поток из нейтрального питомника в водоем с низким значением pH. Ведь возможны периодические интенсификации выбросов вулканических кислотных газов, подкисляющих водоем до pH 4. Тем более что для сдвига pH от 7 до 4 требуется всего 10^{-4} М концентрация кислоты.

Дальнейшие превращения несколько отличаются от вышеописанных, но суть их та же — формирование нуклеинового основания, в данном случае пуринового (в две стадии: сначала пятичленного, затем шестичленного цикла). На этом пути есть развилка, благодаря которой часть продукта сворачивает на путь синтеза пиримидиновых нуклеозидов. Конечный этап обоих путей идентичен — гидролиз в присутствии фосфатов и мочевины с образованием 2',3'-циклофосфатов нуклеозидов. К сожалению, образуются не канонические пуриновые нуклеотиды, а их 8-оксопроизводные. Но в литературе такие производные часто упоминались как вполне приемлемые заменители канонических, пока Дж. Шостак [45] не доказал их непригодность для участия в неферментативной репликации РНК. Кроме того, среди продуктов имеются нуклеотиды арабинозного, ксилозного и ликсозного ряда, хотя рибозные и арабинозные нуклеотиды преобладают.

Другой путь конструирования пуриновых нуклеозидов (FaPu-путь) предложила группа, руководимая Т. Кереллом [46]. На основании литературных данных они решили, что три- и тетрааминопиримидины могли быть синтезированы в абиотических условиях. Авторы теоретически обосновали и экспериментально подтвердили, что в определенных условиях лишь аминокетон в позиции 5 этих пиримидинов может быть ацилирован муравьиной кислотой. Полученные формиламидопиримидины при рибозилировании любой аминогруппы, соседней с формилированной аминогруппой, могли дать один и тот же продукт (из-за симметричности молекулы). Так была решена проблема региоспецифичности рибозилирования. Последующее замыкание имидазольного цикла произвело пуриновые нуклеозиды. Однако образовалась смесь различных стереоизомеров. Пиранозная форма рибозы преобладала над канонической фуранозной. И хотя β -аномеры возникали чаще, чем α -аномеры, выход канонического аденозина никогда не превышал 20%. Зато этот путь привел к каноническим пуриновым нуклеозидам.

В следующей статье [47] авторы развили свою гипотезу на основе концепции “химии потоков” в сочетании с циклами увлажнения/высушивания. Они изобразили 4 потока, сливающиеся в определенном порядке и затем впадающие в озеро. В результате последовательного взаимодействия всех компонентов образуются пуриновые

нуклеозиды. Циклы увлажнения/высушивания обеспечивают также разделение и очистку продуктов.

Все-таки М. Поунеру позже удалось найти путь синтеза канонических пуриновых оснований в составе нуклеозидов [48] благодаря включению в реакционную смесь сероводорода, который, несомненно, присутствовал в предбиотических водоемах. Вместо 8-оксопуриновых нуклеозидов он получил 8-меркаптопуриновые, преимущественно арабинозные нуклеозиды. УФ-облучение удаляло серу, образуя канонические гетероциклы. Так работы [44] и [48] решили проблему абиотического синтеза без потребности в дефицитном цианамиде полного набора нуклеозидов. Но – арабинозного ряда. Вопрос, как возникли канонические пуриновые рибонуклеотиды, остается пока открытым.

М. Поунер, тем не менее, считает результаты своих экспериментов большим успехом, поскольку арабино-НК (АНК) считается одной из возможных предбиотических информационных полимеров. Авторы отмечают ее большую, чем у РНК, устойчивость к гидролизу [49], способность образовывать подобные рибозимам структуры [50] и дуплексы с РНК [49, 51], транскрибироваться с ДНК-матриц [52], служить матрицей для обратной транскрипции ДНК [52].

Ксенонуклеиновые кислоты, у которых и гетероциклические основания, и соединяющие их “мостики” отличаются от природных, исследуются давно. Интерес к ним обусловлен трудностями, обнаруженными при попытках лабораторного осуществления абиотического синтеза и самокопирования цепочек РНК. Целью является поиск более легкого (а, значит, более правдоподобного) сценария спонтанного возникновения самокопирующегося полимера. И такие полимеры вполне могли образоваться: ведь в опытах, наряду с производными рибозы, получают производные других пентоз и даже тетроз [42], которые тоже могут превратиться в соответствующие нуклеотиды. Как будет рассмотрено далее, из смеси нуклеотидов различных углеводных рядов сначала синтезируются гетерогенные по сахару олигомеры, а затем, после серии репликаций, формируются гомогенные – например, рибозные. Следовательно, различные олигомеры сосуществовали, эволюционировали, взаимодействовали и конкурировали между собой. А Природа отобрала наиболее эффективные.

ВОЗНИКНОВЕНИЕ БИОПОЛИМЕРОВ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СТРУКТУР

Биополимеры – это продукты конденсации более простых веществ с отщеплением молекул воды. В водной среде их образование и существо-

вание термодинамически и кинетически невыгодно и при установлении равновесия неминуемо приведет к их гидролизу на составные части. Абиотический синтез их возможен либо при нагревании в (почти) безводной среде, например, в периоды высыхания водоемов, особенно в окружении гидрофобных молекул (например, липидов), либо при химической активации их составляющих частей конденсирующими агентами при затрате энергии. Первый вариант предпочтительнее как более естественный. Однако экспериментально установлено, что скорость (а, значит, и наблюдаемая в опыте степень) олигомеризации невысока, если мономеры выступают в обычной, неактивированной форме. Это обстоятельство затрудняет исследование дальнейших процессов усложнения олигомеров, формирования ими функциональных структур, взаимодействия с другими биомолекулами. Экспериментаторы ведь не могут ждать многие годы результатов опыта с натуральными формами реагентов. Поэтому они используют мономеры в активированной форме, не всегда такой, которая могла существовать на ранней Земле. Однако одновременно продолжают исследования первого варианта, о чем будет сказано позже.

Первоначально в опытах по абиотическому синтезу РНК пытались использовать АТР и другие нуклеозидтрифосфаты, естественные активированные нуклеотиды. Однако в отсутствие белковых ферментов или рибозимов они довольно инертны (см., например, [53]).

Для неферментативного синтеза олигонуклеотидов часто используют нуклеотиды, к фосфатной группе которых присоединена более легко отщепляемая группа. Наиболее активными в этом отношении считаются 2-аминоимидазолиды нуклеотидов [54]. Как показали А. Фаренбах и др. [55], 2-аминоимидазол образуется в системе Дж. Сазерленда одновременно с 2-аминооксазолом при реакции цианамиды с гликолевым альдегидом в присутствии аммиака с хорошим выходом (41%). Поэтому его можно считать предбиотическим агентом. Но самостоятельно присоединиться к нуклеотиду он не может. Этому мог способствовать конденсирующий агент, образующийся в гексацианоферратном цикле при действии УФ-лучей – метилизоцианат [56]. Или, как считает А. Фаренбах, хлорциан – тоже возможный продукт УФ-облучения ионов цианида и хлора в водной или газовой среде [57].

Имидазол и его производные применялись Л. Оргелом в синтезе олигонуклеотидов еще с 60-х годов. Удалось даже осуществить неферментативный матричный синтез, получив 14-звенный олигонуклеотид [58]. Опыты проводили с естественными нуклеотидами, то есть имеющими D-конфигурацию. И, разумеется, с однородными, например, только с рибонуклеотидами.

Но на древней Земле в абиотических синтезах образовывалась сложная смесь нуклеотидов. Они могли содержать разные гетероциклы, не только аденин, гуанин, цитозин и урацил. Соединяющие их мостики тоже могли иметь различную природу. Если в их состав входили углеводы, то они имели бы и *L*-, и *D*-конфигурацию. Мы не можем здесь обсуждать все возможные варианты, остановимся лишь на упомянутых выше.

Четыре перечисленных гетероцикла наиболее устойчивы к действию УФ-лучей, поэтому преобладали в абиотических условиях. Кроме того, в опытах Дж. Сазерленда они образуются из простых исходных веществ и не в качестве целевых продуктов, а сразу в составе сложной молекулы, объединяющей углеводную и гетероциклическую часть. А вот углеводная составляющая может быть представлена шестью видами моносахаридов. Преобладающими углеводами, как сказано выше, являются три: арабиноза, рибоза и треоза. Все они выступают в фуранозной форме (согласно пути Поунера-Сазерленда). Если же абиотический синтез нуклеотидов происходил путем, описанным Т. Кереллом, то преобладать должна пиранозная форма.

Прежде всего, рассмотрим проблему рацематов. Ведь только однородные по пространственной конфигурации мономеры могут сформировать полимер правильной спиральной формы. Молекулы РНК, синтезированные из рацемических смесей нуклеотидов, даже имеющие одинаковую их последовательность, совершенно не похожи друг на друга. Их пространственная конфигурация различна из-за хаотичности конфигурации отдельных звеньев. Они не смогут образовать ни правильной спирали, ни структур с какой-либо функциональной активностью. Видимо, и жизнь вряд ли бы возникла, если бы не нашлись естественные факторы, обеспечивающие хиральную чистоту полинуклеотидных цепей.

Оказалось, что в этом могли помочь минералы, в частности, *монтмориллонит* (глина, продукт водной эрозии вулканического пепла). Дж. Феррис и П. Джоши в серии работ [59–61] показали, что в его присутствии из смеси *L*- и *D*-нуклеозид-фосфоимидазидов образуются практически полностью гомохиральные олигонуклеотиды длиной до 11 звеньев. Причем с увеличением длины олигомера возрастает степень его хиральной чистоты. Уже начиная с пентамеров, хиральная чистота продуктов превышает 97%. Таким образом, получаются и чистые *L*-, и чистые *D*-олигонуклеотиды. Причина такого селективного действия монтмориллонита пока не выяснена, считается, что она обусловлена особенностями кристаллической структуры этого минерала. Не исследована и селективная способность монтмориллонита в отношении нуклеотидов, активированных

другим способом, а также содержащих разные сахара в их пиранозной или фуранозной формах. А такие исследования в свете вышесказанного очень актуальны.

Важным селективирующим фактором могли быть УФ-лучи. М.А. Никитин в своей книге [4] отмечает, что они могли способствовать отбору, в-первых, самых устойчивых к ним азотистых гетероциклов, склонных образовывать комплементарные пары, т.е. Ade, Gua, Cyt и Ura. Во-вторых, они благоприятствовали накоплению олигонуклеотидов, состоящих из нуклеотидов одной хиральности. Гомохиральные олигонуклеотиды к УФ-лучам более устойчивы, так как расположенные гетероциклы в их спиральных молекулах “стопкой” обеспечивают их взаимную защиту за счет стэкинг-взаимодействия. Длинные олигомеры также более устойчивы по сравнению с короткими, поскольку в них больше взаимодействующих гетероциклов. А молекулы РНК, содержащие двуспиральные участки (шпильки), более устойчивы благодаря комплементарному спариванию.

По указанным причинам популяция олигонуклеотидов, в основном, состояла из смеси гомохиральных *L*- или *D*-форм. От случайно образовавшихся гетерохиральных цепочек ее очищали УФ-лучи. Олигонуклеотиды различной хиральности неизбежно должны были длительное время сосуществовать. Предпринимаются попытки теоретически обосновать и экспериментально продемонстрировать возможность абиотического формирования хирально однородных биополимеров путем постепенного накопления небольших избытков одних энантиомеров над противоположными в последовательной серии репликаций. Однако, на наш взгляд, на фоне постоянного текущего абиотического синтеза рацематов такой подход не решает проблему хиральной чистоты.

Не паллиативное, а кардинальное решение этой проблемы (и не только!) произвела Природа, когда среди хирально чистых *D*-рибозимов появился такой, который оказался способным избирательно распознавать молекулы *D*-рибозы (именно фуранозной формы!) или ее фосфорилированных производных и присоединять их к основаниям РНК. Это обеспечило интенсивный синтез *D*-рибонуклеотидов и столь же быстрое накопление полимерных *D*-РНК. Не создавшие подобного рибозима *L*-нуклеотиды синтезировались в абиогенных процессах гораздо медленнее и были постепенно вытеснены, как и *все ксенонуклеотиды* и их полимеры.

Такой *D*-рибозоспецифичный рибозим экспериментально не получен, но вполне возможен, так как описаны рибозимы, распознающие энантиомерные формы аминокислот и присоединяю-

шие предпочтительно *L*-аминокислоты к тРНК (см. [62] и ссылки в ней).

На основании своих работ по аминокислотированию молекул тРНК К. Тамура высказал предположение, что сразу после сформирования мира РНК, основанного на *D*-рибозе, могла произойти селекция *L*-аминокислот посредством аминокислотирования тРНК [63]. В его экспериментах *D*-аминокислоты присоединялись к молекулам тРНК *D*-рибозимами в 4 раза медленнее, чем *L*-аминокислоты. Как выяснилось путем стереометрических измерений [64], затруднения были вызваны пространственной ориентацией *D*-аминокислот в активном центре рибозима. Таким образом, аминокислотирование *D*-рибозимы в процессе формирования генетического кода решило проблему гомохиральности белковых молекул.

Проблема неоднородности мономеров нуклеиновых кислот решена недавними экспериментами Дж. Шостака [10] и Р. Кришнамурти [11, 12]. Дж. Шостак установил, что при неферментативном синтезе олигонуклеотидов на матрицах, составленных из смеси арабино-, рибо- и дезоксирибонуклеотидов, скорость присоединения рибонуклеотидов к праймерам выше, чем их дезокси- и арабино-аналогов. Причем, последние уступают рибонуклеотидам в 15–30 раз. Кроме того, после их присоединения дальнейшее расширение праймера замедляется примерно в 300 раз. Причину авторы видят в особенностях пространственной структуры углеводной части нуклеотидов. Следствием этого является постепенное обогащение синтезируемого полимера рибонуклеотидами в серии репликаций и образования в конечном итоге гомогенной молекулы РНК. А гомогенные РНК-матрицы при копировании тем более производят гомогенное “потомство”.

С. Бхоумик и Р. Кришнамурти [11] обнаружили, что гетерогенные олигонуклеотиды, составленные из смеси треонуклеотидов и рибонуклеотидов, предпочтительно образуют дуплексы с гомогенными комплементарными цепочками РНК, тРНК или ДНК. Следовательно, они могут служить матрицами для неферментативного лигирования гомогенных нуклеотидных последовательностей, что после нескольких репликаций приведет к образованию полностью гомогенных молекул РНК, тРНК или ДНК. Таким образом, оба неферментативных процесса репродукции нуклеотидных последовательностей способны создать гомогенные цепочки РНК и ДНК из гетерогенной смеси нуклеотидов. Поскольку гомогенные цепочки тРНК тоже образуются в эксперименте, этот вывод, вероятно, справедлив и для ксено-НК.

При всех достоинствах имидазола и его производных, они сами нуждаются в активации для присоединения к фосфатным группам нуклеотидов. Этого недостатка лишены амиды фосфорной кис-

лоты: они легко получаются реакцией NH_3 с циклическим триметафосфатом (вулканическим продуктом), со шрайберзитом или с фосфитами [32, 65]. Как установлено в работах Р. Кришнамурти [22, 32, 65], моно- и диамид фосфорной кислоты в нейтральных разбавленных водных растворах (даже в микромолярных концентрациях) активно фосфорилируют альдолы, нуклеозиды, нуклеотиды и нуклеозиддифосфаты. Получены также короткие олигомеры [65]. Наиболее вероятно, что именно они были конденсирующими агентами в абиотических синтезах олигонуклеотидов и пептидов [65].

Среди коротких гомохиральных олигонуклеотидов часто могли возникать такие пары, у которых несколько звеньев на 3'-концах комплементарны. Тогда они, спарившись этими концами, окажутся друг для друга взаимными праймерами. Такой комплекс вполне может быть неферментативно достроен в обе стороны до полной двойной спирали уже большей длины при наличии активированных нуклеотидов.

Несмотря на скромные размеры молекул абиотически возникающих гомохиральных олигонуклеотидов, они могут представлять собой функциональные структуры. Например, рибозим, состоящий всего из 5 звеньев, получен в лаборатории М. Яруса [66]. Он оказался способным катализировать присоединение активированной аминокислоты (аминоациладенилата) к рибозе другого короткого олигонуклеотида сложноэфирной связью. Более того, он еще и катализировал образование пептидной связи между этой аминокислотой и другой активированной аминокислотой, выполняя функцию рибосомы. В экспериментах обнаружено образование пентапептидов с участием этого самого маленького из известных рибозимов [67]. Благодаря небольшой длине этого рибозима вероятность его абиотического синтеза очень велика: возможных комбинаций последовательности нуклеотидов всего 5120. По подсчетам М. Яруса масса такого количества пентануклеотидов равна 4.6×10^{-17} г — ничтожное количество в сравнении с тем, которое может быть накоплено в относительно небольшие сроки в водоемах вокруг даже одного из наземных термальных источников. Так что этот рибозим мог быть распространен на ранней Земле повсеместно.

Выявлены небольшие рибозимы и с другой функцией — лигазной, т.е. со способностью “сшивать” довольно короткие олигонуклеотиды, подобные тем, что получаются синтезом на монтмориллоните или путем неферментативной достройки взаимных праймеров. В любой популяции РНК такие рибозимы спонтанно могли появиться, поскольку часто бывают очень короткими (порядка 20–30 нт), для лигазной активности достаточно даже 7 звеньев [68].

Появление длинных цепей РНК привело к образованию рибозимов с разнообразными функциями. Первостепенное значение имели бы рибозимы, обеспечивающие создание точных копий молекул РНК. Селекцией *in vitro* в лаборатории Ф. Холлиджера создан рибозим-полимераза РНК, лучший на данный момент с точки зрения точности копирования. Он способен удлинять короткую РНК-затравку на 95 звеньев за сутки [69]. С его помощью размножили настоящую функциональную молекулу РНК – другой рибозим, известный под названием *Mini-hammerhead*. Этот рибозим состоит всего из 24 нт, но обладает эндонуклеазной активностью: он умеет разрезать РНК в одном строго определенном месте. Рибозим *tC19Z* скопировал рибозим *Mini-hammerhead*, сохранив его ферментативную активность. Тем самым впервые была продемонстрирована репликация функциональной молекулы РНК при помощи рибозима-полимераза. Другой рибозим Ф. Холлиджера (*tC9Y*) смог скопировать за 60 часов при 17°C цепочку РНК длиной в 206 нт, т.е. длиннее себя [70].

Рибозим-полимеразу с более широким диапазоном действия и большей скоростью копирования удалось получить Дж. Джойсу [71]. С помощью рибозима 24-3 были амплифицированы два РНК-аптамера, РНК-лигаза и даже дрожжевая фенилаланиновая тРНК. Рибозим преодолел все шпильки и петли этих матриц, хотя они обычно являются серьезным барьером для полимераз. Кроме того, этот рибозим оказался активной обратной транскриптазой, присоединяя к праймеру любой из 4 дезоксирибонуклеотидов примерно за 1 мин и доводя длину цепочки ДНК до 32 нт [72].

Недавно Ф. Холиджеру удалось осуществить с помощью рибозима репликацию его каталитически активной молекулы [8]. Правда, не в целом виде, а по частям.

Рибозим получен методом искусственной эволюции. Он состоит из двух субъединиц, одна из которых каталитически неактивна, но как-то помогает другой субъединице. Каталитически активную субъединицу рибозима разделили на 5 фрагментов. В качестве строительного материала использовали не мономеры, а все 64 возможных триплета. Ранее было установлено, что они успешно расплетают двуспиральные участки молекулы рибозима, образуя с ними комплементарные пары. Рибозим действовал как лигаза, сшивая триплеты, причем в обоих направлениях, 5'–3' и 3'–5', и не нуждался в праймерах.

После синтеза всех пяти фрагментов рибозим смог связать их в две молекулы, объединив соседние фрагменты. Для этого пришлось в среду добавить короткие олигонуклеотиды, комплементарные пограничным последовательностям объединяемых фрагментов (они могли спонтанно воз-

никать в предбиологических условиях как обрывки больших молекул при гидролизе). Интересно, что полученные таким путем продукты спонтанно образовали агрегат за счет нековалентных связей. И этот агрегат, будучи соединенным с неактивной субъединицей рибозима, воспроизвел комплементарную последовательность одного из первоначальных фрагментов. К сожалению, это еще не строгое доказательство саморепликации РНК в абиотических условиях, но вселяет надежды, что она возможна.

Идея раскручивания матричной РНК с помощью коротких олигонуклеотидов успешно использована лабораторией другого лауреата Нобелевской премии – Дж. Шостака [73]. Он продолжает начатые Л. Оргелом [58] исследования неферментативного копирования молекул РНК. Одно из главных затруднений на этом пути – быстрое восстановление дуплекса РНК после теплового разъединения цепочек. Но добавление в реакционную смесь гекса- или октамеров нуклеотидов, захватывающих одну из цепочек с образованием с ней комплементарных комплексов, открывает вторую цепочку для матричного неферментативного синтеза олигонуклеотидов. Авторы подчеркивают, что такие “захватчики” вполне могли быть в изобилии в “мире РНК”. Они могли быть либо продуктами гидролиза длинных РНК, либо недостроенными копиями при их синтезе. В любом случае они оказывались комплементарными какому-либо участку молекул РНК, “проживающих” в данном микроокружении.

При попытках воспроизведения абиотического синтеза другого жизненно важного полимера (белка) возникают те же проблемы, что и при синтезе олигонуклеотидов. Нагревание аминокислот в безводной среде тоже приводит к образованию лишь коротких цепочек, хиральная чистота не обеспечивается, минералы оказывают каталитическое действие, но для получения длинных полипептидов необходимо использовать активированные формы аминокислот.

Одной из них являются *N*-карбоксаминокислоты, циклические смешанные ангидриды аминокислот и угольной кислоты. Дж. Феррис и Л. Оргел [74] из них получили 55-мерные пептиды при адсорбции на поверхности минералов *гидроксипатита* и *иллита*, служивших катализаторами. *N*-Карбоксаминокислоты образуются, например, реакцией аминокислот с одним из вулканических газов – сернистым карбонилем (COS) [75].

Другой путь их абиотического синтеза, длительно и тщательно изучавшийся французскими химиками из университета Монпелье, – через реакцию Бюхерера-Бергса. Как указывалось выше, первым этапом абиотического синтеза аминокислот является образование аминитрилов. Они

поглощают CO_2 из насыщенных им водных растворов и через ряд внутримолекулярных реакций превращаются в *N*-карбамоиламинокислоты [36]. Продукты этого процесса отщепляют аммиак и циклизуются, хотя и довольно медленно (в течение месяца при 80°C) [76]. Это приводит к *N*-карбоксияминокислотам.

Пептиды образуются также при взаимодействии аминокислот с циклическим триметафосфатом [77], а еще лучше с продуктом его аммонолиза — диамидом фосфорной кислоты [32, 65]. Однако наиболее вероятным путем их абиотического синтеза представляется следующий.

Как сказано выше, при недостатке аммиака реакция альдегидов с HCN приводит к образованию α -гидрокси- и α -аминокислот. В опытах Р. Кришнамурти [78–80] показано, что в эквимольной смеси глицина и молочной кислоты при нагревании до 65°C и выше образуются олигомеры до 10 звеньев, содержащие остатки как молочной кислоты, так и глицина. Причем в растворах одного лишь глицина олигомеров не наблюдается. Если подвергать эту смесь циклам увлажнения/высушивания, то процент включения глицина в олигомеры увеличивается с каждым циклом. То же происходит и при замене глицина на аланин или на смесь этих аминокислот. Замена молочной кислоты на гликолевую улучшает условия образования сополимеров, называемых депсипептидами.

Сложные эфиры образуются и гидролизуются легче, чем пептиды. Видимо, этим объясняется и вовлечение гидроксикислотами аминокислот в реакцию сополимеризации, и последующее увеличение доли аминокислот в сополимере. После нескольких циклов увлажнения/высушивания аминокислоты в сополимерах уже образуют непрерывные последовательности. В конечном итоге вся цепочка становится аминокислотной.

Совершенствование структуры биополимеров для лучшего выполнения ими жизненно важных функций немыслимо без эволюции, подобной Дарвинской (хотя биополимеры — это еще не живые существа). Ведь если структура способна самокопироваться с неизбежными при этом ошибками (“мутациями”), то она обязательно создаст популяцию дочерних структур, из которых “выживут” и продолжат свой “род” при ограниченности ресурсов лишь наиболее успешные. А этот процесс обладает всеми чертами Дарвинской эволюции.

Пока речь шла об отдельных молекулах биополимеров, для их эволюции достаточно было той степени компартиментализации, которую представляли поры минералов. В них и протекала эволюция предбиотических сообществ полимерных молекул, названных Е.В. Куниным “реплициру-

ющимися ансамблями эгоистичных кооператоров” [3].

Каждый ансамбль постепенно усложнялся благодаря тому, что отдельные его компоненты приобретали различные функции, полезные для выживания и более быстрого роста и развития всего ансамбля. Помимо первичной специализации лигаз и полимераз, необходимой для самовоспроизведения ансамблей молекул РНК, возникали рибозимы, например, ускоряющие фосфорилирование нуклеозидов(тидов) до нуклеозидтрифосфатов любым агентом, даже диамидом фосфорной кислоты. Ведь, несмотря на его высокую активность, скорость катализируемого фосфорилирования значительно выше.

Такой ансамбль более интенсивно потреблял мономеры из окружающего водоема, отбирая их у ансамблей соседних пор, и обгонял последних в росте. В другом ансамбле мог образоваться рибозим, катализирующий какую-либо реакцию абиотического синтеза нуклеотидов. Он тоже получал преимущество и разрастался быстрее. Погодные условия (затопление, перемешивание воды сильным ветром и т.п.) могли способствовать обмену частью рибозимов между ансамблями (нечто подобное горизонтальному переносу генов). Так мог возникнуть новый ансамбль, обладающий обоими полезными свойствами.

По мере усложнения ансамблей для сохранения всех полезных компонентов возникла необходимость более надежного их обособления. Это особенно стало важным в период формирования генетического кода. В водной среде компартиментализация возможна благодаря водонепроницаемой оболочке. Такую оболочку на заре жизни могли создать, как считают, молекулы жирных кислот. Обладая полярной группой $-\text{COOH}$ и неполярным углеводородным “хвостом”, они формируют мицеллы или пузырьки, состоящие из двух слоев. Обращенная к воде сторона каждого слоя образована полярными группами, внутренняя — неполярными нитями, которые удерживаются рядом ван-дер-ваальсовыми силами. Из таких пузырьков, помещая в них полимерные молекулы, формируют искусственные протоклетки. Мономеры и другие небольшие молекулы могут поступать внутрь пузырька и служить “строительным материалом” для копирования полимеров.

К. Адамала и Дж. Шостак [81] доказали, что внутри таких протоклеток происходит неферментативный матричный синтез олигонуклеотидов из рибонуклеотидов, активированных имидазолом. Они легко проникали через двухслойную мембрану (в отличие от АТФ и других нуклеозидтрифосфатов). К цепочкам матрицы были прикреплены небольшие комплементарные участки олигонуклеотидов, служившие праймерами. Через 2–3 сут большинство матричных молекул превра-

щались в дуплексы. То есть праймеры были полностью построены мономерами до комплементарных матрицам цепочек.

В недавней работе этой же лаборатории [9] продемонстрировано неферментативное копирование внутри протоклеток последовательности ДНК длиной в 25 нт, то есть достаточной для транскрипции активных рибозимов. Правда, в качестве мономеров использовались не естественные активированные дезоксирибонуклеотиды, а немного измененные. У них вместо гидроксила в 3'-позиции была аминогруппа. С естественными мономерами удавалось получать только 5-звенные копии. Здесь наблюдался тот же эффект, что и с заменой гидроксила на аминогруппу при фосфорилировании нуклеозидов: более высокая реактивность аминогруппы. Сами авторы признают, что не видят пока какой-либо возможности объяснить предбиотическое появление аминокислотосодержащих нуклеотидных аналогов. Однако не исключено, что такие аминированные нуклеотиды могут возникать, хотя бы в небольших количествах, при высоких концентрациях NH_3 (тогда глицеральдегид может прореагировать с 2-аминооксазолом в виде аддукта с аммиаком, как гликолевый альдегид в опыте А. Фаренбаха и др. [55]) или при других, еще не найденных условиях.

Протоклетки, образованные даже столь простыми веществами как жирные кислоты, способны обеспечить обособление и неферментативное копирование молекул НК. Конечно, прочность таких протоклеток невелика: при встряхивании или перемешивании окружающей среды они распадаются и могут терять свое содержимое. В кислой или щелочной среде, а также в соленой воде они также разрушаются. Значительно прочнее мембраны, в состав которых входят фосфолипиды. Возможность абиотического синтеза фосфолипидов показана Дж. Сазерлендом и др. [7]. Они этерифицировали 2-фосфоглицерин карбоновыми кислотами, содержащими 8–10 атомов углерода. Моноэфиры не образовывали пузырьков. Диэфиры и их смеси с моноэфирами формировали пузырьки – липосомы, стабильные при различных значениях pH и температуры. Они были способны удерживать внутри себя моно- и три-нуклеотиды в течение, по меньшей мере, двух недель.

Мембраны, состоящие из смеси компонентов с разными полярными группами, обладают большей стабильностью и проницаемостью. Наличие хотя бы небольших количеств фосфолипидов закрепляет молекулы жирных кислот в мембране, снижая скорость их десорбции, а также препятствует разрушению мембран двухвалентными катионами [82].

Фосфолипиды образуют и более сложные, многослойные структуры [83]. Считая их идеальной

средой для полимеризации нуклеотидов, Д. Димер провел серию опытов, имитирующих циклы увлажнения/высушивания, используя пузырьки из фосфолипидов с включенными в них неактивированными нуклеотидами (AMP и UMP). Водная суспензия таких пузырьков наносилась небольшими объемами в открытые сосудики, помещенные на медленно вращающийся подогреваемый до 85°C алюминиевый диск. Диск находился в камере, продуваемой CO_2 для создания бескислородных условий и удаления паров воды. В одном месте на пути вращения диска помещалось устройство для дозированного добавления воды в сосудики, где вода к этому моменту испарилась, а фосфолипиды образовали тонкие слои с расположенными между ними нуклеотидами. После увлажнения в сосудиках вновь возникали липидные пузырьки с включенными в них мономерами и олигомерами. Появление олигомеров было доказано гель-электрофорезом, наличием гиперхромного эффекта и электрофорезом через нанотверстия (диаметр 1.5 нм), пропускающие лишь по одной молекуле олигонуклеотида. Выявлено образование олигомеров длиной в несколько десятков нуклеотидов (иногда – до 100), количество которых возрастало с каждым циклом увлажнения/высушивания, но затем выходило на плато из-за уравнивания процессов полимеризации и гидролиза. Параллельные опыты с poly(A) и poly(U) показали, что после каждого цикла гидролизует около 8% олигомеров.

В более поздних публикациях [84, 85] Д. Димер развивает мысль о естественном отборе в циклах увлажнения/высушивания протоклеток, содержащих разные полимеры. Например, биополимер, стабилизирующий мембрану аналогично современным цитоскелетным белкам, обеспечил бы протоклеткам преимущество, защитив их от механического “стригущего” действия, вызванного турбулентностью. К сожалению, автор не указывает ни природу такого полимера, ни его абиотическое происхождение, ни способы его воспроизведения, чтобы протоклетка смогла передать часть его молекул своим дочерним протоклеткам.

А между тем такого рода полимеры на заре жизни существовали – липидоподобные пептиды. Благодаря вышеописанным процессам полимеризации аминокислот они появились довольно рано (ранее фосфолипидов) и синтезировались в достаточных количествах.

Самыми распространенными аминокислотами были глицин и аланин, а следующими (с большим отрывом) – валин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты и серин. Это доказано как изучением содержания аминокислот в метеоритах, так и модельными опытами. Поэтому короткие пептиды (~10 а.о.) по чисто статистическим причинам содержали только один аминокислотный

остаток с гидрофильной группой, а остальные были гидрофобными. Таким образом, их молекулы представляли собой цепочки с гидрофильной “головой” и гидрофобным “хвостом” (если полярная аминокислота была в середине цепочки, то с двумя хвостами). Они, как и жирные кислоты, способны формировать в водной среде двухслойные структуры. Такие пептиды способны к самосборке, образуя амилоидные волокна, трубочки, лентообразные пленки и пузырьки, что подробно описано в обзоре первооткрывателя этого явления С. Чжана [86], нашедшего для них массу практических применений в медицине.

Экспериментально установлено [87, 88], что липидоподобные пептиды самопроизвольно образуют нанотрубки и пузырьки диаметром 30–50 нм с толщиной стенок, равной двукратной длине молекулы пептида. Таким образом, эти молекулы ориентированы перпендикулярно стенкам трубочек и пузырьков, образуя двухслойную структуру. Толщина стенок примерно одинакова с толщиной фосфолипидных мембран современных организмов. Прочность стенок выше, чем у двухслойных мембран, образуемых жирными кислотами, так как пептидные цепочки имеют гораздо больший ассортимент межмолекулярных связей, чем гидрофобные “хвосты” молекул жирных кислот. Кстати, в современных клетках цитоскелет, т.е. основу их структуры, определяющую форму клеток, образуют белки, а не липиды.

Скорее всего, на заре жизни пептидные структуры и жирные кислоты образовывали комплексные мембраны, в которых они взаимно дополняли друг друга. Липидные компоненты обеспечивали надежную изоляцию содержимого протоклетки от внешней среды, препятствуя его утечке, а пептидные компоненты придавали мембране прочность без утери эластичности и, возможно, содействовали транспорту субстратов сквозь мембрану.

Разумеется, описанные протоклетки нельзя назвать организмами, даже примитивными. Они не представляли собой единое целое, в котором все компоненты взаимосвязаны и взаимозависимы. Молекулы РНК в них размножались за счет поступающих мономеров, количество остальных компонентов увеличивалось лишь путем захвата новых молекул, производимых абиотическим питомником. Протоклетки росли, увеличиваясь в размерах, затем разделялись случайным образом на неравные части, и не весь ассортимент их содержимого (в том числе, и молекул РНК) мог оказаться в каждой дочерней протоклетке. Те из них, которые получили неполный комплект РНК, могли утратить способность самокопирования и попросту погибнуть, став “пищей” для других протоклеток.

Иными словами, генотип протоклетки (если можно так назвать комплекс молекул РНК в ней)

оказывал влияние лишь на часть ее фенотипа – набор самих молекул РНК, появление новых рибозимов и повышение их активности. На мембранный генотип не производил полезного для них действия. Возможно, единственным исключением могло быть появление среди молекул РНК рибозима, катализирующего синтез фосфолипидов (предположение Дж. Шостака [89]), которые, как сказано выше, стабилизируют мембрану.

Лишь после возникновения кодируемого синтеза белковых молекул генотип протоклеток начал постепенно расширять сферу своего влияния, производя и полезный для них строительный материал, и самих “строителей” – разнообразные белковые ферменты. И, по-видимому, только с этого этапа протоклетки можно считать примитивными организмами, а их эволюцию – подлинно Дарвинской. Но процессы, приведшие к возникновению генетического кода – это материал для отдельной большой статьи.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Первым процессом, ведущим к происхождению жизни на Земле, можно с уверенностью считать фотохимический синтез формальдегида и HCN в только что образовавшейся атмосфере. Она, как утверждают геологи, была в катархейском эоне намного плотнее нынешней, ее давление достигало 100 бар, как на Венере [90]. Какой бы высокой ни была температура земной поверхности, в атмосфере конденсировались микрокапельки воды (очевидно, на высоте гораздо большей, чем сейчас), растворяющие в себе продукты фотохимических реакций и вещества, извергаемые океаном магмы. Можно даже предположить, что образовавшийся аэрозоль представлял собой множество предбиотических микрореакторов ([91] и ссылки в ней). В этих микрореакторах не могли происходить процессы, описанные выше для наземных водоемов. Абиотический питомник мог существовать в таком микродисперсном виде и, по крайней мере, самые первые стадии изображенных на рис. 1 процессов могли в нем происходить и накапливать гликолонитрил, формамид и другие органические соединения. В микрокапельках происходили также циклы увлажнения/высушивания (второй процесс, важный для зарождения жизни), хотя полному высушиванию могло препятствовать наличие высококипящих жидкостей.

Неизвестно, какова была судьба продуктов атмосферных процессов до образования земной коры и охлаждения ее до температуры конденсации воды. Многие из них довольно устойчивы к УФ-радиации. Кроме того, в атмосферу поступали в виде паров соли цинка (ZnS, а также ZnCl₂, который с H₂S образует ZnS). ZnS в микрокапельках

образовывал микрокристаллики, которые защищали адсорбированные на них продукты от УФ-лучей. Поэтому не исключено, что в наземных условиях абиотические синтезы начались не с нуля, что могло ускорить зарождение жизни.

На земной поверхности при контакте с жидкой водой начался третий процесс (серпентинизация), и продолжились уже в новых условиях первые два. Все это достаточно подробно описано в основном тексте. Отметим только, что в этот период очень возросло в атмосфере содержание метана за счет серпентинизации. А значит — интенсифицировались фотохимические процессы в атмосфере, продуцирующие формальдегид и HCN. Поэтому нелогичным выглядит пересмотр объема продукции HCN (ранее оцениваемого как примерно равный объему продукции формальдегида) в сторону уменьшения [29], объясняемый якобы небольшим содержанием метана в тогдешней атмосфере. Тем более что HCN образуется и другими абиотическими путями. Так что цифры для HCN, приведенные в табл. 1, следует считать сильно заниженными.

Абиотических питомников было множество. Небольших водоемов и сейчас много вокруг каждого вулкана. А в те времена неокрепшей и не столь толстой земной коры вулканическая деятельность была, вероятно, многократно интенсивнее. И в атмосферных микрореакторах, и уже в наземных, гораздо обильнее, чем сейчас, снабжаемых субстратами как из атмосферы, так и из недр, быстро накопилось много органических веществ. При продуктивности абиотических процессов, указанной в табл. 1, на 1 км² вулканического региона *ежесуточно* может образоваться 16 г формальдегида, исходного органического вещества для всех синтезов абиотического питомника. Всего около 1 г весят 10¹⁹ молекул РНК длиной в 100–200 нт, потенциальных рибозимов-РНК-полимераз. В опытах по искусственной эволюции нуклеиновых кислот используют 10¹⁴–10¹⁵ молекул (в десятки–сотни тысяч раз меньше) и добиваются успеха. Так что и для успешной естественной эволюции продуктивности абиотических процессов было вполне достаточно.

Хотя конденсации мономеров способствуют циклы увлажнения/высушивания, без конденсирующих агентов вряд ли могло обойтись. Из всех используемых конденсирующих агентов наиболее естественными и не зависящими от других являются амиды фосфорной кислоты [32, 65]. Они активно фосфорилируют нуклеозиды и нуклеотиды даже в микромолярных концентрациях. Но и эти процессы нуждались в появлении рибозимов, которые бы ускоряли их, давая селективное преимущество вырабатывающим их предбиологическим ансамблям. Такие рибозимы не исследовались, но они вполне возможны, так как известен

подобный рибозим, катализирующий трифосфорилирование нуклеозидов триметафосфатом [92]. Так что эксперименты, вероятно, дадут положительный результат.

Пока нет консенсуса в вопросе первого информационного полимера. Многие склонны считать, что существовала некая пред-РНК. Вполне логично считать таковой ТНК. Ведь для абиотического синтеза треонуклеотидов не требуется глицеральдегид: доказано, что гликолевый альдегид способен реагировать с 2-аминооксазолом (а возможно, и с оксазол-2-тионом), формируя пятичленное кольцо [42]. Кстати, этим снимается проблема разделения по времени гликолевого и глицеринового альдегидов. Обеспечивается и гомогенность нуклеотидов: ведь если в реакции их синтеза (например, на начальных этапах абиогенеза) был вовлечен только гликолевый альдегид, пентозных нуклеотидов не возникало. ТНК гораздо устойчивее к гидролизу благодаря отсутствию в углеводном кольце свободных гидроксильных групп. Единственный недостаток: ее молекула менее гибка, чем молекула РНК, что может ограничивать каталитические возможности ТНК. Поэтому она впоследствии была вытеснена РНК, особенно на стадии формирования генетического кода: РНК лучше выполняла адапторные функции.

Образование протоклеток обычно обуславливают инкапсулированием молекул РНК внутри пузырьков, образованных жирными кислотами. При этом в большинстве работ не рассматривается роль пептидов как структурной основы для протоклеточных мембран. И это несмотря на более высокую вероятность абиотического синтеза липидообразных пептидов, чем молекул жирных кислот достаточной длины (10 и более углеродных атомов), и намного большую прочность пузырьков, образованных пептидами. Заслуживает внимания также недавно высказанная идея [93], что в создании мембран могли участвовать полиэферы, легко возникающие при конденсации α -гидроксикислот. Для выяснения абиотической роли пептидов и полиэфиров (или даже депсипептидов) необходимы такие же эксперименты, как проводимые до сих пор с протоклетками, образованными только жирными кислотами.

Описанные процессы реально происходят и, по-видимому, могли при благоприятном сочетании, сложившемся хотя бы в одном из многих миллиардов небольших водоемов, привести к возникновению примитивных организмов, из которых путем эволюции произошло все живое. Однако вряд ли стоит считать их единственно возможными родоначальниками жизни. Еще много остается незадаанных Природе вопросов относительно тайны происхождения жизни.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит профессоров Дэвида Димера (David Deamer), Раманарайанана Кришнамурти (Ramanarayanan Krishnamurthy), Кодзи Тамура (Koji Tamura) и доктора Пола Риммера (Paul Rimmer) за плодотворное обсуждение отдельных вопросов, изложенных в данном обзоре, и предоставление необходимых литературных источников.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не содержит исследований с использованием людей или животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Опарин А.И.* // Происхождение жизни. М.: Московский рабочий. 1924.
2. *Еськов К.Ю.* // Удивительная палеонтология: История Земли и жизни на ней. М.: ЭНАС, 2008. 312 с.
3. *Кунин Е.В.* // Логика случая. О природе и происхождении биологической эволюции. М.: Центрполиграф. 2014. 760 с.
4. *Никитин М.А.* // Происхождение жизни. От туманности до клетки. М.: Альпина нон-фикшн. 2016. 542 с.
5. *Ritson D.J., Battilocchio C., Ley S.V., Sutherland J.D.* // Nat. Communs. 2018. V. 9. 1821.
6. *Xu J., Ritson D.J., Ranjan S., Todd Z.R., Sassellov D.D., Sutherland J.D.* // Chem. Communs. 2018. V. 54. P. 5566–5569.
7. *Bonfio C., Caumes C., Duffy C.D., Patel B.H., Percivalle C., Tsanakopoulou M., Sutherland J.D.* // J. Amer. Chem. Soc. 2019. V. 141. P. 3934–3939.
8. *Attwater J., Raguram A., Morgunov A.S., Gianni E., Holliger P.* // eLife. 2018. V. 7. e35255.
9. *O'Flaherty D.K., Zhou L., Szostak J.W.* // J. Amer. Chem. Soc. 2019. V. 141. P. 10481–10488.
10. *Kim S.C., Zhou L., Zhang W., O'Flaherty D.K., Rondo-Brovetto V., Szostak J.W.* // J. Amer. Chem. Soc. 2020. V. 142. P. 2317–2326.
11. *Bhowmik S., Krishnamurthy R.* // Nat. Chem. 2019. V. 11. P. 1009–1018.
12. *Yadav M., Kumar R., Krishnamurthy R.* // Chem. Rev. 2020. V. 120. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00546>
13. *Maruyama S., Ebisuzaki T.* // Geosci. Front. 2017. V. 8. P. 253–274.
14. *Ebisuzaki T., Maruyama S.* // Geosci. Front. 2017. V. 8. P. 275–298.
15. *Maruyama S., Ikoma M., Genda H., Hirose K., Yokoyama T., Santosh M.* // Geosci. Front. 2013. V. 4. P. 141–165.
16. *Preiner M., Xavier J.C., Sousa F.L., Zimorski V., Neuback A., Lang S.Q., Greenwell H.C., Kleinermanns K., Tuysuz H., McCollom T.M., Holm N.G., Martin W.F.* // Life. 2018. V. 8. 41.
17. *Легкоступов М.С.* // К вопросу о модели образования планетных систем звезд. М.: ИПМ им. М.В. Келдыша. 2018. 33 с.
18. *Canup R.M., Asphaug E.* // Nature. 2001. V. 412. P. 708–712.
19. *Rimmer P.B., Shorttle O.* // Life. 2019. V. 9. 12.
20. *McCollom T.M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. P. 13965–13970.
21. *Vallée Y., Shalayel I., Ly K.D., Rao K.V.R., de Paëpe G., Märker K., Milet A.* // Int. J. Dev. Biol. 2017. V. 61. P. 471–478.
22. *Karki M., Gibard C., Bhowmik S., Krishnamurthy R.* // Life. 2017. V. 7. 32.
23. *Kitadai N., Maruyama S.* // Geosci. Front. 2018. V. 9. P. 1117–1153.
24. *Yang L., Xiao F., Zhang Q., Xu C., Dai B.* // Chem. Select. 2019. V. 4. P. 7096–7101.
25. *Mulkidjanian A.Y., Bychkov A.Y., Dibrova D.V., Galperin M.Y., Koonin E.V.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. E821–E830.
26. *Диброва Д.В., Гальперин М.Ю., Кунин Е.В., Мулкиджанян А.А.* // Биохимия. 2015. Т. 80. С. 590–611.
27. *Mulkidjanian A.Y.* // Biol. Direct. 2009. V. 4. P. 26.
28. *Pinto J.P., Gladstone G.R., Yung Y.L.* // Science. 1980. V. 210. P. 183–185.
29. *Tian F., Kasting J., Zahnle K.* // Earth Planet. Sci. Lett. 2011. V. 308. P. 417–423.
30. *Summers D.P., Chang S.* // Nature. 1993. V. 365. P. 630–633.
31. *Ranjan S., Todd Z.R., Sutherland J.D., Sassellov D.D.* // Astrobiology. 2018. V. 18. P. 1023–1040.
32. *Gibard C., Gorrell I.B., Jiménez E.I., Kee T.P., Pasek M.A., Krishnamurthy R.* // Angew. Chem. Int. Ed. 2019. V. 58. P. 8151–8155.
33. *Botta O., Bada J.L.* // Surv. Geophys. 2002. V. 23. P. 411–467.
34. *Saladino R., Botta L., Di Mauro E.* // Life, 2018. V. 8. P. 6.
35. *Britvin S.N., Murashko M.N., Vapnik Y., Polekhovskiy Y.S., Krivovichev S.V.* // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 8355.
36. *Taillades J., Beuzelin I., Garrel L., Tabacik V., Bied C., Commeyras A.* // Orig. Life Evol. Biosph. 1998. V. 28. P. 61–77.
37. *Shalayel I., Coulibaly S., Ly K.D., Milet A., Vallée Y.* // Life. 2018. V. 8. P. 47.
38. *Patel B.H., Percivalle C., Ritson D.J., Duffy C.D., Sutherland J.D.* // Nat. Chem. 2015. V. 7. P. 301–307.
39. *Pasek M.A., Harnmeijer J.P., Buick R., Gull M., Atlas Z.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. P. 10089–10094.
40. *Gull M., Cafferty B.J., Hud N.V., Pasek M.A.* // Life. 2017. V. 7. P. 29.
41. *Powner M.W., Gerland B., Sutherland J.D.* // Nature. 2009. V. 459. P. 239–242.
42. *Islam S., Aguilar J.A., Powner M.W., Nilsson M., Morris G.A., Sutherland J.D.* // Chem. Eur. J. 2013. V. 19. P. 4586–4595.

43. Islam S., Bučar D.K., Powner M.W. // Nat. Chem. 2017. V. 9. P. 584–589.
44. Stairs S., Nikmal A., Bučar D.-K., Zheng S.-L., Szostak J.W., Powner M.W. // Nat. Commun. 2017. V. 8. 15270.
45. Kim S.C., O'Flaherty D.K., Zhou L., Lelyveld V.S., Szostak J.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2018. V. 115. P. 13318–13323.
46. Becker S., Thoma I., Deutsch A., Gehrke T., Mayer P., Zipse H., Carell T. // Science. 2016. V. 352. P. 833–836.
47. Becker S., Schneider C., Okamura H., Crisp A., Amato T., Dejmek M., Carell T. // Nat. Commun. 2018. V. 9. 163.
48. Roberts S.J., Szabla R., Todd Z.R., Stairs S., Bučar D.-K., Šponer J., Sasselov D.D., Powner M.W. // Nat. Commun. 2018. V. 9. 4073.
49. Noronha A.M., Wilds C.J., Lok C.-N., Viazovkina K., Arion D., Parniak M., Damha M.J. // Biochemistry. 2000. V. 39. P. 7050–7062.
50. Taylor A.I., Pinheiro V.B., Smola M.J., Morgunov A.S., Peak-Chew S., Cozens C., Weeks K.M., Herdewijn P., Holliger P. // Nature. 2015. V. 518. P. 427–430.
51. Li F., Sarkhel S., Wilds C.J., Wawrzak Z., Prakash T.P., Manoharan M., Egli M. // Biochemistry. 2006. V. 45. P. 4141–4152.
52. Pinheiro V.B., Taylor A.I., Cozens C., Abramov M., Renders M., Zhang S., Chaput J.C., Wengel J., Peak-Chew S.-Y., McLaughlin S.H., Herdewijn P., Holliger P. // Science. 2012. V. 336. P. 341–344.
53. Liu Z., Rossi J.-C., Pascal R. // Life. 2019. V. 9. 26.
54. Li L., Prywes N., Tam C.P., O'Flaherty D.K., Lelyveld V.S., Izgu E.C., Pal A., Szostak J.W. // J. Amer. Chem. Soc. 2017. V. 139. P. 1810–1813.
55. Fahrenbach A.C., Giurgiu C., Tam C.P., Li L., Hongo Y., Aono M., Szostak J.W. // J. Amer. Chem. Soc. 2017. V. 139. P. 8780–8783.
56. Mariani A., Russell D.A., Javelle T., Sutherland J.D. // J. Amer. Chem. Soc. 2018. V. 140. P. 8657–8661.
57. Yi R., Y. Hongo Y., Fahrenbach A.C. // Chem. Commun. 2018. V. 54. P. 511–514.
58. Acevedo O.L., Orgel L.E. // J. Mol. Biol. 1987. V. 197. P. 187–193.
59. Ferris J.P. // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2006. V. 361. P. 1777–1786.
60. Joshi P.C., Aldersley M.F., Ferris J.P. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2011. V. 413. P. 594–598.
61. Jheeta S., Joshi P.C. // Life. 2014. V. 4. P. 318–330.
62. Saito H., Watanabe K., Suga H. // RNA. 2001. V. 7. P. 1867–1878.
63. Tamura K. // J. Mol. Evol. 2019. V. 87. P. 143–146.
64. Ando T., Takahashi S., Tamura K. // Nucl. Acids Res. 2018. V. 46. P. 11144–11152.
65. Gibard C., Bhowmik S., Karki M., Kim E.-K., Krishnamurthy R. // Nat. Chem. 2018. V. 10. P. 212–217.
66. Turk R.M., Chumachenko N.V., Yarus M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 4585–4589.
67. Yarus M. // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2011. V. 366. P. 2902–2909.
68. Vlassov A.V., Kazakov S.A., Johnston B.H., Landweber L.F. // J. Mol. Evol. 2005. V. 61. P. 264–273.
69. Wochner A., Attwater J., Coulson A., Holliger P. // Science. 2011. V. 332. P. 209–212.
70. Attwater J., Wochner A., Holliger P. // Nat. Chem. 2013. V. 5. P. 1011–1018.
71. Horning D.P., Joyce G.F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. P. 9786–9791.
72. Samanta B., Joyce G.F. // eLife. 2017. V. 6. e31153.
73. Zhou L., Kim S.C., Ho K.H., O'Flaherty D.K., Giurgiu C., Wright T.H., Szostak J.W. // eLife. 2019. V. 8. e51888.
74. Ferris J.P., Hill A.R., Jr., Liu R., Orgel L.E. // Nature. 1996. V. 381. P. 59–61.
75. Leman L., Orgel L., Ghadiri M.R. // Science. 2004. V. 306. P. 283–286.
76. Danger G., Boiteau L., Cottet H., Pascal R. // J. Amer. Chem. Soc. 2006. V. 128. P. 7412–7413.
77. Sibilska I.K., Feng T., Li L., Yin J. // Orig. Life Evol. Biosph. 2018. V. 48. P. 277–287.
78. Forsythe J.G., Yu S.-S., Mamajanov I., Grover M.A., Krishnamurthy R., Fernández F.M., Hud N.V. // Angew. Chem. Int. Ed. 2015. V. 54. P. 9871–9875.
79. Forsythe J.G., Petrov A.S., Millar W.C., Yu S.-S., Krishnamurthy R., Grover M.A., Hud N.V., Fernández F.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 114. P. E7652–E7659.
80. Krishnamurthy R. // Chem. Eur. J. 2018. V. 24. P. 16708–16715.
81. Adamala K., Szostak J.W. // Science. 2013. V. 342. P. 1098–1100.
82. Toparlak O D., Mansy S.S. // Exptl. Biol. Med. 2019. V. 244. P. 304–313.
83. DeGuzman V., Vercoutere W., Shenasa H., Deamer D. // J. Mol. Evol. 2014. V. 78. P. 251–262.
84. Damer B., Deamer D. // Life. 2015. V. 5. P. 872–887.
85. Deamer D.W. // Assembling Life. How Can Life Begin on Earth and Other Habitable Planets? Oxford University Press, Oxford, UK, 2019.
86. Zhang S. // Interface Focus. 2017. V. 7. 20170028.
87. Vauthey S., Santoso S., Gong H.Y., Watson N., Zhang S.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 5355–5360.
88. Childers W.S., Ni R., Mehta A.K., Lynn D.G. // Curr. Opin. Chem. Biol. 2009. V. 13. P. 652–659.
89. Szostak J.W. // Angew. Chem. 2017. V. 129. P. 11182–11189.
90. Zahnle K., Nick A., Cockell C.S., Halliday A., Nisbet E., Selsis F., Sleep N.H. // Space Sci. Rev. 2007. V. 129. P. 35–78.
91. Mompeán C., Marun-Yaseli M.R., Espigares P., González-Toril E., Zorzano M.-P., Ruiz-Bermejo M. // Sci. Rep. 2019. V. 9. 1916.
92. Moretti J.E., Muller U.F. // Nucl. Acids Res. 2014. V. 42. P. 4767–4778.
93. Chandru K., Mamajanov I., Cleaves II, H.J., Jia T.Z. // Life. 2020. V. 10. 6.

Physico-Chemical Processes That Probably Originated the Life

S. P. Kovalenko[#]

[#]*E-mail: spkovalenko2008@mail.ru*

Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220141 Republic of Belarus

The material and energetic resources capable to provide abiotic syntheses of substances from which prebiological structures were created are analysed. It is shown that one-carbon compounds, including formaldehyde and cyanic hydrogen, could be basic starting substances. Volcanic activity and photochemical action of solar UV-rays are considered as possible energetic resources. Amino acids, lipids, carbohydrates and nucleotides were synthesized as a result of reactions between starting substances and photoreduction of their products in sulfur-containing environment. The wetting/drying cycles in water pools promoted the polymerization of monomers (amino acids and nucleotides). There could be the ribozymes among the arisen oligonucleotides. Some of them catalyzed processes of lengthening of the oligonucleotides. The extended RNA-like structures got new functions, including ability to catalyze RNA replication. The lipid-like peptides and fatty acids carried out a role of the primitive membranes, forming the protocells. Details of the described processes are discussed.

Keywords: photoreduction, serpentinization, wetting/drying, hydrolysis, polymerization, condensing agents, RNA, replication, catalysts, ribozymes, protocells



РЕГУЛЯЦИЯ СВОЙСТВ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С 2-ГИДРОКСИПРОПИЛ β-ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ДЕТАЛИ

© 2020 г. А. А. Скуредина*, #, А. С. Тычинина*,
И. М. Ле-Дейген*, Н. Г. Белогорова*, Е. В. Кудряшова*

*ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/3

Поступила в редакцию 04.04.2020 г.

После доработки 15.04.2020 г.

Принята к публикации 18.04.2020 г.

Работа посвящена исследованию механизма взаимодействия 2-гидроксипропил β-циклодекстрина (ГПЦД) с липосомальным бислоем. Методом ИК-спектроскопии Фурье установлено, что основным сайтом связывания ГПЦД на поверхности нейтральных липосом на основе дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) являются фосфатные группы липидов. Комплексообразование с ГПЦД приводит к стабилизации гелеобразного состояния в монокомпонентных липосомах (ДПФХ). Включение анионного компонента – кардиолипина (КЛ, 20%) в бислои приводит к изменению механизма взаимодействия липосомы-ГПЦД: наблюдается разупорядочение липидов в бислое, приводящее к нарушению целостности мембраны, что проявляется в высвобождении красителя (фенолфталеина), загруженного в липосомы. Влияние ГПЦД на процесс и параметры фазового перехода анионных липосом исследовали по термограммам, полученным на основе изменения положения полос поглощения ацильных цепей липидов в ИК-спектре липосом. Обнаружено расслоение ДПФХ/КЛ (80/20%) бислоя на две микрофазы с различным содержанием кардиолипина. Установлено, что ГПЦД обуславливает более выраженное расслоение в бислое: наблюдается дестабилизация мембраны вблизи температуры плавления микрофазы, обогащенной КЛ и наоборот – снижение подвижности липидов в областях с низким содержанием КЛ. При исследовании влияния ГПЦД на взаимодействие антибактериального препарата – левофлоксацина (ЛВ) с липидным бислоем обнаружено, что комплексообразование лекарственных молекул с ГПЦД приводит к увеличению эффективности адсорбции лекарственной молекулы на поверхности бислоя и может обеспечить облегчение транспорта лекарства за счет образования дефектов в мембране, при этом ЛВ в комплексе с ГПЦД демонстрирует высокую антибактериальную активность в системах *in vitro*, не ниже по сравнению со свободным ЛВ.

Ключевые слова: циклодекстрины, липосомы, ИК-спектроскопия, КД спектроскопия, фазовый переход, антибактериальная активность

DOI: 10.31857/S0132342320050243

ВВЕДЕНИЕ

Одним из основных направлений развития биоорганической и биомедицинской химии на сегодняшний день является разработка новых высокоэффективных лекарственных формуляций с использованием различных систем доставки. Включение лекарства в системы доставки позволяет увеличить растворимость препарата и его биодоступность, снизить вероятность возникновения

побочных эффектов, а также придать формуляции новые свойства: адресная доставка, замедленное высвобождение или высвобождение под действием внешнего фактора (температуры, изменения pH, облучения света и т.д.), влияние на проницаемость биомембран для лекарственной субстанции.

На сегодняшний день одним из перспективных видов носителей лекарств являются циклодекстрины (ЦД) – циклические олигосахариды, образованные несколькими D-глюкопиранозными остатками [1]. ЦД имеют форму усеченного конуса с внешней гидрофильной поверхностью и внутренней гидрофобной полостью. Такое строение ЦД обуславливает их способность формировать комплексы включения типа “гость-хозяин”

Список сокращений: ГПЦД, 2-гидроксипропил β-циклодекстрин; ДПФХ дипальмитоилфосфатидилхолин; КЛ, кардиолипин; ЛВ, левофлоксацин; МИК, минимальная ингибирующая концентрация; ФФ фенолфталеин; ЦД, циклодекстрин.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 939-34-34; эл. почта: skuredinanna@gmail.com).

со многими гидрофобными веществами, в том числе и с лекарственными молекулами. Включение в полость ЦД способствует увеличению растворимости и стабильности гидрофобной молекулы, устранению неприятных запахов и вкусов, а также обеспечению защиты от деградации микроорганизмами [2–4].

В зависимости от размера лекарственной молекулы возможно использование одного из трех типов ЦД (α -ЦД, β -ЦД или γ -ЦД), различающихся количеством D-глюкопиранозных остатков и, следовательно, размером внутренней полости. Большинство лекарственных молекул имеют в своей структуре небольшие гидрофобные ароматические фрагменты (например, фторхинолоны, ибупрофен, хлорамфеникол и др.), поэтому наиболее часто используются производные на основе β -ЦД [5]. Введение заместителей изменяет физико-химические свойства самого β -ЦД, значительно повышая его растворимость, а также влияет на стабильность его комплексов, поскольку новая функциональная группа может образовывать дополнительные связи с молекулой “гостя” [6–8].

Среди всех производных β -ЦД наиболее широкое применение в медицине имеет 2-гидроксипропил β -ЦД (ГПЦД). ГПЦД обладает высокой растворимостью в воде (больше 600 мг/мл), способен образовывать стабильные комплексы включения с широким спектром лекарственных препаратов. Безопасность ГПЦД была доказана *in vivo*, на сегодняшний день на фармацевтическом рынке существует несколько лекарственных формаций на основе комплексов ГПЦД [2, 4].

Широкое применение ЦД в фармацевтике обуславливает необходимость глубокого изучения их способности взаимодействовать с биологическими мембранами. Известно, что в ряде случаев встраивание различных полимерных макромолекул в липидный бислой или их адсорбция на поверхности могут вызывать существенные изменения свойств биологической мембраны: ее проницаемости, микровязкости, скорости диффузии латеральной липидных молекул и скорости “флип-флопа”. Эти явления могут приводить к значительным изменениям в состоянии и жизнедеятельности клетки, вызывая активацию или ингибирование ферментов, влияя на клеточный гомеостаз, влияя на трембогенность липидной мембраны [9, 10].

ЦД не способны проникать сквозь биологические барьеры, однако их производные могут сорбироваться на клеточной мембране и в ряде случаев извлекать из бислоя липиды, в том числе, холестерин, что приводит к нарушению целостности мембраны [1, 11]. Однако в целом эффект на физико-химические свойства мембраны чаще всего является мягким и обратимым. Возникновение дефектов в бислое под действием ЦД приводит к улучшению проникновения лекарственных пре-

паратов сквозь мембрану и увеличивает их биодоступность [12].

В настоящее время механизм взаимодействия производных ЦД с липидами в бислое, как и влияние комплексообразования ЦД с лекарственными молекулами на проницаемость биомембран для этих лекарственных субстанций, недостаточно изучен. Определение эффективности связывания и основных сайтов взаимодействия липосом с ЦД необходимо для разработок высокоэффективных систем доставки лекарственных препаратов на основе ЦД с улучшенной биодоступностью. Для установления механизма взаимодействия производных ЦД с липидным бислоем в работе рассмотрено влияние ГПЦД на состояние и целостность липосом различного состава спектроскопическими методами, главным образом, с помощью метода ИК-спектроскопии Фурье. Методом КД спектроскопии изучено влияние ГПЦД на механизм взаимодействия лекарственной субстанции – левофлоксацина (ЛВ) с липосомами, что крайне важно при разработке систем доставки лекарств с использованием производных ЦД.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для детального исследования механизма взаимодействия ГПЦД нейтральными (100% ДПФХ) и анионными (ДПФХ/КЛ = 80/20%) липосомами, а также для установления основных сайтов связывания в комплексе липосома-ГПЦД, был применен метод ИК спектроскопии Фурье. ИК спектроскопия является высокоинформативным методом исследования состояния бислоя, поскольку позволяет следить за изменениями состояния каждой функциональной группы липидов и их лигандов, и предоставляет ценную информацию об физико-химических свойствах мембраны, например, о подвижности гидрофобных цепей [14, 15].

Исследование систем липосома-ГПЦД методом ИК спектроскопии Фурье

В ИК-спектре как монокомпонентных нейтральных (100% ДПФХ, рис. 1а), так и двухкомпонентных анионных (ДПФХ/КЛ = 80/20%) липосом присутствуют высокоинтенсивные полосы поглощения 2919 и 2851 см^{-1} , соответствующие асимметричным и симметричным валентным колебаниям C-H групп гидрофобных цепей липидов. Полосы поглощения 1727–1740 и 1220–1230 см^{-1} характерны для колебаний C=O и асимметричных валентных колебаний фосфатных групп соответственно [13].

В ИК-спектре ГПЦД (рис. 1б) наиболее интенсивная полоса поглощения при 1032 см^{-1} соответствует колебаниям C-O-C связи. Кроме того, аналитически значимыми могут быть полосы

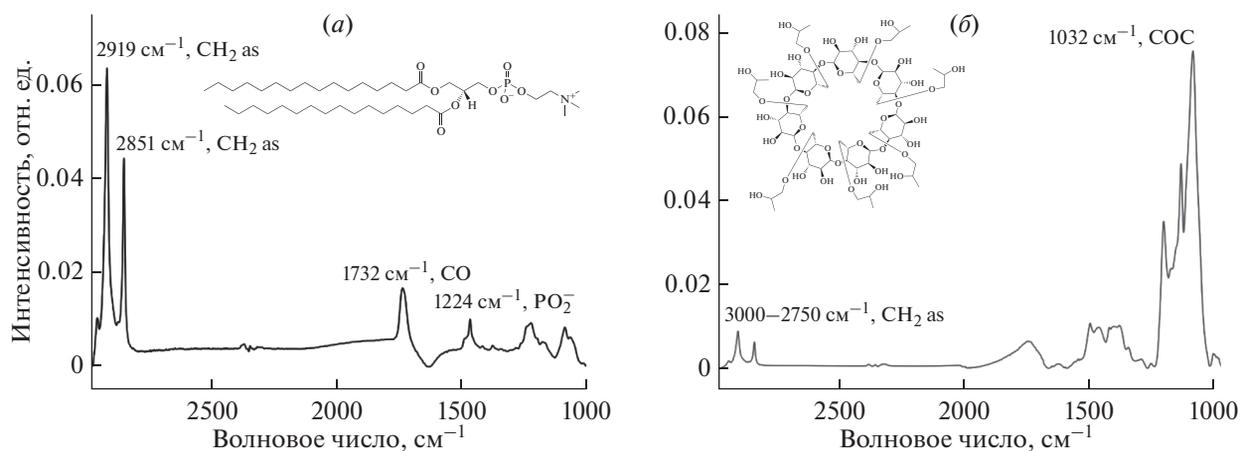


Рис. 1. (а) ИК-спектр липосом из дипальмитоилфосфатидилхолина, $C_{\text{липидов}} = 5$ мг/мл, pH 7.4. (б) ИК-спектр 2-гидроксипропил β -циклодекстрина, $C_{\text{ГПЦД}} = 50$ мг/мл, pH 7.4.

поглощения в диапазоне $3000\text{--}2750\text{ см}^{-1}$, соответствующие колебаниям CH_3 и CH_2 группам. Следует отметить, что наиболее интенсивные полосы поглощения липосом находятся в области больших волновых чисел, в то время как для ГПЦД — в области малых, что делает ИК-спектроскопию более привлекательным методом для анализа систем, содержащих оба компонента, с точки зрения исключения перекрывания полос. В настоящей работе для исследования состояния бислоя в присутствии ГПЦД из ИК-спектра системы липосомы-ГПЦД вычитался ИК-спектр ГПЦД и были определены положения основных полос поглощения липидов.

Для получения комплексов липосомы-ГПЦД к суспензии липосом (5 мг/мл) добавляли ГПЦД в диапазоне значений концентрации от 20 до 60 мг/мл. Для того чтобы определить роль фазового состояния липидной мембраны на механизм взаимодействия липидного бислоя с ГПЦД варьировали температуру предварительной инкубации комплексов (25, 37 или 50°C): при 25°C липосомы (100% ДПФХ и 80/20% ДПФХ/КЛ) находятся в гелеобразном состоянии, вблизи 37°C — в состоянии фазового перехода, а при 50°C как анионные, так и нейтральные липосомы находятся в жидкокристаллическом состоянии [13]. После инкубации комплексы охлаждали до комнатной температуры и регистрировали ИК-спектры. В табл. 1 приведены положения полос ИК-спектров комплексов нейтральных липосом (100% ДПФХ) с ГПЦД при различных условиях инкубации. Важно отметить, что сдвиг полосы поглощения в ИК-спектре более, чем на 1 см^{-1} является аналитически значимым [14, 16].

Согласно полученным данным, при температуре инкубации 25°C с ГПЦД положения полос поглощения в ИК-спектрах липосом (100% ДПФХ)

существенным образом не изменяются вне зависимости от концентрации циклодекстрина. Вероятно, это свидетельствует об отсутствии или незначительности взаимодействия между ГПЦД с мембраной в гелеобразном состоянии, характеризующимся ограниченной подвижностью гидрофобных цепей в бислое.

Иная картина наблюдается при предварительной инкубации с нагревом. Установлено, что наиболее выраженные сдвиги полос поглощения в ИК-спектре липосом наблюдаются при температуре предварительной инкубации 50°C и наиболее высокой концентрации ГПЦД — 60 мг/мл (рис. 2). Липосомы при данной температуре находятся в жидкокристаллическом состоянии и обладают высокой подвижностью ацильных цепей в бислое.

Согласно табл. 1 в данных условиях наиболее выраженные изменения наблюдаются для полосы поглощения асимметричных валентных фосфатной группы: существенный высокочастотный сдвиг указывает на снижение степени гидратации данных функциональных групп, по-видимому, за счет образования водородных связей со стерически наиболее доступными гидроксипропильными группами молекул ГПЦД.

Полосы поглощения асимметричных и симметричных валентных колебаний CH_2 групп претерпевают значительный низкочастотный сдвиг, указывающий на снижение подвижности гидрофобных цепей при связывании с ГПЦД. По-видимому, в процессе инкубации комплекса при 50°C циклодекстрин не только адсорбируется на поверхности липосом, но и заглубляется в “размягченный бислой”, что приводит к снижению подвижности гидрофобных цепей после охлаждения до комнатной температуры.

Таблица 1. Положения полос поглощения в ИК-спектре липосом (100% ДПФХ) при различных температурах инкубации с 2-гидроксирипил β -циклодекстрином, см^{-1} . В скобках дополнительно указаны обнаруженные плечи полос. 0.02 М натрий-фосфатный буферный раствор, pH 7.4, 22°C

Полоса поглощения	Без инкубации	Температура предварительной инкубации комплексов		
		25°C	37°C	50°C
$C_{\text{ГПЦД}} = 20 \text{ мг/мл}$				
$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$	2919.3 ± 0.2	2919.3 ± 0.2	2919.0 ± 0.2	2918.8 ± 0.2
$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$	2849.9 ± 0.2	2850.6 ± 0.2	2850.8 ± 0.2	2851.3 ± 0.2
$\nu(\text{PO}_2^-)$	1222.5 ± 0.2	1225.0 ± 0.2	1225.9 ± 0.2	1226.6 ± 0.2
$\nu(\text{C}=\text{O})$	1733.4 ± 0.2	1732.8 ± 0.2	1732.7 ± 0.2	1731.5 ± 0.2
$C_{\text{ГПЦД}} = 40 \text{ мг/мл}$				
$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$	2919.4 ± 0.2	2919.6 ± 0.2	2919.3 ± 0.2	2918.8 ± 0.2
$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$	2850.8 ± 0.2	2849.9 ± 0.2	2850.7 ± 0.2	2850.0 ± 0.2
$\nu(\text{PO}_2^-)$	1223.6 ± 0.2	1224.7 ± 0.2	1228.5 ± 0.2	1233.6 ± 0.2
$\nu(\text{C}=\text{O})$	1733.5 ± 0.2	1734.2 ± 0.2	1732.4 ± 0.2	1731.8 ± 0.2
$C_{\text{ГПЦД}} = 60 \text{ мг/мл}$				
$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$	2919.1 ± 0.2	2919.8 ± 0.2	2917.1 ± 0.2	2917.8 ± 0.2
$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$	2851.2 ± 0.2	2851.3 ± 0.2	2851.3 ± 0.2	2850.1 ± 0.2
$\nu(\text{PO}_2^-)$	1222.6 ± 0.2	1223.9 ± 0.2	1224.0 ± 0.2 (1214.0 \pm 0.2)	1242.7 ± 0.2 (1213.7 \pm 0.2)
$\nu(\text{C}=\text{O})$	1733.1 ± 0.2	1733.0 ± 0.2	1733.7 ± 0.2	1732.2 ± 0.2

Данная гипотеза подтверждается и данными по взаимодействию липосом с ГПЦД при предварительной инкубации при 37°C, где наблюдаются аналогичные сдвиги полос поглощения, но выра-

женные в меньшей степени. В то же время, полоса $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ уже смещается в область меньших волновых чисел, что свидетельствует о существенном снижении подвижности липидов в бислое.

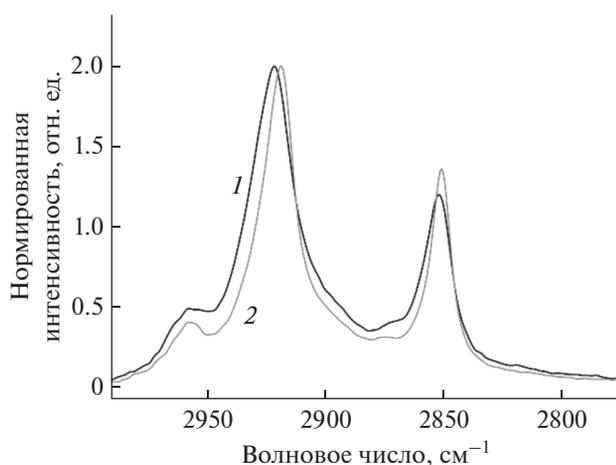


Рис. 2. Положение полос поглощения ассиметричных и симметричных CH_2 групп липосом ДПФХ 100% (1) и комплексов липосом ДПФХ 100% с 2-гидроксирипил β -циклодекстрином (60 мг/мл) после инкубации при 50°C (2) и последующего охлаждения. 0.02 М натрий-фосфатный буферный раствор, pH 7.4, 22°C.

Таким образом, для образования комплекса ДПФХ 100% липосом с ГПЦД необходимо, чтобы везикулы находились в состоянии фазового перехода или жидкокристаллическом состоянии. Кроме того, концентрация ГПЦД должна быть не менее 40 мг/мл. Полученные результаты подтверждают литературные данные [5, 11, 16], что ГПЦД является одним из наиболее безопасных и не токсичных производных β -ЦД по отношению к мембране — для достижения заметного изменения физико-химических свойств необходимы предварительный нагрев и высокие концентрации ЦД.

Иная картина наблюдается при взаимодействии ГПЦД с двухкомпонентными анионными липосомами, содержащими 20% кардиолипина (КЛ), где помимо привнесения отрицательного заряда фосфатных групп, “конусообразный” КЛ разрыхляет бислои, способствуя образованию дефектов и снижая температуру фазового перехода [17]. Положение полос поглощения в ИК-спектре липосом в условиях образования комплекса с ГПЦД ($C_{\text{ГПЦД}} = 60 \text{ мг/мл}$, инкубация при 50°C) в зависимости от липидного состава (100%

Таблица 2. Положение полос поглощения в ИК-спектре липосом (100% ДПФХ и 80% ДПФХ/20% КЛ) в присутствии ГПЦД (60 мг/мл), температура предварительной инкубации 50°C. 0.02 М натрий-фосфатный буферный раствор, рН 7.4, 22°C

Колебания связей	Липосомы (ДПФХ), см ⁻¹	Липосомы (ДПФХ) + ГПЦД, см ⁻¹	Липосомы (ДПФХ/КЛ), см ⁻¹	Липосомы (ДПФХ/КЛ) + ГПЦД, см ⁻¹
	100% DPPC		80% DPPC/20% CL	
$\nu_{as}(\text{CH}_2)$	2919.1 ± 0.2	2917.8 ± 0.2	2919.2 ± 0.2	2921.1 ± 0.2
$\nu_s(\text{CH}_2)$	2851.2 ± 0.2	2850.1 ± 0.2	2851.5 ± 0.2	2852.5 ± 0.2
$\nu(\text{PO}_2^-)$	1222.6 ± 0.2	1242.7 ± 0.2 (1213.7 ± 0.2)	1225.0 ± 0.2	1222.0 ± 0.2
$\nu(\text{C}=\text{O})$	1733.1 ± 0.2	1732.2 ± 0.2	1739 ± 0.2 (1723 ± 0.2)	1738.2 ± 0.2

ДПФХ или ДПФХ/КЛ = 80/20%) представлены в табл. 2.

Взаимодействие анионных липосом (ДПФХ/КЛ = 80/20%) с ГПЦД обуславливает низкочастотные сдвиги полос поглощения PO_2^- и $\text{C}=\text{O}$ групп (табл. 2), что указывает на повышение степени гидратации полярных групп липидов. Повышение степени гидратации карбонильных и фосфатных групп характерно при фазовом переходе липосом из гель-фазы в жидкокристаллическую фазу. Такие изменения организации липидов в бислое должны сопровождаться увеличением подвижности алифатических цепей липидов. Действительно, при образовании комплекса липосом (ДПФХ/КЛ = 80/20%) с ГПЦД наблюдается высокочастотный сдвиг полосы (табл. 2), соответствующий асимметричным колебаниям CH_2 групп, на 2 см⁻¹, что характерно при разупорядочении мембраны при переходе в жидкокристаллическое состояние [18].

Таким образом, в зависимости от липидного состава возможно два принципиально разных механизма взаимодействия ГПЦД с липидным бислоем. Для монокомпонентных липосомальных систем наблюдается преимущественная адсорбция ГПЦД на поверхности бислоя за счет образования водородных связей между гидроксильными группами ГПЦД и фосфатными группами ДПФХ. Кроме того, в условиях инкубации (50°C) возможно заглубление ГПЦД в “размягченный бислой”. Это приводит к снижению подвижности гидрофобных цепей после охлаждения до комнатной температуры. Взаимодействие ГПЦД с бислоем, содержащим КЛ, напротив, приводит к увеличению степени гидратации поверхностных фосфатных и карбонильных групп липидов, а также к увеличению подвижности ацильных цепей в гидрофобной части липидного бислоя. Подобные эффекты возможны вследствие образования дефектов в мембране, которые обусловлены неоднородностью липидного состава (“конусообраз-

ной” геометрией КЛ), а также формированием микрофаз, обогащенных и обедненных КЛ [13]. Кроме того, в таких системах может происходить извлечение липидов из бислоя: так в литературе описано извлечение дипальмитоилфосфатидилхолина, 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина, холестерина, дегидроэргостерола и других фосфолипидов из липосом и липидных монослоев под действием ЦД и их производных [11]. Более того, в экспериментах *in vitro* (*Mycobacterium* sp.) было показано, что ЦД извлекают липиды из клеточной стенки, тем самым повышая ее проницаемость для лекарственных молекул [19].

Влияние ГПЦД на температуру фазового перехода липосом

Для более глубокого понимания молекулярного механизма взаимодействия ГПЦД с бислоем, содержащим 20% КЛ, было рассмотрено влияние циклодекстрина на процесс фазового перехода в анионных липосомах. Температура фазового (T_m) перехода является ключевой характеристикой липосомальной мембраны, описывающей состояние бислоя. Наиболее чувствительными к фазовому переходу в ИК-спектре липосом являются полосы поглощения гидрофобных цепей липидов. Ранее было показано, что положение полос асимметричных колебаний CH_2 групп зависит от подвижности ацильных цепей: низкочастотный сдвиг указывает на более плотную упаковку липидов в бислое, а высокочастотный сдвиг свидетельствует о разупорядочивании бислоя [20].

Нейтральные липосомы (100% ДПФХ) характеризуются температурой фазового перехода (T_m) в диапазоне от 40 до 44°C [14, 18]. Термограмма анионных липосом, содержащих КЛ (ДПФХ/КЛ = 80/20%), позволяет обнаружить основной фазовый переход при ~35–37°C и предварительный переход при 27–30°C (рис. 3), что свидетельствует о сосуществовании двух смешанных микрофаз, имеющих разное соотношение ДПФХ/КЛ. Ранее

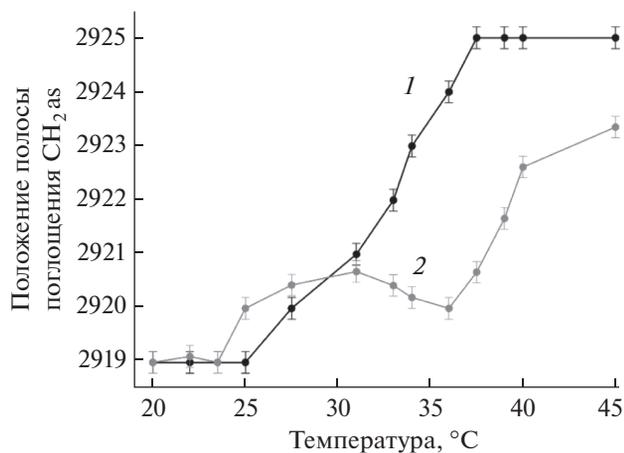


Рис. 3. Термограмма контрольных липосом (1, ДПФХ/КЛ = 80/20%) и комплекса липосомы-ГПЦД (2, $C_{\text{ГПЦД}} = 60$ мг/мл). 0.02 М натрий-фосфатный буферный раствор, pH 7.4.

существование таких микрофаз для двухкомпонентных липосом (ДПФХ/КЛ) было продемонстрировано методом дифференциальной сканирующей калориметрией [13]. Согласно литературным данным фаза с более низким содержанием КЛ имеет более высокую температуру фазового перехода (35–37°C).

Образование комплекса липосомы-ГПЦД обуславливает выраженные изменения в термограмме: на начальном участке кривой характерно увеличение подвижности липидов вблизи температуры плавления микрофазы обогащенной КЛ (27°C), далее наблюдается выраженный минимум на 37°C, т.е. снижение подвижности липидов вблизи температуры плавления микрофазы с низким содержанием КЛ. По-видимому, связывание ГПЦД с микрофазой, обогащенной КЛ, в области первого фазового перехода (27°C) способствует разупорядочению мембраны и образованию дефектов в местах гетерогенности. При дальнейшем нагревании (35–37°C) наблюдается фазовый переход основной микрофазы – с высоким содержанием ДПФХ. В этом случае бислоем взаимодействует с ГПЦД по механизму, описанному для 100% ДПФХ липосом, где, напротив, наблюдается снижение подвижности ацильных цепей в бислое и стабилизация гелеобразного состояния за счет образования водородных связей фосфатных групп липидов с ГПЦД (табл. 1). Как следствие, температура фазового перехода комплекса ГПЦД с липидным кластером с низким содержанием КЛ (высокотемпературная часть термограммы на рис. 3) существенно выше по сравнению с липосомами в отсутствие ГПЦД и составляет порядка 39°C, т.е. близка к липосомальной системе, состоящей из 100% ДПФХ (41°C).

Исследование целостности мембраны в присутствии ЦД

Для подтверждения гипотезы о возникновении дефектов в бислое и нарушении целостности мембраны под действием ГПЦД было исследовано влияние ГПЦД на целостность липосомальной мембраны (ДПФХ/КЛ = 80/20%). Одним из классических методов исследования целостности бислоя является исследование высвобождения красителей из везикул, например, флуорексона [21] и 6-карбоксифлуоресцеина [22], под действием внешних агентов в условиях, близких к физиологическим (перемешивание, 37°C).

В данной работе были получены липосомы, (ДПФХ/КЛ = 80/20%) загруженные индикатором фенолфталеином (ФФ) при pH 7.4. Липосомальная суспензия помещалась в диализный мешок и во внешний раствор натрий-боратного буферного раствора с pH 10.7. Поскольку раствор ФФ является бесцветным в нейтральных pH, а в щелочных условиях приобретает малиновую окраску, высвобождение ФФ из липосом должно сопровождаться увеличением интенсивности окраски внешнего раствора. Для детектирования красителя регистрировались УФ спектры: в спектре ФФ (боратный буфер pH 10.7) присутствует широкий пик поглощения с максимумом при длине волны 550 нм (рис. 4а).

Поскольку ионы буферных систем имеют маленькие размеры, то они способны проникать сквозь диализную мембрану, что с течением времени приводит к формированию градиента pH на границе растворов. Такое изменение микроокружения липосом может приводить к нарушению их стабильности без воздействия дополнительных веществ. Действительно, наблюдается постепенное высвобождение 30% красителя из контрольных липосом в течение 2 ч (рис. 4б). Добавление к липосомам поверхностно-активного вещества ТритонХ-100 приводит к 100% высвобождению красителя в течение 15 мин. Столь быстрое высвобождение обусловлено полным разрушением липосомальной бислоя под действием детергента.

Связывание ГПЦД, как было показано методом ИК-спектроскопии Фурье, способно приводить к разупорядочению мембраны. При введении ГПЦД в суспензию липосом, загруженных индикатором, на начальном участке наблюдается ускоренное (по сравнению с контрольной системой) высвобождение: 30% ФФ высвобождается за 20 мин. Полное высвобождение ФФ происходит спустя 90 мин. Таким образом, взаимодействие ГПЦД с микрофазой КЛ приводит к возникновению в бислое дефектов, что обуславливает высвобождение веществ как из мембраны, так и возможность проникновения других внутрь.

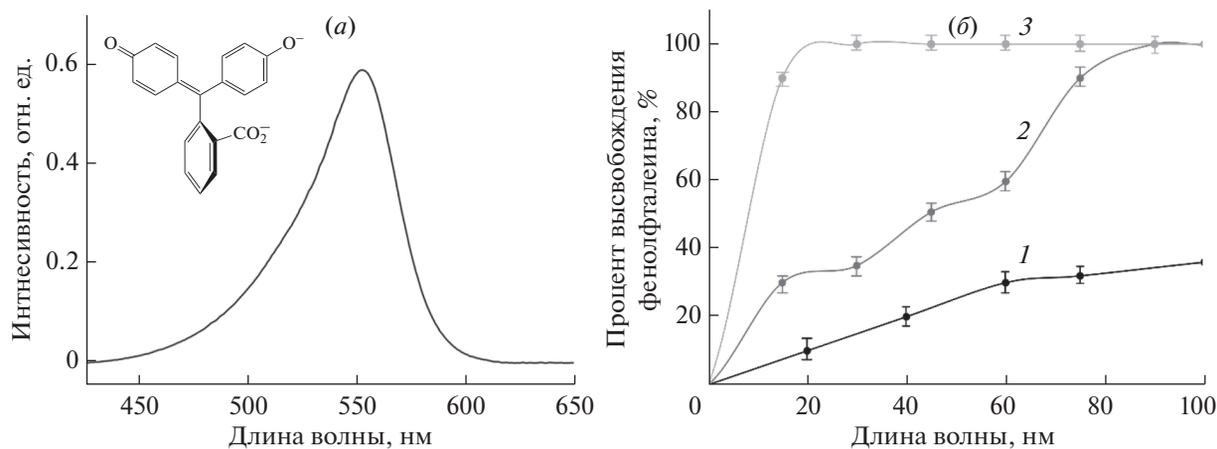


Рис. 4. (а) УФ-спектр фенолфталеина 10^{-7} М, рН 10.7. (б) Кинетика высвобождения фенолфталеина из липосом (1), под действием 2-гидроксипропил β -циклодекстрина (2), ТритонаХ-100 (3), 37°C .

Исследование адсорбции комплексов ГПЦД-левофлоксацин на липосомальном бислое

Поскольку нами был обнаружен эффект нарушения целостности мембраны (37°C , ДПФХ/КЛ = 80/20%) под действием ГПЦД было исследовано влияния образования комплекса ГПЦД с лекарственной молекулой на взаимодействие с липидным бислоем. Можно ожидать, что комплексообразование лекарственных препаратов с производными ЦД способно обеспечить облегчение транспорта лекарственных препаратов сквозь бислой за счет образования дефектов. Для исследования данного эффекта в качестве лекарственной молекулы был использован левофлоксацин (ЛВ) — антибактериальный препарат широкого спектра действия группы фторхинолонов.

Исследование состояния ЛВ проводили методом спектроскопии кругового дихроизма (КД), применимого для исследования биологических объектов, имеющих хиральные центры [23]. Кроме того, данный метод позволяет получать детальную информацию о состоянии лекарственной молекулы в изучаемой многокомпонентной системе, поскольку ни липосомы, ни ГПЦД не имеют собственных КД-спектров.

В КД спектре ЛВ наблюдается минимум на длине волны 301 нм (рис. 5а). Образование комплекса ЛВ с ГПЦД приводит к сдвигу КД спектра в сторону больших длин волн на 1 нм. Механизм образования комплексов фторхинолонов с производными ЦД заключается в погружении ароматического фрагмента лекарства внутрь гидрофобной полости ЦД [6]. Таким образом, сдвиг в КД спектре ЛВ свидетельствует об изменении его микроокружения на более гидрофобное. Действительно, красный сдвиг полосы характерен для комплексов ЛВ с каликсаренами [24], кроме того в независимом эксперименте нами было показано, что в

более гидрофобном растворителе (ДМСО) КД-спектр ЛВ имеет минимум на 305 нм.

При добавлении ЛВ к анионным двухкомпонентным липосомам (ДПФХ/КЛ = 80/20%), напротив, наблюдается существенный сдвиг полосы в сторону меньших длин волн с 301 нм до 294 нм (рис. 5б). Такие изменения могут быть обусловлены увеличением степени гидратации ЛВ или, что более вероятно, к изменению в состоянии ионизации ЛВ. Так, на мере липосомальной формуляции другого фторхинолона — моксифлоксацина [13] было показано, что взаимодействие положительно заряженного гетероцикла фторхинолона (при рН 7.4) с фосфатными группами КЛ на поверхности липосом приводит к аналогичным изменениям в КД-спектре. Наиболее вероятно, что добавление ЛВ к суспензии липосом приводит к адсорбции ЛВ на поверхности бислоя за счет электростатических взаимодействий противоположно заряженных фосфатных групп липосом КЛ и азота в гетероцикле молекулы ЛВ (рис. 5а).

Насыщение поверхности бислоя молекулами ЛВ наблюдается при трехкратном мольном избытке по отношению к липидам, при дальнейшем увеличении содержания ЛВ изменения положения полосы поглощения ЛВ в КД-спектре не происходит.

При добавлении комплекса ЛВ-ГПЦД к липосомам наблюдались аналогичные изменения в положении КД-спектра ЛВ (сдвиг полосы в сторону меньших длин волн). Однако по сравнению со свободным ЛВ происходит намного более выраженный синий сдвиг — на 11 нм. Столь значимое изменение положения пика ЛВ указывает на более эффективное взаимодействие ЛВ с поверхностью бислоя. Кроме того, насыщение наблюдается для мольного избытка ЛВ по отношению к ли-

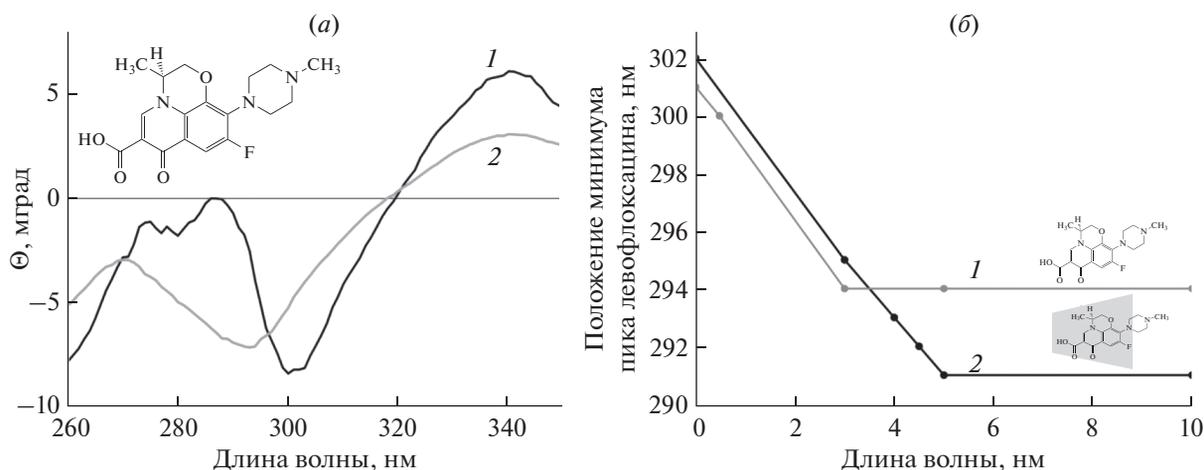


Рис. 5. (а) КД-спектр свободного левофлоксацина (1) $C = 2 \times 10^{-3}$ М и левофлоксацина, адсорбированного на поверхность липосом (ДПФХ/КЛ = 80/20%) (2), рН 7.4. (б) Положение минимума в КД-спектре левофлоксацина (2) и левофлоксацина, связанного в комплекс с 2-гидроксипропил β-циклодекстрина (1), адсорбированного на поверхность липосом (ДПФХ/КЛ = 80/20%), 37°C, рН 7.4.

падам равного 5. Т.е. в присутствии ГПЦД на поверхности липосом образуется больше доступных участков связывания для ЛФ.

Комплекс ЛВ-ГПЦД образуется за счет погружения карбоксильной группы и ароматического фрагмента ЛВ внутрь полости ЦД. Положительно заряженный гетероцикл фторхинолона (рис. 5) расположен вне полости ГПЦД [6] и может участвовать в образовании прочных электростатических взаимодействий с фосфатными группами липидов. Способность ГПЦД взаимодействовать с бислоем и вызывать в нем дефекты обуславливает значительное увеличение адсорбции лекарственной молекулы на поверхности липосом, что не достигается в случае свободного лекарства. Этот механизм может лежать в основе увеличения био-

доступности фторхинолона включенного в комплекс с производными ЦД.

Исследование влияния ГПЦД на антибактериальную активность левофлоксацина

Для контроля влияния образования комплекса с ГПЦД на биологическую активность в работе исследована антибактериальная активность ЛВ-ГПЦД в сравнении со свободным ЛВ на штамме *Escherichia coli* МН-1. Определены минимальные ингибирующие концентрации (МИК) фторхинолона в данных системах. Для этого из твердой питательной среды с нанесенной бактериальной культурой были вырезаны кусочки агара диаметром 9 мм. В лунку помещался образец (свободный ЛВ или комплекс ЛВ-ГПЦД в фосфатном буфере рН 7.4). Спустя 24 ч инкубации были оценены диаметры ингибирующего действия (рис. 6, табл. 3). Согласно полученным данным антибактериальная активность ЛВ (свободный и в комплексе) имеет концентрационную зависимость, что подтверждает специфичность действия антибактериального препарата. МИК свободного ЛВ составляет 0.2 мкг/мл. Комплекс ЛВ-ГПЦД характеризуется чуть большими значениями диаметров ингибирующего действия, чем свободный ЛВ, что, по-видимому, обусловлено более эффективным взаимодействием ГПЦД с мембраной клеток. Значение МИК для образца ЛВ-ГПЦД (0.17 мкг/мл) практически не отличается (в пределах погрешности) от таковой для свободного ЛВ.

Следует отметить, что свободные ЦД не проникают сквозь мембраны клеток [11]. Однако, взаимодействие ГПЦД с мембраной за счет обра-

Таблица 3. Значение диаметров ингибирующего действия левофлоксацина и его комплекса на *E. coli* на твердых питательных средах, инкубация 24 ч при 37°C, 0.02 М натрий-фосфатный буферный раствор, рН 7.4

№	$C_{\text{ЛВ}}$, мкг/мл	ЛВ	Комплекс ЛВ + ГПЦД
Контроль	0	—	—
1	0.05	—	—
2	0.1	—	—
3	0.2	11 ± 0.5	12 ± 0.5
4	1	22 ± 0.5	24 ± 0.5

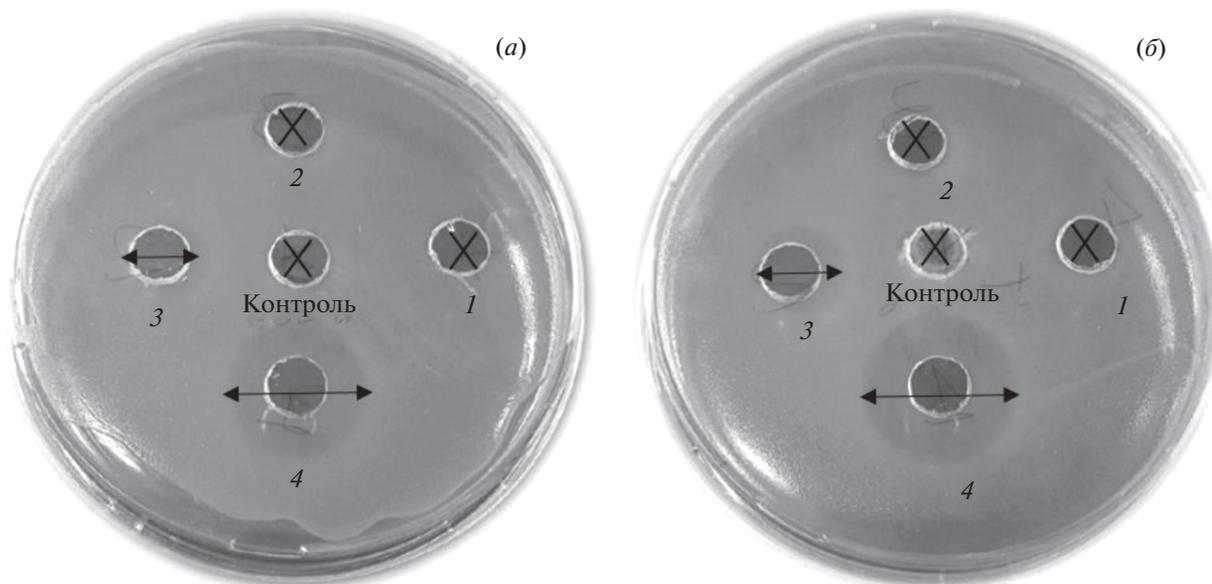


Рис. 6. Диаметры ингибирующего действия левофлоксацина (а) и его комплекса с 2-гидроксипропил β -циклодекстрином (б) на *E. coli* при концентрации левофлоксацина 0.05 (1), 0.1 (2), 0.2 (3) и 1 (4) мкг/мл, инкубация 24 ч при 37°C, 0.02 М натрий-фосфатный буферный раствор, pH 7.4.

зования дефектов в бислое может обуславливать увеличение проникновения молекул ЛВ сквозь мембрану, что происходит после диссоциации комплекса. Таким образом, взаимодействие ГПЦД не снижает антибактериальную активность ЛВ, а имеет тенденцию к усилению действия препарата.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. 2-Гидроксипропил- β -циклодекстрин, фенолфталеин, левофлоксацин, ТритонХ-100 – Sigma-Aldrich (США); дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ), кардиолипин (1',3'-бис[1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфо]-глицерол, КЛ) – Avanti Polar Lipids (США), соли для приготовления буферных растворов – ЭкоСервис (Россия), соляная кислота – Реахим (Россия).

Получение липосом. Из раствора липидов в хлороформе в концентрации 25 мг/мл ДПФХ или ДПФХ/КЛ (80/20%) (в весовом соотношении) удаляли органический растворитель на вакуумном роторном испарителе при температуре 55°C. Полученную тонкую пленку липидов диспергировали в 0.02 М натрий-фосфатном буфере (pH 7.4) для достижения концентрации липидов 5 мг/мл. Далее раствор подвергали воздействию ультразвука (22 кГц) в течение 600 с (3 \times 200 с) в непрерывном режиме на диспергаторе 4710 “Cole-Parmer Instrument” (США) при температуре 50–55°C.

Получение липосом, загруженных фенолфталеином. Включение в липосомы индикатора проводили методом пассивной загрузки. Тонкую ли-

пидную пленку диспергировали в растворе 0.01 М фенолфталеина в 0.02 М натрий-фосфатном буферном растворе (pH 7.4). Далее раствор подвергали воздействию ультразвука (22 кГц) в течение 600 с (3 \times 200 с) в непрерывном режиме на диспергаторе 4710 “Cole-Parmer Instrument” (США) при температуре 50–55°C. Суспензию объемом 3 мл переносили в диализный мешок Orange Scientific (MWCO 3.5 кДа), который помещали в 500 мл 0.02 М натрий-фосфатного буферного раствора (pH 7.4). Диализ проводили в течение 1 ч с двукратной сменой внешнего буферного раствора.

Получение комплексов липосом с ГПЦД. К полученной суспензии липосом добавляли раствор 2-гидроксипропил β -циклодекстрина (200 мг/мл) для достижения концентрации ГПЦД в итоговой системе 20 мг/мл, 40 мг/мл или 60 мг/мл. Образцы инкубировали при перемешивании в течение суток при температуре 25, 37 или 50°C. Перед регистрацией ИК-спектров системы охлаждались до комнатной температуры.

Регистрация термограмм. Регистрировали ИК-спектры липосом ДПФХ/КЛ = 80/20% (5 мг/мл) или липосом в присутствии ГПЦД (60 мг/мл) в интервале температур 20–50°C. Определяли зависимость положения характеристических полос поглощения асимметричных колебаний CH_2 групп от температуры.

Получение комплексов 2-гидроксипропил β -циклодекстрина с левофлоксацином. К 0.02 М раствору левофлоксацина в солянокислом буферном растворе (pH 4.0) добавляли 0.02 М раствор ГПЦД в

том же буферном растворе для достижения мольного соотношения ГПЦД : левофлоксацин = 1 : 1. Комплекс инкубировали при перемешивании в течение 1 ч при 37°C. Для проведения экспериментов по исследованию взаимодействия комплекса с поверхностью липосом, раствор разбавляли в 10 раз 0.02 М натрий-фосфатным буфером с контролем сохранности комплекса (рН 7.4) [6].

Изучение высвобождения фенолфталеина из липосом. 1 мл раствора липосом (5 мг/мл липидов, ДПФХ : КЛ = 80 : 20), загруженных фенолфталеином, переносили в диализный мешок Orange Scientific (MWCO 3.5 кДа), который помещали в 1 мл 0.02 М натрий-боратного буфера (рН 10.7). Растворы ГПЦД или ТритонаХ-100 добавляли к раствору липосом и помещали в диализный мешок. Системы инкубировались в течение 2 ч при перемешивании и температуре 37°C. Через определенные промежутки времени регистрировали УФ спектры внешнего раствора.

Исследование антибактериальной активности левофлоксацина и его комплекса с ГПЦД in vitro. Определение минимальной ингибирующей концентрации образцов ЛВ проводили на штамме *Escherichia coli* МН-1 (Michael Hall, США [25]). Бактерии культивировали в жидкой среде Luria-Bertani в течение 24 ч. Далее 500 мкл культуры равномерно распределяли по твердой питательной среде (Luria-Bertani) на чашке Петри; через 20 мин вырезали диски диаметром 9 мм. 50 мкл образца помещали в лунки и через 30 мин чашки Петри помещали в инкубатор 37°C. Спустя 24 ч были измерены диаметры ингибирования (отсутствия) роста бактерий.

УФ-спектры регистрировали на спектрометре УФ- и видимого диапазона AmerSharm Biosciences UltraSpec 2100 pro трижды в интервале от 200 до 400 нм в кварцевой кювете Hellma Analytics.

ИК-спектры регистрировали на ИК-спектрометре Фурье Tensor 27 “Bruker” (Германия), оснащенного МСТ-детектором, охлаждаемым жидким азотом, с термостатом фирмы “Huber” (США). Измерения проводили в термостатируемой ячейке нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО, BioATR-II, “Bruker”, Германия) с использованием кристалла однократного отражения ZnSe, при 22°C и постоянной скорости продувки системы сухим воздухом аппаратом “Jup-Air” (Германия). На кристалл ячейки НПВО наносили аликвоту (50 мкл) образца, спектр регистрировали трижды в интервале от 4000 до 950 см⁻¹, с разрешением 1 см⁻¹; производили 70-кратное сканирование и усреднение. Фон регистрировали аналогично. Спектры анализировали с помощью программы Opus 7.0.

Спектры кругового дихроизма регистрировали с помощью спектрометра J-815 фирмы “Jasco” (Япония), оснащенного термостатируемой ячейкой. Измерения проводили в диапазоне длин волн 260–350 нм при температуре 25°C в кварцевой кювете (l = 1 мм). Проводили трехкратную регистрацию спектров шагом в 1 нм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследован механизм взаимодействия 2-гидроксипропил β-циклодекстрина с липосомальным бислоем. Методом ИК-спектроскопии Фурье установлено, что для получения комплексов липосомы-ЦД необходима концентрация ГПЦД не менее 40 мг/мл и, чтобы липосомы находились в состоянии фазового перехода или жидкокристаллическом состоянии. В зависимости от состава липосом возможны два механизма взаимодействия ГПЦД с бислоем: для нейтральных моноконпонентных липосом характерно взаимодействие ГПЦД с фосфатными группами липидов с образованием водородных связей за счет гидроксипропильных заместителей в ГПЦД, что обуславливает связывание ЦД на поверхности липосом и последующее заглубление ЦД в “размягченный бислой”. Данный процесс сопровождается снижением подвижности липидов в бислое и стабилизацией гелеобразного состояния.

Для анионных двухкомпонентных липосом при взаимодействии с ГПЦД показано выраженное расслоение системы на микрофазы с разным содержанием КЛ и разной температурой фазового перехода. В области плавления микрофазы обогащенной КЛ в присутствии ГПЦД наблюдается увеличение степени гидратации поверхностных групп и увеличение подвижности ацильных цепей липидов за счет разупорядочения мембраны под действием ГПЦД. Взаимодействие ГПЦД с микрофазой обогащенной ДПФХ, напротив, приводит к стабилизации гелеобразного состояния этой микрофазы и, соответственно, к увеличению температуры основного фазового перехода T_m . Дестабилизация мембраны в областях гетерогенности под действием ГПЦД обуславливает нарушение целостности липидного бислоя и вытекание индикатора во внешнюю среду. Однако нарушение целостности мембраны не столь выражено, как под действием модельных поверхностно-активных веществ полностью разрушающих мембрану. Образование комплексов циклодекстрина с лекарственной молекулой обуславливает повышенную адсорбцию левофлоксацина на поверхности липосом, и повышенную проницаемость для лекарственной субстанции, что объясняется образованием дефектов в биомембране под дей-

ствием ЦД. Согласно исследованиям *in vitro* комплексы ЛВ-ГПЦД показывают высокую антибактериальную эффективность по отношению к клеткам *E. coli* – не ниже чем демонстрирует свободный ЛВ.

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. Loftsson T., Jarho P., Masson M., Jarvinen T. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005. V. 36. P. 335–346. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00051-9](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00051-9)
2. Stella V.J., He Q. // *Toxicol. Pathol.* 2008. V. 36. P. 30–42. <https://doi.org/10.1177/0192623307310945>
3. Crini G., Fourmentin S., Fenyvesi É., Torri G., Fourmentin M., Morin-Crini N. // *Environ. Chem. Lett.* Springer International Publishing, 2018. V. 16. № 4. P. 1361–1375. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0763-2>
4. Del Valle E.M.M. // *Process Biochem.* 2004. V. 39. P. 1033–1046. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00258-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00258-9)
5. Davis M.E., Brewster M. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004. V. 3. P. 1023–1035. <https://doi.org/10.1038/nrd1576>
6. Le-Deygen I.M., Skuredina A.A., Uporov I.V., Kudryashova E.V. // *Anal. Bioanal. Chem. Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2017. V. 409. P. 6451–6462. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0590-5>
7. Skuredina A.A., Le-Deygen I.M., Uporov I.V., Kudryashova E.V. // *Colloid J.* 2017. V. 79. P. 668–676. <https://doi.org/10.1134/S1061933X17050143>
8. Skuredina A.A., Le-Deygen I.M., Kudryashova E.V. // *Colloid J.* 2018. V. 80. P. 312–319. <https://doi.org/10.1134/S1061933X18030134>
9. Saltzman W.M., Kyriakides T.R. // *Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition.* Fourth Edi. Elsevier, 2013. P. 385–406. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398358-9.00020-3>
10. Schulz M., Olubummo A., Binder W.H. // *Soft Matter.* 2012. V. 8. № 18. P. 4849–4864. <https://doi.org/10.1039/c2sm06999g>
11. Hammoud Z., Khreich N., Auezova L., Fourmentin S., Elaissari A., Greige-Gerges H. // *Int. J. Pharm.* Elsevier. 2019. V. 564. P. 59–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.03.063>
12. Challa R., Ahuja A., Ali J., Khar R.K. // *AAPS Pharm-SciTech.* 2005. V. 2. P. 329–357. <https://doi.org/10.1517/17425247.2.1.335>
13. Le-Deygen I.M., Skuredina A.A., Safronova A.S., Yakimov I.D., Kolmogorov I.M., Deygen D.M., Burova T.V., Grinberg N.V., Grinberg V.Y., Kudryashova E.V. // *Chem. Phys. Lipids.* Elsevier Ireland Ltd. 2020. V. 228. P. 104891. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2020.104891>
14. Ле-Дейген И.М., Скуредина А.А., Кудряшова Е.В. // *Биоорг. химия.* 2020. Т. 46. С. 340–359. [Le-Deygen I.M., Skuredina A.A., and Kudryashova E.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. P. 480–497.] [doi 10.1134/S1068162020040123](https://doi.org/10.1134/S1068162020040123)
15. Deygen I.M., Seidl C., Kölmel D.K., Bednarek C., Heissler S., Kudryashova E. V., Bräse S., Schepers U. // *Langmuir.* 2016. V. 32. P. 10861–10869. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b01023>
16. Piel G., Piette M., Barillaro V., Castagne D., Evrard B., Delattre L. // *Int. J. Pharm.* 2007. V. 338. P. 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.01.015>
17. Yaroslavov A.A., Efimova A.A., Lobyshe, V.I., Kabanov V.A. // *Biochimica et Biophysica Acta.* 2002. V. 1560. P. 14–24. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(01\)00453-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(01)00453-9)
18. Bilge D., Sahin I., Kazanci N., Severcan F. // *Spectrochim. Acta – Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* Elsevier B.V. 2014. V. 130. P. 250–256. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.04.027>
19. Donova M. V., Nikolayeva V.M., Dovbnaya D.V., Gulevskaya S.A., Suzina N.E. // *Microbiology.* 2007. V. 153. P. 1981–1992. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/001636-0>
20. Le-Deygen I.M., Vlasova K.Y., Kutsenok E.O., Usvaliev A.D., Efremova M.V., Zhigachev A.O., Rudakovskaya P.G., Golovin D.Y., Gribanovsky S.L., Kudryashova E.V., Majouga A.G., Golovin Y.I., Kabanov A.V., Klyachko N.L. // *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* Elsevier Inc. 2019. V. 21. P. 102065. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102065>
21. Hatzi P., Mourtas S.G., Klepetsanis P., Antimisiaris S.G., // *Int. J. Pharm.* 2007. V. 333. P. 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.09.059>
22. Angelini G., Campestre C., Boncompagni S., Gasbarri C. // *Chem. Phys. Lipids.* Elsevier Ireland Ltd. 2017. V. 209. P. 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.09.004>
23. Bertucci C., Pistolozzi M., De Simone A. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. V. 398. P. 155–166. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3959-2>
24. Chamseddin C., Jira T. // *Curr. Pharm. Anal.* 2013. V. 9. P. 121–129. <https://doi.org/10.2174/157341213804806160>
25. Goddard J.M., Caput D., Williams S.R., Martin D.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 80. P. 4281–4285. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.14.4281>

The Regulation of Lipid Membranes' Properties by Interaction with 2-Hydroxypropyl β -Cyclodextrin. Molecular Details

A. A. Skuredina^{*, #}, A. S. Tychinina^{*}, I. M. Le-Deygen^{*}, N. G. Belogurova^{*}, and E. V. Kudryashova^{*}

[#]Phone: +7 (495) 939-34-34; e-mail: skuredinanna@gmail.com

^{*}Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory, 1/3, Moscow, 119991 Russia

The work is devoted to the study of the mechanism of 2-hydroxypropyl β -cyclodextrin (HPCD) interaction with a liposomal bilayer. The main binding sites of HPCD on the surface of neutral liposomes based on dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) are phosphate groups of lipids. Complex formation with HPCD leads to stabilization of the gel state in monocomponent liposomes. The inclusion of the anionic component – cardiolipin (CL, 20%) in the bilayer yields a change in the mechanism of liposome-HPCD interaction: the lipid disorder is observed, leading to membrane integrity disturbance, which result in the dye release (phenolphthalein) loaded into the liposomes. The effect of HPCD on the process and phase transition parameters of anionic liposomes was studied using thermograms obtained on the basis of the change in the position of the absorption bands of lipid acyl chains in the FTIR spectrum of liposomes. A stratification of DPPC/CL (80%/20%) bilayer into two microphases with different cardiolipin content was detected. HPCD causes more pronounced stratification in the bilayer: membrane destabilization near the melting point of CL-rich microphase and vice versa, a decrease in lipid mobility in regions with a low CL content. Studying the effect of HPCD on the interaction of an antibacterial drug – levofloxacin (LV) with a lipid bilayer, it was found that the complexation of drug molecules with HPCD leads to an increase in the efficiency of drug adsorption on the surface of bilayer and might facilitate the transport of drugs through the bilayer due to the formation of defects in the membrane, while LV in the complex with HPCD shows high antibacterial efficiency *in vitro* on *E. coli*, not lower than in comparison with free LV.

Keywords: cyclodextrins, liposomes, FTIR spectroscopy, CD spectroscopy, phase transition, antibacterial activity



УДК 577.112.083

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ГУМАНИЗИРОВАННОГО НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО АНТИТЕЛА ПРОТИВ ИНТЕРФЕРОНА-БЕТА ЧЕЛОВЕКА

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

^{*}ФГБОУ ВО МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, 119192 Москва, Ленинские горы, 1/12

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

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

^{****}ФГБОУ ВО МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1/3

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

Поступила в редакцию 29.04.2020 г.

После доработки 06.05.2020 г.

Принята к публикации 07.05.2020 г.

Гуманизация антител с целью создания новых терапевтических средств с низкой иммуногенностью остается актуальной задачей современной науки. В данной работе представлено получение гуманизированного антитела hV16, нейтрализующего интерферон-бета человека, методом “CDR-графтинга” на основе последовательностей иммуноглобулинов зародышевых линий человека. Созданы математические модели переменных доменов мышинового и гуманизированного антител V16 и с помощью метода молекулярной динамики показано, что конформации исходного мышинового и модифицированного антител практически не отличаются. Рекомбинантные химерные (chV16) и гуманизированные (hV16) антитела, полученные в транзientной культуре клеток CHO, выделены аффинной хроматографией, их свойства изучены биохимическими и иммунохимическими методами. Показано, что гуманизированное антитело hV16 обладает теми же параметрами аффинности, специфичности и способности к нейтрализации интерферона-бета, что и исходное мышинное антитело V16. В дальнейшем планируется использование антитела hV16 для терапии патологических состояний, вызванных действием интерферона-бета.

Ключевые слова: гуманизированные антитела, моделирование пространственной структуры антител, химерные антитела, CHO, интерферон-бета

DOI: 10.31857/S0132342320050206

ВВЕДЕНИЕ

Гуманизация моноклональных антител, полученных с использованием гибридомной техно-

Сокращения: CDR – complementarity determining region (участки, определяющие комплементарность), SDR – specificity determining region (участки, определяющие специфичность); FR – framework regions (каркасные участки); VH и VL – переменные домены тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов; CH – константные домены тяжелой цепи иммуноглобулинов; Ск или Сл – константные домены легких цепей иммуноглобулинов; МоАт – моноклональные антитела; МПК – мононуклеары периферической крови человека; МТТ – тиазол синий тетразолий бромид; ДМСО – диметилсульфоксид; IFN-β – интерферон-бета; ФБС(Т) – Фосфатно-солевой буфер (с добавлением Tween-20); МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолий бромид; V – объем.

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

логии, является одним из наиболее значимых способов снижения иммуногенности этих молекул для человека и представляет собой сложную задачу современной биоинженерии и молекулярной иммунологии [1].

Получение химерных антител является первым этапом создания гуманизированных антител. Химеризация антител заключается в замене константных доменов антитела животного константными доменами иммуноглобулина человека (рис. 1а, 1б) методами геной инженерии. По сравнению с исходными моноклональными антителами химерные антитела обладают меньшей иммуногенностью [1–3], но уступают по данному параметру гуманизированным антителам [1, 4, 5].

Следующим этапом гуманизации является максимальное приближение первичной структуры

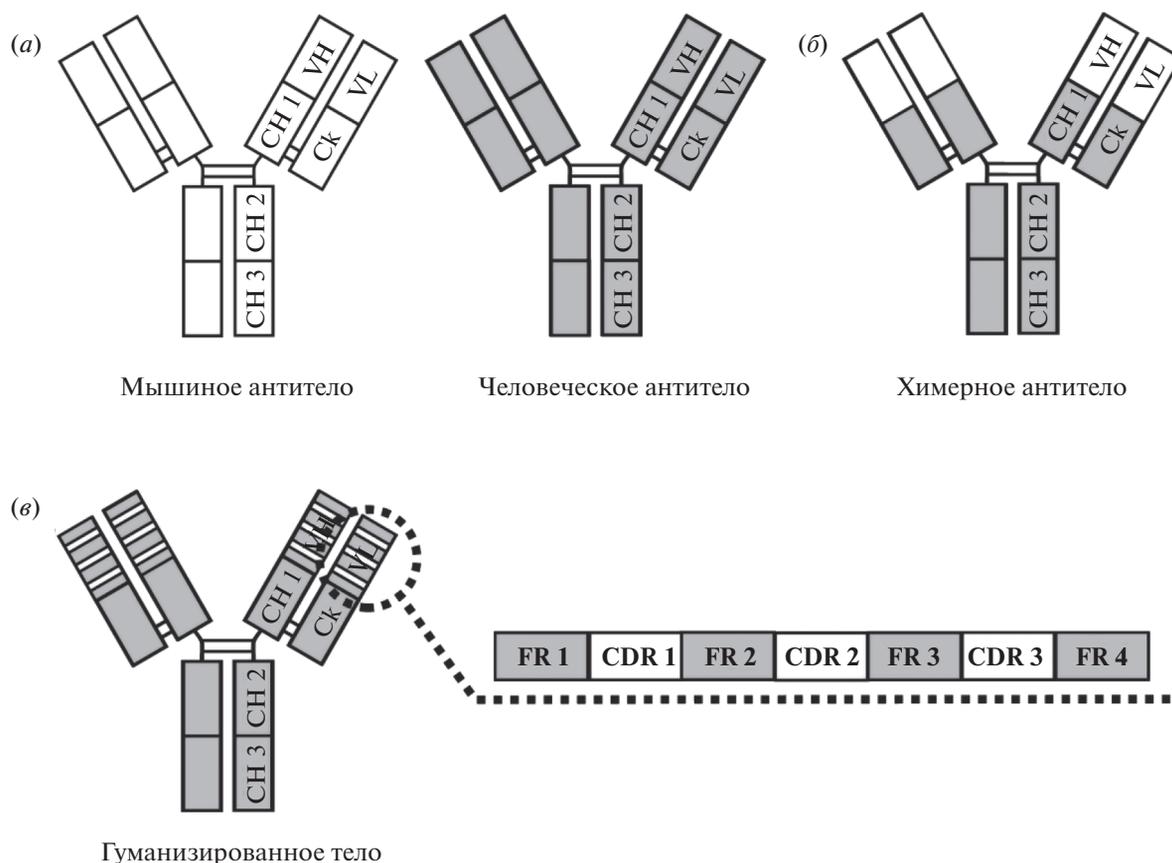


Рис. 1. Схематическое изображение иммуноглобулинов G. Мыши и человека (а), химерного антитела (б), участки возможных замен в гуманизованных антителах (в).

вариабельных доменов к выбранной из базы данных антител структуре антител человека, при этом вторичная структура, пространственная организация, биологические и биохимические параметры антитела не должны изменяться драматически. Существуют разные подходы к гуманизации антител, например, метод пересадки областей, участвующих в распознавании антигенов (CDR – Complementarity-determining region – гипервариабельные участки) (“CDR-графтинг”), метод пересадки остатков CDR, определяющих специфичность (“SDR-графтинг”), метод корректировки поверхности и другие [6]. При гуманизации методом “CDR-графтинга” каркасные участки FR (framework region,) исходного антитела заменяют аналогичными участками гомологичного антитела человека с сохранением исходных CDR-участков (рис. 1в) [7]. При гуманизации антител необходимо обращать внимание на аминокислотные остатки, находящиеся в зоне Вернье, которые играют существенную роль в позиционировании петель, содержащих гипервариабельные участки, и способствуют тонкой настройке взаимодействия антител с антигеном [8]. При возникновении не-

благоприятных с точки зрения размера, заряда или степени гидрофобности замен необходимо введение возвратных мутаций в зоне Вернье, которое, как правило, приводит к благоприятному уменьшению энтальпии [9]. Также важным аспектом гуманизации антител представляется анализ остатков, участвующих в образовании водородных и электростатических связей с CDR. Валидацию предложенных замен можно осуществить с помощью биоинформатических методов, таких как моделирование белковых структур антител, молекулярной динамики и других методов. Степень корректности выбранной стратегии гуманизации антитела определяют сравнением биологических параметров и свойств моноклональных, химерных и гуманизованных антител.

Целью данной работы являлось, используя мышиное антитело-прототип, получение химерного и гуманизованного антитела hV16, исследование их молекулярных параметров и антиген-связывающих свойств, а также нейтрализующей активности по отношению к интерферону-бета человека.

Таблица 1. Количество аминокислотных замен, обнаруженных при сравнении последовательностей легкой и тяжелой цепей антитела В16 с наиболее гомологичными последовательностями зародышевых линий человека. С – синонимичные замены, Н – несинонимичные замены

Участок	FR1		CDR1		FR2		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
	С	Н	С	Н	С	Н	С	Н	С	Н	С	Н	С	Н
Тип замены														
Размер участка, а. к.	23		10		16		7		32		9		10	
Легкая цепь, количество замен	3	4	4	3	2	0	1	3	5	4	2	2	0	1
Размер участка, а. к.	25		10		14		17		32		7		13	
Тяжелая цепь, количество замен	2	0	1	1	1	3	1	4	6	0	0	5	1	0

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Планирование аминокислотных последовательностей тяжелой и легкой цепей гуманизированного антитела hB16

Для гуманизации переменных участков тяжелых и легких цепей мышинового антитела В16 использовали метод “CDR-графтинга”. Для отбора человеческих FR-участков могут быть использованы два основных источника: последовательности зрелых антител и последовательности генов иммуноглобулинов зародышевых линий человека. Использование последовательностей генов зародышевой линии имеет два существенных преимущества. Во-первых, физическая карта локусов генов тяжелых и легких цепей человеческих иммуноглобулинов и функциональный репертуар генов зародышевых линий охарактеризованы, что позволяет осуществить поиск наиболее гомологичных генов антител среди большого количества вариантов. Во-вторых, сравнение кристаллографических структур белков показало, что антитела на основе зародышевых генов имеют более подвижную структуру, чем зрелые антитела [10, 11]. Такая подвижность теоретически может позволить замещать CDR-участки зародышевых антител на CDR-участки антител, подвергающихся гуманизации, без серьезных изменений конформации. Для того, чтобы заменить каркасные участки переменного домена мышинового антитела на человеческие, осуществляли поиск наиболее гомологичных зародышевых линий человека в базе данных IMGT (<http://www.imgt.org/>).

Последовательности аминокислотных остатков переменных доменов мышинового антитела-прототипа В16 были картированы в соответствии с классификацией Кабата [12], определены границы CDR и FR-участков. При анализе базы данных IMGT среди последовательностей зародышевых линий генов тяжелой и легкой цепей антител были обнаружены наиболее гомологичные гены: IGHV3-23*04 для тяжелой цепи и IGKV1-9*01 для легкой цепи антитела В16. Степень идентичности генов переменного домена тяжелой

цепи антитела В16 и IGHV3-23*04 составила 80%, степень идентичности генов переменного домена легкой цепи антитела В16 и IGKV1-9*01 – 65%. Количество и характер отличий генов зародышевой линии и антитела В16 в CDR и FR участках приведены в табл. 1.

Аминокислотные остатки CDR-участков зародышевых линий заменили соответствующими CDR-участками мышинового антитела В16, в каркасных участках определили положения остатков, соответствующих зоне Вернье. Были проанализированы неблагоприятные аминокислотные замены с точки зрения размера, заряда и гидрофобности аминокислотных остатков. С целью возможного предотвращения потери аффинности антитела были предложены 4 возвратные мутации в участках зоны Вернье: в последовательности переменного домена тяжелой цепи – S49A, K94R и в последовательности переменного домена легкой цепи – L4M, L78V.

Исследование моделей структур переменных доменов гуманизированного и мышинового антител hB16 и B16

Для предложенных последовательностей VH и VL hB16 были созданы модели пространственной структуры с помощью метода моделирования на основании гомологии. Реализация этого метода в веб-сервисе Rosetta Antibody включала следующие шаги: 1) поиск шаблонов среди антител с известной пространственной структурой и сходной аминокислотной последовательностью, 2) построение начальных моделей с использованием консервативных фрагментов шаблонов и VH/VL-последовательностей запроса, 3) улучшение начальных моделей путем подбора оптимальных конформаций основной цепи VH/VL и боковых цепей по всем моделям в целом. Полученные стартовые модели были дополнительно оптимизированы с учетом влияния растворителя, для чего в программе Gromacs с использованием силового поля charmm36 был проведен расчет молекулярной динамики (МД) моделей в водном растворе

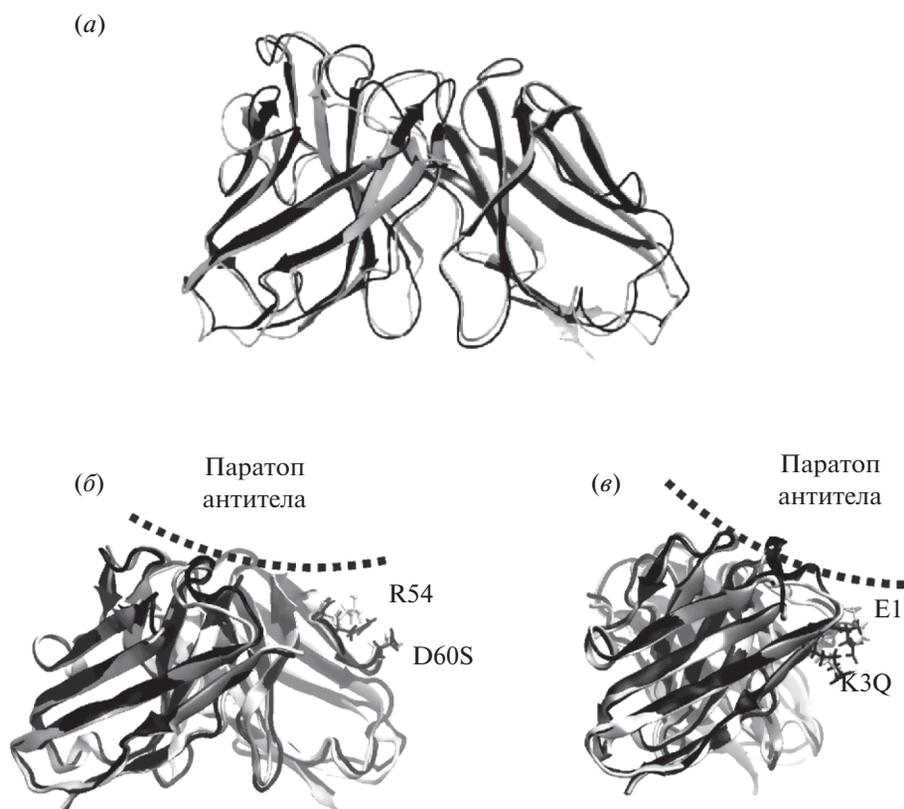


Рис. 2. Суперпозиция моделей переменных доменов гуманизированного антитела hV16 (черным цветом) и мышинового антитела V16 (серым цветом). Сопоставление хода основной цепи углеродного скелета переменных доменов мышинового и гуманизированного антител (*a*). Изменение конформации остатка R54 в легкой цепи при введении замены D60S (*b*). Изменение конформации остатка E1 в тяжелой цепи, при введении замены K3Q (*c*).

при температуре 300 К и физиологической концентрации NaCl в течение 10 нс. Анализ МД показал, что модели принимают свои равновесные конформации уже через 1 нс. Полученные траектории МД были подвергнуты кластерному анализу и наиболее представительные конформации для каждой из стартовых моделей в дальнейшем рассматривались в качестве окончательных моделей, анализ которых позволил сформулировать ряд возвратных замен в каркасных участках VH и VL гуманизированного антитела к интерферону-бета.

Введенные замены FR-участков в аминокислотные последовательности легкой и тяжелой цепей мышинового антитела V16 в ходе гуманизации не оказали существенного влияния на ход основной цепи углеродного скелета, и модельные структуры переменных доменов химерного антитела chV16 и гуманизированного антитела hV16 демонстрируют высокое сходство (СКО по α -атомам 1.0 Å, рис. 2*a*). Отметим, что некоторые замены, в частности H8P в легкой цепи и R44G в тяжелой цепи, привели к заметному локальному искажению хода основной цепи углеродного скелета, од-

нако конформация остатков, образующих вероятную поверхность паратопа, не претерпела значительных изменений. Исключением являются замены K3Q в последовательности FR1 тяжелой цепи и D60S в последовательности FR3 легкой цепи. Остаток K3 в легкой цепи мышинового антитела взаимодействует с остатком E1, поддерживая стабильную ориентацию последнего. При введении замены K3Q электростатическое взаимодействие между этими остатками исчезает, что приводит к увеличению подвижности остатка E1, возможному изменению его ориентации и смещению в область паратопа антитела, что может негативно сказаться на взаимодействии антитела с интерфероном (рис. 2*b*). Аналогично, остаток D60 в мышинном антителе взаимодействует с остатком R54, ограничивая его подвижность. Введение замены D60S приводит к смещению остатка R54 в область, прилегающую к паратопу антитела (рис. 2*c*). Таким образом, для того чтобы конформация паратопа гуманизированного антитела соответствовала конформации паратопа мышинового антитела и взаимодействие с эпитопом сохранялись, было решено ввести дополнительные возвратные мутации в последовательности FR-участков зароды-

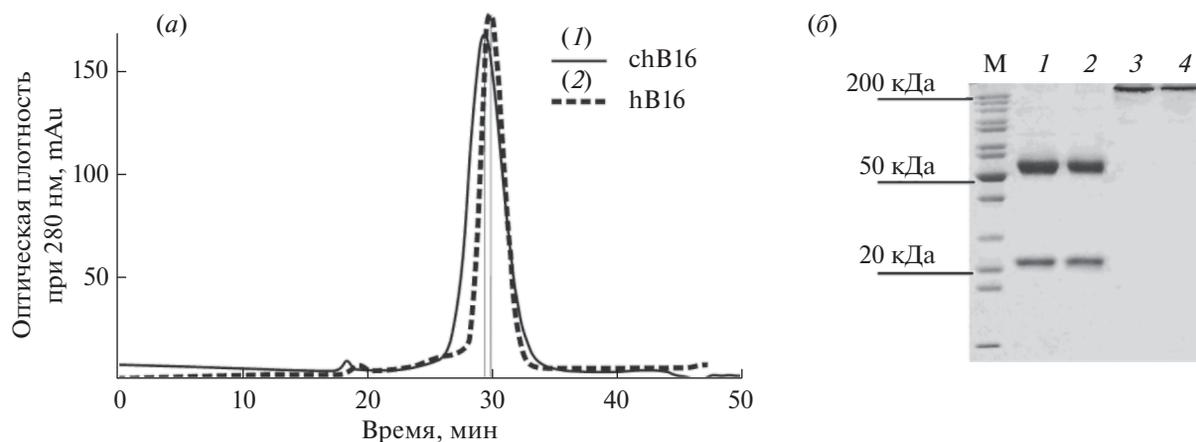


Рис. 3. Оценка чистоты препаратов рекомбинантных антител chB16 и hB16. (а) профиль элюции образцов рекомбинантных антител chB16 и hB16. (1) – препарат химерного антитела chB16, (2) – препарат гуманизированного антитела hB16. (б) электрофореграмма препаратов антител chB16 и hB16 в 10% ДСН-ПААГ (1, 2) – 2 мкг chB16 и hB16 в восстанавливающих условиях, (3, 4) – 0.5 мкг chB16 и hB16 в невосстанавливающих условиях, М – маркер молекулярных масс.

шевой линии человека. Были введены следующие возвратные мутации: в последовательность FR1 тяжелой цепи – K3Q и D60S в последовательности FR3 легкой цепи.

Получение рекомбинантных антител hB16 и chB16

Получение химерных антител является одним из этапов гуманизации. Нуклеотидные последовательности VH и VL мышинового антитела состыковывали с фрагментами, кодирующими Cκ и Cμ1-Cμ3 человека, на 5'-конец последовательностей вводили последовательность Козак, необходимую для трансляции гена, и последовательности лидерных пептидов тяжелой и легкой цепей мышинового антитела B16, необходимых для секреции антитела. Нуклеотидные последовательности VH и VL клонировали в экспрессионный вектор pcDNA 3.4 (Invitrogen, USA) под контроль сильного промотора цитомегаловируса CMV и терминатора гена тимидинкиназы ТК. Таким образом, были получены векторы для экспрессии химерных антител pcDNA3.4-chB16Lc и pcDNA3.4-chB16Hc.

После валидации предложенных аминокислотных последовательностей переменных доменов гуманизированного антитела с помощью методов моделирования и молекулярной динамики, химико-ферментативным способом синтезировали нуклеотидные последовательности VH и VL антитела hB16. Переменные домены в составе плазмид для экспрессии химерного антитела заменили гуманизированными VH/VL и получили экспрессионные плазмиды pcDNA3.4-hB16Lc и pcDNA3.4-hB16Hc.

Экспрессионные векторы использовали для трансфекции суспензионной культуры клеток CHO. Транзиентную культуру клеток культивировали в течение 14 дней, после чего клетки осаждали центрифугированием. Антитела из культуральной жидкости выделяли аффинной хроматографией на колонке HiTrap MabSelect SuRe (GE Life Sciences, США). Полученные белки диализовали против буфера ФБС, стерилизовали фильтрацией с помощью 0.22 мкм фильтра Millex-GV и хранили при 4°C.

Биохимическая и иммунохимическая характеристика рекомбинантных антител chB16 и hB16

Качество выделения образцов антител после аффинной хроматографии оценивали гель-фильтрацией и электрофорезом в полиакриламидном геле. Профили элюции после гель-фильтрации как химерного, так и гуманизированного антитела представлены симметричными монопиками, что свидетельствует об их чистоте и отсутствии детектируемых количеств олигомерных форм (рис. 3а). Анализ препаратов гуманизированного и химерного антител методом ДСН-ПААГ электрофореза в восстанавливающих условиях (5% β-меркаптоэтанол) показал наличие в каждом образце двух полипептидов с молекулярными массами 22.5 и 55 кДа, которые соответствуют полипептидам легкой и тяжелой цепей антител (рис. 3б). В невосстанавливающих условиях для обоих антител можно было наблюдать одну полосу с молекулярной массой, превышающей расчетную. Подобного рода несоответствие расчетной и экспериментально определенной молекулярных масс антител класса

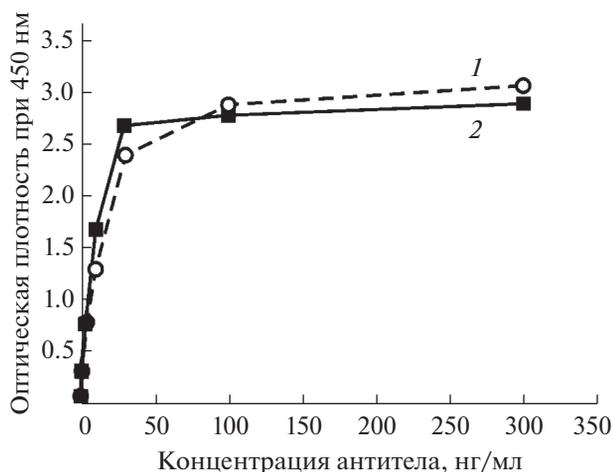


Рис. 4. Непрямой иммуноферментный анализ взаимодействия химерного и гуманизированного антител с интерфероном бета человека. Пунктирная линия 1 – химерное антитело chB16, сплошная линия 2 – гуманизированное антитело hB16.

IgG в 10% ДСН-ПААГ показано и другими исследователями ранее [13, 14].

Способность выделенных антител специфически взаимодействовать с интерфероном-бета проверяли с помощью непрямого ИФА. Было показано, что и химерные и гуманизированные антитела связываются с интерфероном-бета (рис. 4). Определенные значения эффективных концентраций EC_{50} составили 14.3 нг/мл для химерного антитела и 8.7 нг/мл для гуманизированного антитела. Поскольку EC_{50} для гуманизированного антитела оказалось даже меньшим, чем для химерного, то можно говорить об отсутствии потери аффинности антитела в процессе гуманизации.

Также важной характеристикой антител являются значения констант диссоциации комплекса антиген-антитело. Константы диссоциации мышиного, химерного и гуманизированного антител определяли методом конкурентного ИФА по Фриге [15]. Полученные значения K_d составили 2.9×10^{-9} М для мышиного антитела B16, 3.9×10^{-9} М для химерного антитела chB16 и 3.3×10^{-9} М для гуманизированного антитела hB16. Определенные величины констант более достоверно свидетельствуют о том, что в ходе гуманизации аффинность антитела не претерпела существенных изменений, и сродство гуманизированного антитела к интерферону-бета оказалось даже большим, чем у химерного, что говорит о корректности выбранной стратегии гуманизации.

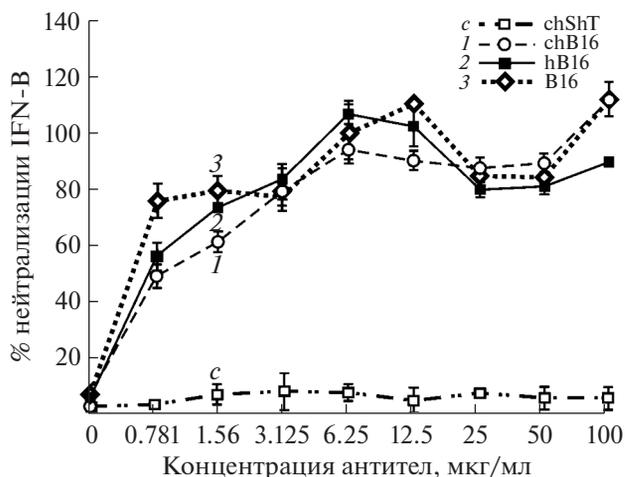


Рис. 5. Интерферон-бета нейтрализующая активность антител. Линия 1 – химерное антитело chB16, линия 2 – гуманизированное антитело hB16, линия 3 – мышиное антитело B16, c – антитело hShT к шигатоксину 1-типа (отрицательный контроль).

Сравнительный анализ нейтрализующей интерферон-бета активности рекомбинантных и мышиных моноклональных антител

Биологическую активность полученных антител определяли в тесте подавления пролиферации. Принцип метода основан на регистрации антипролиферативного действия интерферона-бета по отношению к опухолевым клеткам в присутствии мононуклеаров периферической крови человека (МПК). Ранее было установлено, что среди нескольких опухолевых клеточных линий наибольший эффект интерферон-бета оказывает на клетки аденокарциномы толстой кишки человека HT29 (ATCC® НТВ-38™, США), в связи с чем данная линия была использована в антипролиферативном тесте. Для определения степени нейтрализации интерферона опухолевые клетки инкубировали в присутствии МПК, интерферона-бета и серийных разведений антител. По окончании инкубации уровень пролиферации оценивали по количеству метаболически активных клеток с помощью МТТ-теста [17]. Обнаружено, что все три антитела показали высокую степень нейтрализации интерферона-бета человека (рис. 5). Максимальная степень нейтрализации для всех трех антител достигалась при концентрациях выше 6.25 мкг/мл. И, хотя при концентрациях гуманизированного антитела более 25 мкг/мл степень нейтрализации интерферона оказывалась ниже, чем при добавлении химерного или мышиного антитела, ее значения оказывались высокими и превышали 80%. Таким образом, можно сделать вывод, что гуманизация мышиного антитела B16 не оказала существенного влияния на способность антитела

hV16 нейтрализовать интерферон-бета в используемом в работе тесте.

ВЫВОДЫ

В данной работе описана гуманизация связывающего и нейтрализующего интерферон-бета человека мышинового антитела V16. Гуманизация произведена методом “CDR-графтинга”, в качестве доноров FR-участков выбраны два гена антител зародышевой линии человека IGHV3-23*04 и IGKV1-9*01, найденные в ходе поиска наиболее гомологичных генов тяжелой и легкой цепей антитела V16. Для предотвращения возможной потери аффинности гуманизованного антитела в зонах Вернье были введены возвратные мутации в генах переменных доменов тяжелой цепи S49A, K94R и легкой цепи L41M, L78V. Для гуманизованного и исходного мышинового антитела были получены и сопоставлены модели структур переменных доменов. Замена FR-участков мышинового антитела на участки антитела зародышевой линии человека при введении возвратных мутаций в зонах Вернье не оказала существенного влияния на ход основной цепи углеродного скелета гуманизованного антитела. Расчет молекулярной динамики для начальных моделей показал необходимость введения дополнительных возвратных мутаций, не находящихся в зонах Вернье: K3Q в последовательности переменного домена тяжелой цепи и D60S в последовательности переменного домена легкой цепи. На основании полученных аминокислотных последовательностей были синтезированы нуклеотидные последовательности, кодирующие переменные домены гуманизованного антитела hV16, которые были объединены последовательностями константных доменов антитела человека. Гуманизованное антитело hV16 и химерное антитело chV16 были экспрессированы в транзientной культуре клеток CHO, выделены и очищены методом аффинной хроматографии. Качество полученных препаратов антител изучали методом ДСН-ПААГ электрофореза и гель-фильтрации. Было показано, что полученные образцы антител содержали мономерные формы без примесей других белков. С помощью ИФА оценивали способность выделенных антител связывать интерферон-бета человека. Было найдено, что в ходе гуманизации мышинового антитела V16 его сродство к интерферону-бета не изменилось. Значения EC_{50} составили 14.3 нг/мл для химерного антитела и 8.7 нг/мл для гуманизованного. Полученные методом конкурентного ИФА значения K_d составили 2.9×10^{-9} М для мышинового антитела V16, 3.9×10^{-9} М для химерного антитела и 3.3×10^{-9} М для гуманизованного антитела hV16. Сравнение нейтрализующей способности химерного, мышинового и гу-

манизованного антитела также показало, что гуманизация не оказала существенного влияния на способность антитела нейтрализовать интерферон-бета человека.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование: наноспектрофотометр Implen P300; камера для горизонтального электрофореза 15*20 Sub-Cell GT Cell, камера для вертикального электрофореза Bio-Rad Mini-Protean 3 cell, источник питания PowerPack Basic (Bio-Rad, США); колонка с носителем HiTrap MabSelect Sure объемом 5 мл, хроматограф ActaPure 25, суперпетля объемом 150 мл, колонка Superdex 200 GL объемом 23.5 мл (GE Healthcare Life Sciences).

Реактивы, штаммы бактерий и клеточные линии: питательная среда OptiCHO, раствор пенициллин-стрептомицин-фунгизон, реагент для трансфекции lipofectamine 2000 (Invitrogen, США); планшеты для ИФА Nunc Maxisorp, 96-луночные плоскодонные планшеты для адгезионных культур (Corning Inc., США, PN 3598), реагент для выделения нуклеиновых кислот “TRIzol Reagent” (Thermo Fisher Scientific, США), обратная транскриптаза M-MuLV, эндонуклеазы рестрикции, T4-ДНК-лигаза, маркер молекулярных масс PageRuler Unstained Protein Ladder 10–200 кДа (Thermo Scientific, США); Tween-20; ДНК-полимераза Tersus, ДНК-полимераза Taq, набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid miniprep, набор для выделения нуклеиновых кислот из агарозного геля и реакционных смесей Cleanup mini, вектор pAL-TA, соосаждитель нуклеиновых кислот “satellite red” (Евроген, Россия); DMSO (Sigma); бактоагар, дрожжевой экстракт, триптон (BD, Франция); фосфатно-солевой буфер таблетированный ФБС (10 мМ $Na(H_2PO_4)-Na_2(HPO_4)$, 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, pH 7.2, (Amresco, США); 0.22 мкм фильтры Millex-GV (Millipore, США); нитроцеллюлозная мембрана (Membrane filters cellulose nitrate; pore size 0.45 μ m, Advantec MFS Inc., США), набор белков HMW Gel Filtration Calibration Kit, (Ge Healthcare, США), интерферон-бета человека, гликозилированный (“ООО Фармапарк”, Россия), штамм *E. coli* XL1-Blue (a, b 3 recA1 endA1 gyrA96 thi 1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proABlacIqZ Δ M15 Tn10 (Tetr)]) (Stratagene, США); клеточная линия HT29 (ATCC® HTB-38™, США).

Список олигонуклеотидов для амплификации нуклеотидных последовательностей тяжелой цепи:

VHB16F 5'-AGGGAAGCTAGCGCCACCAT-GAATTCGGGCTCAGCTTGATTTTC-3'

VHB16R 5'-AGACCGATGGGCCCTTCGTGCTGGCTGCAGAGACAGTGACCAGAGTCC-3'

Список олигонуклеотидов для амплификации нуклеотидных последовательностей легкой цепи:

VLB16F 5'-AGGGAAGCTAGCGCCACCATG-GAGACACATTCTCAGGTCTTTGTATAC-3'

VLB16SoeR – 5'-CAGCCACAGTCCGTTTTATTTC-CAGCTTGGTCC-3'

hVLB16SoeR – 5'-GCAGCCACAGTCCGTTTGAT-3'

hVNB16R – 5'-AGACCGATGGGCCCTTCGT-GCTGGCAGAGGACACTGTACAAA-3'.

Получение нуклеотидных последовательностей переменных доменов мышиногo антитела V16 против IFN- β

Из клеток гибридомы V16 выделяли тотальную РНК с помощью реактива TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, США) из 5×10^5 клеток согласно протоколу производителя [18]. Качество полученной РНК оценивали по соотношению коэффициентов поглощения A_{260}/A_{280} , принимая допустимыми значения 1.95–2.0, а также с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Обратную транскрипцию осуществляли с помощью фермента M-MuLV RT (Thermo Fisher Scientific, США) с Oligo(dT)₁₈ праймером согласно протоколу производителя. Для амплификации генов переменных доменов методом ПЦР использовали полимеразу Tarsus и праймеры, специфичные к последовательностям CH1 IgG1 и S κ . Температуру отжига олигонуклеотидов устанавливали 60°C, время элонгации – 45 с. Фрагменты размером 321 и 342 п. о. выделяли из 1% агарозного геля и лигировали в pAL2-T вектор при 12°C в течение ночи. ДНК пересаждали изопропанолом, растворяли в воде и использовали для электропорации электрокомпетентных клеток *E. coli* XL1-Blue. Отбор клонов проводили с использованием бело-голубой селекции и анализа колоний с помощью ПЦР с праймерами M13. Отобранные колонии культивировали в течение ночи, культуру клеток осаждали центрифугированием и выделяли плазмидную ДНК с помощью набора Plasmid Mini-prep. Нуклеотидные последовательности переменных доменов определяли секвенированием по методу Сэнгера (Евроген).

Получение экспрессионных плазмид для продукции рекомбинантных антител chV16 и hV16 в культуре эукариотических клеток CHO

Нуклеотидную последовательность VH мышиногo антитела V16 амплифицировали с помощью ПЦР с праймерами VNB16F и VNB16R, содержащими участки узнавания эндонуклеаз рестрикции NheI и Bsp120I. Продукты реакции разделяли в 1% агарозном геле при напряжении поля 5 В/см, получали фрагмент размером 450 п. о., который обрабатывали соответствующими эндонуклеазами рестрикции и клонировали в подготовленный

экспрессионный вектор pcDNA3.4-Hc, содержащий нуклеотидные последовательности CH1-CH3 антитела изотипа IgG1 человека. Последовательность VL состыковали с помощью SOE-PCR с последовательностью S κ человека. Для наработки фрагмента, кодирующего ген переменного домена, использовали олигонуклеотиды VLB16F и VLB16SoeR. Амплификацию осуществляли с помощью программы, содержащей два типа циклов. При выполнении циклов типа № 1 отжигали друг на друга фрагменты, кодирующие переменный и константный домены, и объединяли их в ходе элонгации. Количество циклов реакции устанавливали 5, температуру отжига – 52°C, время элонгации – 1 мин. В ходе циклов типа № 2 амплифицировали фрагменты, полученные на предыдущем этапе. Реакцию проводили с праймерами, количество циклов реакции – 15, температура отжига – 62°C, время элонгации – 1 мин. В ходе реакции ген химерной легкой цепи был снабжен лидерным пептидом и участками узнавания эндонуклеаз рестрикции NheI и XhoI. Из реакционной смеси получали фрагмент размером 820 п. о., который клонировали в вектор pcDNA3.4. Последовательности гуманизированных переменных доменов антитела hV16 синтезировали химико-ферментативным способом (Евроген). Получение экспрессионных плазмид, содержащих гены антитела hV16, проводилось аналогично. Для амплификации фрагментов, кодирующих гуманизированные переменные домены были использованы олигонуклеотиды VLB16F, hVLB16SoeR, VNB16F и hVNB16R.

Производство рекомбинантных антител chV16 и hV16

Рекомбинантные антитела chV16 и hV16 получали транзientной экспрессией в клетках CHO, культивирование которых проводили в колбах Эрленмейера в 30 мл среды CD DG44 (Invitrogen, США) при 37°C, 8% CO₂, при скорости вращения 135 об./мин в термостатируемом CO₂-инкубаторе в течение 14 суток. Трансфекцию клеток осуществляли с помощью трансфектагента Lipofectamine 2000 согласно протоколу производителя при начальной клеточной плотности 3×10^5 клеток/мл. Для трансфекции использовали 16.6 мкг плазмидной ДНК для экспрессии гена легкой цепи антитела, и 8.3 мкг плазмидной ДНК для экспрессии гена тяжелой цепи антитела. После культивации клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 700 g, культуральную жидкость собирали и центрифугировали при 3000 g в течение 30 мин при 4°C. К супернатанту добавляли 0.1 объема 10-кратного буфера ФБС, азид натрия и PMSF до конечных концентраций 7.5 и 0.7–1.4 мМ соответственно. Из осветленной культу-

ральной жидкости выделяли антитела аффинной хроматографией.

Аффинная хроматография антител

Антитела выделяли аффинной хроматографией на колонке объемом 5 мл, содержащей носитель HiTrap MabSelect SuRe. Колонку уравнивали 5 объемами буфера Трис-НСl (20 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl, pH 7.2) и наносили культуральную жидкость со скоростью 2–3 мл/мин при давлении не более 0.5 МПа. После этого колонку промывали 5 объемами буфера Трис-НСl (20 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl, pH 7.2). Антитела элюировали цитратным буфером (20 мМ лимонная кислота, 200 мМ NaCl, pH 3.0). Фракцию, содержащую искомый продукт, нейтрализовали добавлением 0.1 объема буфера для нейтрализации (1 М Tris-НСl, pH 8.0). Детекцию белков в ходе хроматографии осуществляли по поглощению при длине волны 280 нм. Элюат диализовали ФБС, дважды меняя раствор, и стерилизовали фильтрацией через фильтры Millex-GV, 0.22 мкм, полученные препараты хранили при температуре 4°C.

Аналитические методы

Гель-фильтрацию выделенных антител проводили на колонке Superdex 200 GL (10/300). Образцы диализовали против трис-буфера (0.1 М Трис-НСl, 0.15 М NaCl, pH 7.8) и наносили на колонку в количестве 80 мкг в объеме 50–200 мкл. Разделение белков осуществляли в Трис-буфере с добавлением 5% изопропанола, со скоростью потока 0.4 мл/мин. Молекулярную массу антител определяли с использованием набора калибровочных белков “HMW Gel Filtration Calibration Kit” согласно инструкции производителя [16]. Чистоту препарата и его полипептидный состав оценивали электрофорезом в 10% ДСН-ПААГ, в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях [19].

Иммунохимические методы

Непрямой ИФА. В лунки планшета наносили 100 мкл раствора ФБС, содержащего 250 нг интерферона-бета человека, и инкубировали в течение ночи при 4°C. В первую лунку планшета внесли 100 нг антитела, далее делали трехкратные разведения 6 раз. Разведения антител осуществляли в трех повторах. Лунки планшета блокировали 1% раствором БСА в ФБС при 37°C в течение часа и промывали 5 раз ФБСТ (с добавлением 0.05% Tween-20), после чего добавляли раствор, содержащий конъюгат антител против IgG человека. Планшет инкубировали при 37°C в течение часа и промывали 9 раз ФБСТ, далее в лунки добавляли раствор субстрата — тетраметилбензидина, ре-

акцию останавливали, добавляя 100 мкл 0.5 М фосфорной кислоты. Оптическое поглощение измеряли при длине волны 450 нм на планшетном спектрофотометре Microplate Reader 680 (BioRad, США).

Определение интерферон-бета нейтрализующей активности антител

Для исследования нейтрализующей активности антител против интерферона-бета готовили серийные разведения гуманизированного, химерного и мышинового антител, а также химерного антитела против шига-токсинов первого типа в качестве отрицательного контроля, в полной ростовой среде с 2% телячьей сывороткой. Опухолевые клетки HT29 культивировали в смеси с МПК в присутствии ИФН-бета и антител в различных концентрациях. В лунки 96-луночного планшета для адгезионных культур вносили среду DMEM, содержащую 2% сыворотку, 10 пг интерферона-бета, 5 тыс. клеток HT29 и 50 тыс. клеток МПК, а также разведенные антитела в конечных концентрациях от 100 до 0.781 мкг/мл, с уменьшением концентрации антитела в каждой следующей лунке в 2 раза. Суммарный объем суспензии в каждой лунке составлял 100 мкл, каждое разведение осуществляли в четырех повторениях. Суспензии инкубировали в течение 4 суток при 37°C в атмосфере 5% CO₂. В лунки добавляли раствор МТТ до конечной концентрации 0.5% и инкубировали в течение 4 часов при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Планшеты центрифугировали, супернатанты удаляли, в лунки добавляли 100 мкл ДМСО, инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. После этого измеряли оптическое поглощение при длине волны 560 нм и определяли среднее значение оптической плотности (ОП_{*i*}) для *i*-го разведения антител по трем повторам. Также определяли среднее значение оптической плотности в лунках без интерферона-бета (ОП_{max}) и в лунках с интерфероном без антител (ОП₀). Процент нейтрализации для каждой концентрации антител вычисляли по формуле:

$$\text{процент нейтрализации (\%)} = \frac{\text{ОП}_i - \text{ОП}_0}{\text{ОП}_{\text{max}} - \text{ОП}_0} \times 100.$$

На основании полученных значений процента нейтрализации и концентрации антитела строили графики зависимости процента нейтрализации от концентрации антител.

Моделирование структуры вариабельных доменов антител

Для создания моделей пространственной структуры антител был выбран метод моделирования

на основании гомологии, реализованный в веб-сервисе Rosetta Antibody (<http://antibody.graylab.jhu.edu/antibody>) [20]. Для проведения дополнительной оптимизации, направленной на упорядочивание взаимодействия аминокислотных остатков как между собой (образование водородных связей, солевых мостиков и т.п.), так и с окружающим растворителем был проведен расчет молекулярной динамики начальных моделей в водном растворе при температуре 300 К и физиологической концентрации NaCl в течение 10 нс. Расчет выполняли с использованием программы Gromacs [21] с использованием силового поля charmm36. Анализ траектории МД показал, что модели принимают свои равновесные конформации уже через 1 нс. Полученные МД траектории были подвергнуты кластерному анализу с целью выявления наиболее представительных конформаций для каждой из моделей. Визуализация траекторий и структур была выполнена с помощью программы VMD [22]. Полученные конформации антител В16 и hВ16 были сопоставлены визуально с использованием молекулярного редактора Maestro.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Мононуклеары периферической крови были получены из крови здоровых доноров. Все доноры подписали добровольное информированное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hwang W.Y., Foote J. // *Methods*. 2005. V. 36. P. 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.01.001>
- Scott A.M., Lee F., Hopkins W., Cebon J.S., Wheatley J.M., Liu Z. // *JCO*. 2001. V. 19. P. 3976–3987. <https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.19.3976>
- Buist M.R., Kenemans P., van Kamp G.J., Haisma H.J. // *CII*. 1995. V. 40. P. 24–30. <https://doi.org/10.1007/BF01517232>
- Roque-Navarro L., Mateo C., Lombardero J., Mustelie G., Fernández A., Sosa S., Morrison S.L., Pérez R. // *Hybridoma and Hybridomics*. 2004. V. 22. P. 245–257. <https://doi.org/10.1089/15368590322328974>
- Richards J., Auger J., Peace D., Gale D., Michel J., Koons A., Haverty T., Zivin R., Jolliffe L., Bluestone J.A. // *Cancer Research*. 1999. V. 59. P. 2096–2101.
- Almagro J., Franson J. // *Bioscience*. 2008. V. 13. P. 1619–1633.
- Hale G., Phillips M. // *Biochemical Society Transactions*. 1995. V. 23. P. 1057–1063. <https://doi.org/10.1042/bst0231057>
- Safdari Y., Farajnia S., Asgharzadeh M., Khalili M. // *BGER*. 2013. V. 29. P. 175–186. <https://doi.org/10.1080/02648725.2013.801235>
- Makabe K., Nakanishi N., Tsumoto K., Tanaka Y., Kon-do H., Umetsu M., Sone Y., Asano R., Kumagai I. // *JBC*. 2008. V. 283. P. 1156–1166. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706190200>
- Wedemayer G.J., Patten P.A., Wang L.H., Schultz P.G., Stevens R.C. // *Science*. 1997. V. 276. P. 1665–1669.
- Zimmermann J., Oakman E.L., Thorpe I.F., Shi X., Abbyad P., Brooks C.L., Boxer S.G., Romesberg F.E. // *PNAS*. 2006. V. 103. P. 13722–13727.
- Kabat E.A. // *Sequences of Immunological Interest*, 5 ed. Public Health Service, NIH, Bethesda, Md, USA, 1991.
- Ильина Е.Н., Солопова О.Н., Балабашин Д.С., Ларина М.В., Алиев Т.К., Гребеникова Т.В., Лосич М.А., Зайкова О.Н., Свешников П.Г., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. // *Биоорг. химия*. 2019. Т. 45. С. 58–68. [Irina E.N., Solopova O.N., Balabashin D.S., Larina M.V., Aliev T.K., Grebennikova T.V., Losich M.A., Zaykova O.N., Svshnikov P.G., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. // *Rus. J. Bioorg. Chem*. 2019. V. 45. P. 59–68.] <https://doi.org/10.1134/S0132342319010081>
- Rizner T.L. // *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 2014. V. 42. P. 152–159. <https://doi.org/10.1002/bmb.20764>
- Friguet B., Chaffotte A.F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M.E. // *J. Immunol. Meth*. 1985. V. 77. P. 305–319. <https://cdn.gelifesciences.com/dmm3bwsv3/Asset-Stream.aspx?mediaformatid=10061&destination-id=10016&assetid=14782>.
- Supino R. // *In Vitro Toxicity Testing Protocols*. Humana Press, 1995. P. 137–149.
- Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15596026#/15596026>.
- Weitzner B.D., Jeliakov J.R., Lyskov S., Marze N., Kuroda D., Frick R., Bryfogle A.A., Biswas N., Gray J.J. // *Nature Protocols*. 2017. V. 12. P. 401–416. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.180>
- Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B., Lindahl E. // *SoftwareX*. 2015. V. 1–2. P. 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
- Humphrey W., Dalke A., Schulten K. // *Journal of Molecular Graphics*. 1996. V. 14. P. 3338. VMD – Visual Molecular Dynamics.

Generation and Characterization of Human Interferon-Beta Neutralizing Humanized Antibody

V. S. Rybchenko^{*, #}, A. A. Panina^{**}, N. V. Novoseletsky^{*}, D. S. Balabashin^{**},
S. A. Yakimov^{**}, O. N. Solopova^{***, *****}, P. G. Sveshnikov^{***},
T. K. Aliev^{***}, D. A. Dolgikh^{*, **}, and M. P. Kirpichnikov^{*, **}

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

^{*}Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1/12, Moscow, 119192 Russia

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

^{***}Russian Research Center for Molecular Diagnostics and Therapy, Simpheropolsky bulv. 8, Moscow, 117638 Russia

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

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

The objective of this work is humanization of antibodies for the development of novel therapeutic agents with low immunogenicity. In present work we described the humanization of murine antibody B16 which binds and neutralizes human interferon-beta using CDR-grafting method. Based on amino acid sequences of humanized and murine antibodies we constructed models of variable domains, analysed and compared them. The genes of humanized antibody hB16 and chimeric antibody chB16 were expressed in transient CHO cells. Antibodies were recovered from conditioned media, purified using affinity chromatography, and their properties were studied by biochemical and immunochemical methods. It was proven that humanized antibody hB16 poses the same properties as murine mAb B16. This humanized antibody hB16 will be used in further work in order to obtain therapeutic immune complex, composed of human interferon-beta and bispecific antibody which binds interferon-beta and ErbB2 receptor.

Keywords: humanized antibodies, chimeric antibodies, antibody structure modelling, CHO, interferon-beta



МЕХАНИЗМ ИНГИБИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ АНИОННЫХ ПОЛИАМИДОАМИН ДЕНДРИМЕРОВ ГЕНЕРАЦИИ 1.5–3.5 НА АКТИВНОСТЬ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

© 2020 г. Р. Б. Айсина*., Л. И. Мухаметова*, Е. М. Иванова*

*ФГБОУ МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Россия, 119992 Москва, Ленинские горы, 1/3

Поступила в редакцию 26.02.2020 г.

После доработки 26.03.2020 г.

Принята к публикации 28.03.2020 г.

Полиамидоамин (РАМАМ) дендримеры находят применение в медицине для системной доставки лекарств. Оценка безопасности биоматериалов, которые будут контактировать с компонентами крови и тканями, особенно важна. Например, РАМАМ-NH₂ дендримеры G4–G7 вызывают агрегацию тромбоцитов и фибриногена. Мы изучили влияние РАМАМ-COOH дендримеров G1.5–G3.5 на ключевые компоненты системы фибринолиза. Дендримеры не влияли на активность плазмينا, но амидолитические активности тканевого активатора плазминогена (tPA) и урокиназы (uPA) заметно снижались с ростом генерации и концентрации дендримера. Интенсивность пика при 340 нм флуоресцентного спектра Glu-плазминогена в отсутствие и присутствии 0.15 М NaCl снижалась с увеличением концентрации дендримеров, что указывает на изменения в микроокружении остатков Trp и молекулярной конформации открытой и закрытой форм Glu-плазминогена. Из сравнения констант тушения флуоресценции сделан вывод, что анионный дендример и хлорид ион одновременно связываются с плазминогеном и, что каждый из этих лигандов проявляет свои независимые эффекты через отдельные сайты связывания. С увеличением концентрации и генерации дендримера скорость tPA- и uPA-инициированной активации Glu-плазминогена в буфере, pH 7.4 резко снижалась, вероятно, из-за образования комплексов дендример * плазминоген с возрастающим содержанием дендримера, в результате чего расщепляемая активаторами связь плазминогена становится менее доступной. Скорость tPA- и uPA-индуцированного лизиса плазменного сгустка в плазме снижалась умеренно с ростом концентрации дендримера, возможно, из-за снижения эффекта дендримера на фибринсвязанный плазминоген. Таким образом, механизм ингибирующего действия анионных РАМАМ дендримеров на активацию и тромболитизис, индуцированные tPA и uPA, связан с заметной инактивацией активаторов и значительным изменением конформации плазминогена. В циркуляции, РАМАМ-COOH дендримеры могут влиять на другие физиологические и патологические процессы, в которых система плазминоген/плазмин играет важную роль.

Ключевые слова: плазминоген, активаторы плазминогена, активация, ингибирование, дендримеры

DOI: 10.31857/S0132342320050024

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время возрастающий интерес в области наномедицины вызывают дендримеры – новый тип монодисперсных полимеров с сильно разветвленной трехмерной глобулярной архитектурой и функциональными группами на поверхности. Наиболее изученными на сегодняшний день являются полиамидоамин (РАМАМ) дендримеры,

которые содержат этилендиаминное ядро, отдельные ветви, сконструированные из метилакрилата и этилендиамина, функциональные терминальные группы (–NH₂, –ОН, или –COOH) на поверхности и относительно гидрофобные полости. С ростом генерации (G) дендримера, увеличивается количество терминальных ветвей и функциональных групп. Их размеры в зависимости от поколения колеблются от 1.1 нм (для G1) до 12.4 нм (для G10) [1]. РАМАМ дендримеры хорошо растворимы в полярных растворителях, не иммуногенны [2] и способны проникать через гематоэнцефалический барьер [3]. Показано, что дендримеры позволяют изменять характер фармакокинетики лекарственного препарата путем его инкапсулирования внутрь или ковалентной или нековалентной сорб-

Сокращения: FM – фибрин мономер; Glu-Pg и Lys-Pg – Glu- и Lys-формы плазминогена; KR – крингл-домен; LBS – лизинсвязывающий участок; РАМАМ G1.5, G2.5 и G3.5 – полиамидоамин дендримеры генерации 1.5, 2.5 и 3.5; Раp – N-терминальный пептид; Pg – плазминоген; tPA – тканевый активатор плазминогена; uPA – двухцепочечная урокиназа.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 939-50-83; +7 (985) 981-34-07; эл. почта: aisina2004@mail.ru).

ции непосредственно на поверхности молекулы дендримера [4, 5]. Мультивалентные дендримеры, способные присоединять значительное количество лиганда, являются хорошей альтернативой традиционным полимерам в качестве систем доставки лекарственных препаратов [6, 7]. Благодаря уникальной структуре и свойствам, различные производные РАМАМ дендримера имеют множество многообещающих биомедицинских применений, особенно при системном введении для доставки лекарств, контрастных веществ, генов, антител и других биомакромолекул [8–12].

Использование РАМАМ дендримеров в качестве носителей позволяет уменьшить клиренс из кровотока, продлить время системной циркуляции и увеличить доставку лекарственного средства к месту назначения. С увеличением времени циркуляции в крови увеличивается продолжительность контакта дендримеров с белками, а также с клетками крови и эндотелиальными клетками кровеносных сосудов. С этой точки зрения, важным аспектом является оценка безопасности биоматериалов, которые будут контактировать с компонентами крови и тканями. Большинство публикаций последних лет было сфокусировано на исследовании влияния РАМАМ дендримеров на структуру и функцию компонентов системы коагуляции. Выявлено, что катионные РАМАМ дендримеры с концевыми аминогруппами вызывают более значительный гемолиз эритроцитов *in vitro* и *in vivo*, чем дендримеры с карбоксильными и гидроксильными концевыми группами [13, 14]. Цитотоксичность катионных РАМАМ дендримеров повышается с увеличением концентрации и генерации дендримера, а частичная модификация поверхностных NH_2 -групп полиэтиленгликолем снижает их цитотоксичность [15, 16]. Показано, что РАМАМ- NH_2 дендример G7 нарушает ключевые функции тромбоцитов, вызывает агрегацию фибриногена и свертывание крови [17, 18]. Только крупные катионные дендримеры G4–G6, но не анионные, нейтральные или небольшие катионные дендримеры, индуцируют агрегацию тромбоцитов человека [19]. Изучено влияние дендримеров G3–G5 на активацию и реактивность тромбоцитов крови и на ключевые параметры коагуляции плазмы [20–22]. Влияние РАМАМ дендримеров на компоненты системы фибринолиза не было изучено.

Мы недавно сообщили результаты сравнения эффектов РАМАМ- NH_2 и РАМАМ- COOH дендримеров низких поколений на различные гемостатические параметры [23]. Результаты показали, что даже небольшие катионные РАМАМ дендримеры G2–G3, особенно при использовании в высоких концентрациях, ведут себя очень похоже на прокоагулянтный РАМАМ дендример G7 [17]. Кроме того, мы впервые обнаружили, что анион-

ные РАМАМ дендримеры G1.5–G3.5 влияют на структуру и активацию плазминогена. Плазминоген – предшественник ключевого фермента системы фибринолиза плазмина (КФ 3.4.21.7), непосредственно растворяющего фибрин сгустка, циркулирует в крови в концентрации ~2 мкМ. Под действием активаторов плазминогена тканевого (tPA, КФ 3.4.21.68) и урокиназного типа (uPA, урокиназа, КФ 3.4.21.31), специфически расщепляющих активационную связь Arg561–Val562 в одноцепочечной молекуле плазминогена, образуется двухцепочечный фермент плазмин. Ранее было показано, что анионные РАМАМ дендримеры являются перспективными в качестве наноносителей стрептокиназы (активатора плазминогена бактериального происхождения) и других биомакромолекул, поскольку белки могут образовывать нековалентные и ковалентные комплексы с концевыми карбоксильными группами дендримеров без значительной потери их биофункций [12, 24–27]. Следовательно, для биомедицинских внутривенных применений биобезопасность анионных РАМАМ дендримеров также должна быть оценена.

Данная работа посвящена детальному изучению влияния анионных РАМАМ дендримеров низкой генерации (G1.5–G3.5) на активность системы фибринолиза. С этой целью, изучены *in vitro* концентрационные эффекты указанных дендримеров на собственные амидолитические активности ключевых ферментов этой системы – плазмина, tPA и uPA, на конформацию нативного Glu-плазминогена (а также его Lys-формы) с использованием флуоресцентной спектроскопии, на скорость активации обеих форм плазминогена и скорость лизиса плазменных сгустков, индуцированных tPA и uPA. На основании полученных данных будет выяснен механизм ингибирующего действия анионных дендримеров на активность фибринолитической системы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В этом исследовании были использованы РАМАМ дендримеры половинной генерации G1.5, G2.5 и G3.5, которые содержат 16, 32 и 64 периферических карбоксильных групп [24] и имеют диаметры 2.6, 3.6 и 4.4 нм соответственно [28]. Как упоминалось выше, анионные, нейтральные и катионные РАМАМ дендримеры низких генераций (<G4) не индуцируют агрегацию тромбоцитов человека в плазме *in vitro* [19].

Мы изучили гемолиз эритроцитов человека, индуцированный дендримерами G1.5–G3.5. Для оценки гемолитического уровня, были использованы высокие концентрации указанных дендримеров, принимая во внимание, что количество заряженных поверхностных групп у них значительно меньше, чем у дендримеров более высоких гене-

раций ($G > 4$). Степень гемолиза эритроцитов в присутствии даже 600 мкМ концентрации исследованных дендримеров, составляла всего около 5–8% по сравнению с полным гемолизом, вызываемым 1%-ным Тритон X-100 (данные не показаны). Следовательно, концентрации ПАМAM дендримеров G1.5–G3.5 ниже 600 мкМ (<8 мг/мл для самого большого G3.5) не являются цитотоксичными. Эти результаты подтверждают, что дендримеры с концевыми отрицательно заряженными группами имеют низкий гемолитический уровень [13, 14].

В экспериментах по выявлению возможных отрицательных эффектов на активность компонентов системы фибринолиза концентрации ПАМAM-СООН дендримеров G1.5–G3.5, имеющих меньшую плотность поверхностных зарядов по сравнению с дендримерами высоких генераций, варьировали в интервале 0–300 мкМ.

Влияние анионных дендримеров на активность ферментов

Амидолитические активности плазима, tPA и uPA были измерены по начальным скоростям гидролиза их специфических хромогенных субстратов HCO-Ala-Phe-Lys-pNA (AFK-pNA), H-D-Phe-Pro-Arg-pNA (S-2288) и p-Glp-Gly-Arg (S-2444), соответственно. ПАМAM дендримеры G1.5–G3.5 вплоть до 300 мкМ концентрации практически не влияли на активность фермента плазима, в то время как вызывали заметное ингибирование амидолитических активностей uPA и tPA. Ингибирующий эффект анионных дендримеров на собственную активность обоих активаторов пламиногена усиливался с увеличением плотности поверхностного заряда и концентрации дендримера (табл. 1). Наиболее сильное ингибирование активности двух ферментов вызывал дендример G3.5, в то время как дендример G1.5 оказывал слабое ингибирующее действие лишь на активность uPA при концентрациях выше 200 мкМ.

Более выраженное ингибирование дендримерами амидолитической активности uPA позволило определить константы ингибирования (K_i) активности этого фермента с использованием высоких концентраций дендримеров. Значения констант ингибирования активности uPA дендримерами G1.5, G2.5 и G3.5 найдены равными: 2.30 ± 0.03 , 0.56 ± 0.04 и 0.21 ± 0.03 мМ соответственно. Анализ зависимостей Лайнуивера-Берка показал, что ПАМAM-СООН G1.5–G3.5 дендримеры являются слабыми неконкурентными ингибиторами uPA, т.е. они взаимодействуют не с активным центром uPA, а с другими участками фермента. Полученные результаты по ингибированию амидолитических активностей uPA и tPA предполагают, что связывание поливалентных ПАМAM-СООН дендримеров с доступными положительно заряженными центрами этих ферментов вызывает некоторые на-

Таблица 1. Влияние концентрации и генерации ПАМAM-СООН дендримеров на амидолитическую активность uPA (20 нМ), и tPA (20 нМ) (0.1 М PBS буфер, pH 7.4, 25°C), $p < 0.001$

Концентрация дендримера, мкМ	Амидолитическая активность, %					
	tPA			uPA		
	G1.5	G2.5	G3.5	G1.5	G2.5	G3.5
0	100	100	100	100	100	100
95	101	95	91	99	95	90
190	100	93	88	92	88	82
300	99	91	87	80	75	70

рушения конформации белков, которые влияют на их активные центры, приводящие к снижению ферментативной активности. Тем не менее, снижение собственных амидолитических активностей uPA и tPA на 13 и 30% соответственно, в присутствии 300 мкМ концентрации G3.5 означает, что эти ферменты сохраняют высокую способность расщеплять их белковый субстрат пламиноген.

Влияние дендримеров на конформацию пламиногена

Нативный Glu-пламиноген (Glu-Pg, 93 кДа) – одноцепочечный гликопротеин, который содержит N-терминальный домен (Pap), пять гомологичных крингл домена (KR1–KR5), содержащие лизинсвязывающие центры (LBS), и серин-протеазный (SP) домен. В циркуляции он принимает закрытую плотную (Т) конформацию, устойчивую к активации, т.к. петля, содержащая расщепляемую активаторами пламиногена связь Arg561–Val562, недоступна. Компактная Т-конформация Glu-пламиногена поддерживается ключевыми междоменными взаимодействиями Pap/LBS KR-5 и Pap/LBS KR-4 [29–31]. В его кристаллической структуре обнаружены четыре хлорид иона: два Cl⁻ находятся на границах раздела KR-4/Pap и KR-2/SP, а два других Cl⁻ связываются с доменом KR-2 и SP соответственно. Интактный Glu-пламиноген в отсутствие Cl⁻ принимает высоко активированную открытую R-конформацию [32]. Только LBS KR1 является незащищенным в закрытой молекуле и, вероятно, опосредует начальное связывание профермента с мишенями [29]. При удалении Pap домена пламиноген во время пре-активации Glu-пламиногена образуется Lys-пламиноген (85 кДа, Lys-Pg), который имеет открытую R-конформацию. Существуют различия в пространственных взаимосвязях отдельных доменов между Т- и R-формами Glu-пламиногена. Сами домены конформационно не изменяются, но их взаимодействие при связывании небольших лигандов

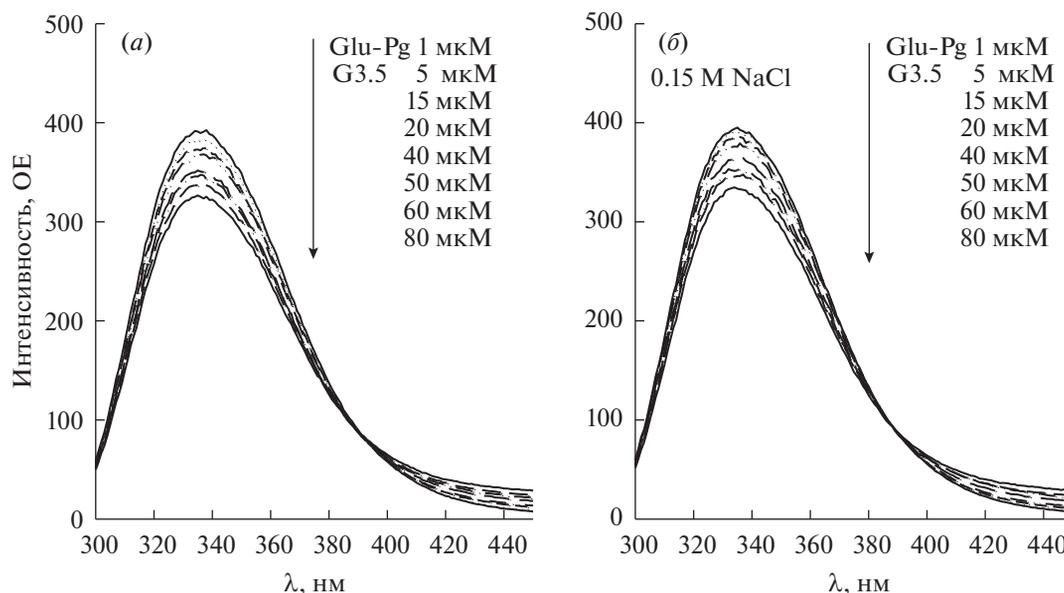


Рис. 1. Влияние РАМАМ дендримера G3.5 на флуоресцентный спектр 1 мкМ Glu-плазминогена в отсутствие (а) и в присутствии 0.15 М NaCl (б) в 10 мМ фосфатном буфере (рН 7.4; 25°C) (возбуждение при 280 нм). $p > 0.001$.

может изменяться, что существенно влияет на общую конформацию белка.

Конформация плазминогена важна для реализации его биологической функции и она чувствительна к окружающей среде. Мы использовали метод флуоресцентной спектроскопии для регистрации изменений конформации Glu-плазминогена при комплексообразовании с анионными дендримерами. Влияние различных концентраций G3.5 РАМАМ дендримера, как представителя трех анионных дендримеров, на спектр флуоресценции Glu-плазминогена в отсутствие (а) и в присутствии хлорид иона (б) показано на рис. 1. Как видно, пики флуоресценции при 340 нм равномерно уменьшаются по интенсивности, но не сдвигаются с увеличением концентрации дендримера. Пики при 340 нм представляют собой спектры флуоресценции Тр-остатков Glu-плазминогена, возбужденного при 280 нм. Подобные, но немного меньшие изменения спектра флуоресценции Glu-плазминогена наблюдались и в присутствии дендримеров G1.5 и G2.5 (данные не представлены). Снижение интенсивности флуоресценции Glu-плазминогена в присутствии возрастающих концентраций дендримера G3.5 и G2.5 были проанализированы с использованием уравнения Штерна–Фольмера, описывающего процесс тушения [33]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Q], \quad (1)$$

где F_0 и F – флуоресценция белка без и с дендримером, соответственно, K_{SV} – константа тушения Штерна–Фольмера и $[Q]$ – концентрация дендримера.

Зависимости Штерна–Фольмера и вычисленные константы тушения флуоресценции Glu-плазминогена дендримерами G2.5 и G3.5 в отсутствие и в присутствии 0.15 М NaCl приведены на рис. 2 и табл. 2. Из результатов следует, что анионные дендримеры образуют комплексы как с R-, так и с T-формой Glu-плазминогена, что приводит к изменениям в микроокружении остатков Тр и молекулярной конформации обеих форм белка. При этом, константа тушения дендримерами R-формы Glu-плазминогена была почти в 2 раза выше, чем его T-формы.

В связи с этим мы изучили влияние этих дендримеров на флуоресцентный спектр Lys-плазминогена, который не содержит N-терминальный Пар домен. Поэтому в Lys-плазминогене, в отличие от Glu-плазминогена, отсутствуют междоменные ионные взаимодействия Пар/LBS KR-5 и Пар/LBS KR-4 и он имеет открытую R-конформацию независимо от присутствия хлорид иона [29, 30]. Рис. 3 показывает влияние дендримера G3.5 на флуоресцентный спектр Lys-плазминогена в отсутствие (а) и присутствии 0.15 М NaCl (б). Как видно, анионный дендример G3.5 образует комплекс и с Lys-плазминогеном и снижает интенсивность его флуоресценции. Зависимости Штерна–Фольмера и вычисленные константы тушения флуоресценции Lys-плазминогена дендримерами G2.5 и G3.5 в отсутствие и в присутствии 0.15 М NaCl приведены на рис. 4 и табл. 2.

Сравнительный анализ констант тушения (K_{SV}) разных форм плазминогена (табл. 2) показывает, что анионные дендримеры G2.5 и G3.5 связываются с Glu-плазминогеном и Lys-плазминогеном

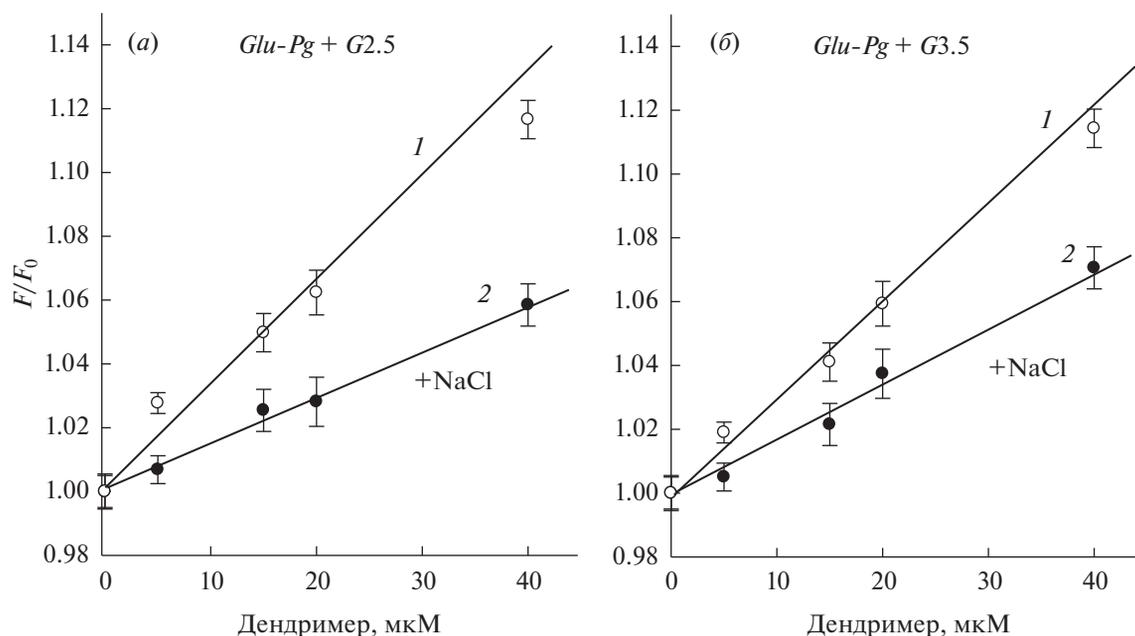


Рис. 2. Зависимости Штерна–Фольмера для тушения флуоресценции Glu-плазминогена ПАМAM дендримерами G2.5 (а) и G3.5 (б) в отсутствие (1) и присутствии 0.15 M NaCl (2). $p > 0.001$.

как в отсутствие, так и в присутствии хлорид иона, что приводит к изменению в микроокружении остатков Trp и молекулярной конформации как закрытой, так и открытой форм зимогена. Наблюдаемое на рис. 1 и 3 уменьшение интенсивности флуоресценции Glu-плазминогена и Lys-плазминогена при связывании дендримера G3.5 аналогично описанному ранее эффекту хлорид иона на флуоресценцию Glu-плазминогена [34, 35]. Известно, что хлорид ион, который поддерживает ключевые взаимодействия Par домена с KR4 и KR5, отвечает за R → T-переход конформации Glu-плазминогена. Однако дендримеры G2.5 и G3.5 изменяли конформацию Glu-плазминогена и в присутствии хлорид иона, т.е. когда он уже имеет T-форму (табл. 2). Кроме того, дендримеры изменяли конформацию и Lys-плазминогена, который имеет R-конформацию и не может трансформироваться в T-форму из-за отсутствия Par домена. Полученные данные указывают, что анионный денд-

ример и хлорид ион одновременно связываются с плазминогеном и, что каждый из этих лигандов проявляет свои эффекты через отдельные сайты связывания, т.е. независимо друг от друга. Экспонированные аминокислотные группы на поверхности обоих плазминогенов могут быть сайтами связывания анионного дендримера.

Более сильное тушение флуоресценции Glu-плазминогена анионными дендримерами в отсутствие хлорид иона, чем в его присутствии, вероятно связано с тем, что открытая R-форма белка содержит больше экспонированных аминокислотных групп, чем его закрытая T-форма (табл. 2). Значения K_{SV} для R-формы Lys-плазминогена в отсутствие и в присутствии хлорид иона различаются не сильно, но они существенно ниже, чем K_{SV} для R-формы Glu-плазминогена, что может быть связано с меньшим количеством доступных аминокислотных групп на поверхности Lys-плазминогена (85 кДа), чем на по-

Таблица 2. Константы тушения флуоресценции (K_{SV}) Glu-плазминогена и Lys-плазминогена ПАМAM-COOH дендримерами G2.5 and G3.5 в отсутствие и в присутствии 0.15 M NaCl

	NaCl	Форма плазминогена	K_{SV}, M^{-1}	
			дендример G2.5	дендример G3.5
Glu-плазминоген	–	R	$(3.12 \pm 0.12) \times 10^3$	$(3.25 \pm 0.13) \times 10^3$
	+	T	$(1.62 \pm 0.17) \times 10^3$	$(1.71 \pm 0.13) \times 10^3$
Lys-плазминоген	–	R	$(2.22 \pm 0.11) \times 10^3$	$(2.83 \pm 0.12) \times 10^3$
	+	R	$(1.84 \pm 0.14) \times 10^3$	$(2.54 \pm 0.13) \times 10^3$

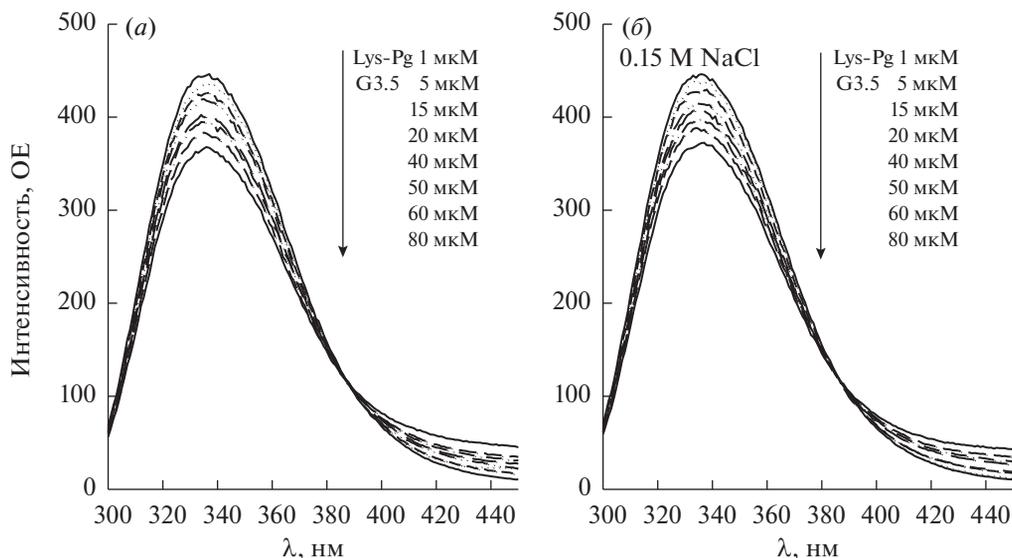


Рис. 3. Влияние ПАМAM-СООH дендримера G3.5 на флуоресцентный спектр 1 мкM Lys-плазминогена в отсутствие (а) и в присутствии (б) 0.15 M NaCl (pH 7.4; 37°C). $p > 0.001$.

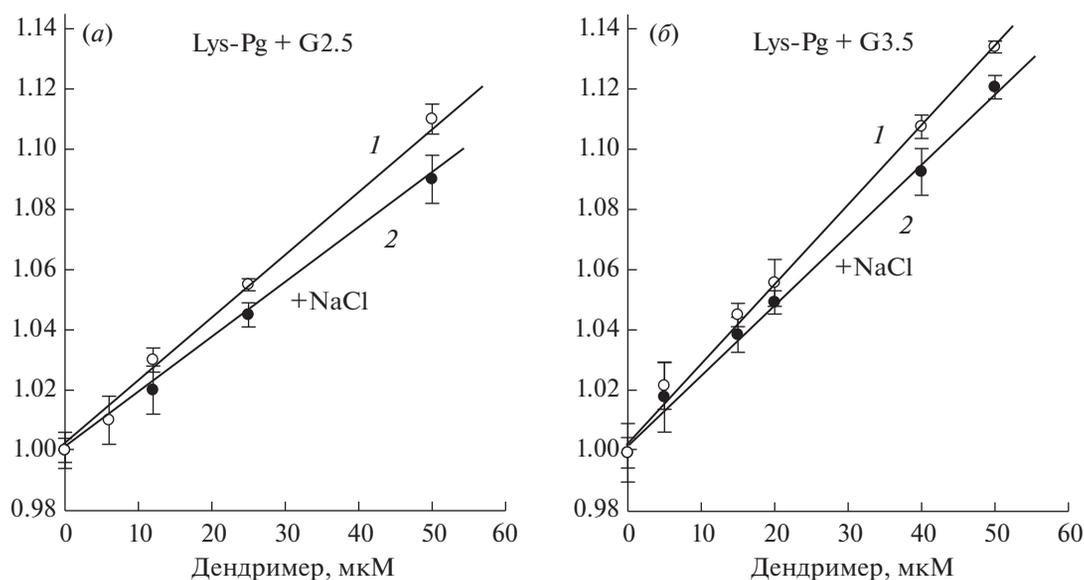


Рис. 4. Зависимости Штерна–Фольмера для тушения флуоресценции Lys-плазминогена ПАМAM дендримерами G2.5 (а) и G3.5 (б) в отсутствие (1) и в присутствии 0.15 M NaCl (2). $p > 0.001$.

верхности R-формы Glu-плазминогена (93 кДа). Тушение флуоресценции различных форм плазминогена анионным дендримером можно объяснить тем, что с ростом концентрации дендримера увеличивается их связывание с экспонированными аминогруппами зимогена как в присутствии, так и в отсутствие хлорид иона. При этом, вероятно, образуются комплексы с возрастающим соотношением дендример : плазминоген, в которых изменение конформации белка продолжается. Этот механизм объясняет конформационное изменение

Lys-плазминогена независимо от присутствия хлорид иона и Glu-плазминогена в присутствии постоянной концентрации хлорид иона.

При образовании тромба, Glu-плазминоген, циркулирующий в крови в концентрации 2 мкM, захватывается в сгусток. Лизис сгустка индуцируется tPA и uPA через активацию плазминогена, локализованного на его поверхности. Дендримеры, введенные в циркуляцию, могут связываться с tPA, uPA и плазминогеном в циркуляции, а также с плазминогеном, локализованным на поверхности

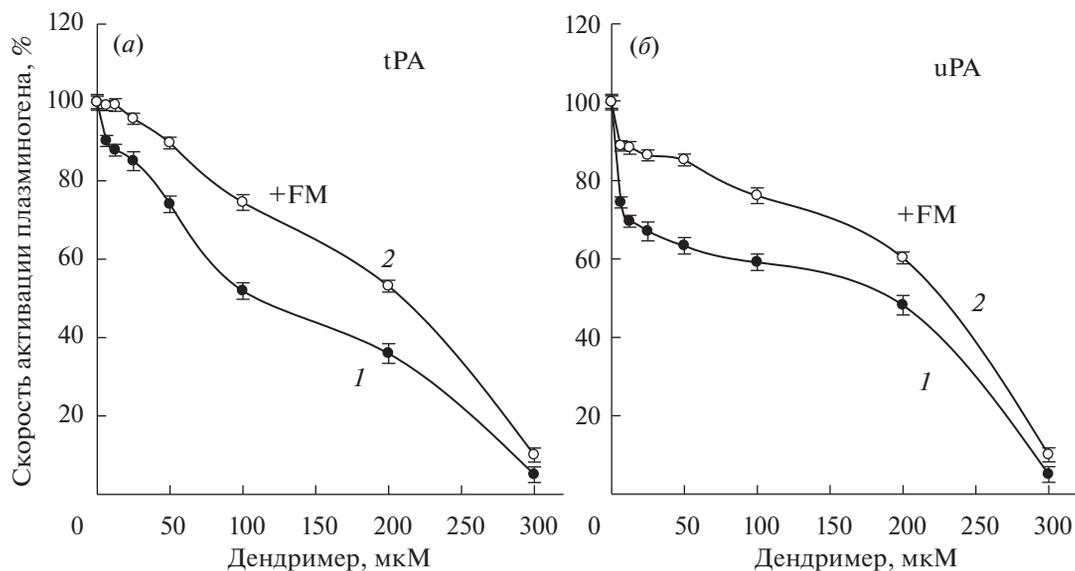


Рис. 5. Влияние концентрации РАМАМ дендримера G3.5 на скорость активации 0.3 мкМ Glu-плазминогена под действием tPA (а) и uPA (б) в отсутствие (1) и в присутствии 60 мкМ фибрин мономера (2) в 0.1 М Трис-НСl буфере, 0.15 М NaCl, pH 7.4. Концентрация активаторов: (а) 20 МЕ/мл (1) и 2 МЕ/мл tPA (2); (б) 1 МЕ/мл uPA. $p < 0.001$.

сгустка. Мы решили изучить влияние дендримера G3.5 (как представителя трех дендримеров с наибольшей плотностью отрицательного заряда) на скорость активации Glu-плазминогена в буфере, содержащем 0.15 М хлорид ион (по аналогии с условиями циркуляции), в отсутствие и присутствии растворимого фибрин-мономера (FM) и на скорость лизиса твердофазного плазменного сгустка под действием tPA и uPA.

Влияние дендримеров на активацию плазминогена

Кривые 1 на рис. 5 показывают влияние концентрации дендримера G3.5 на скорость активации нативного Glu-плазминогена, индуцированного tPA (а) и uPA (б), в буфере, содержащем 0.15 М NaCl (pH 7.4). Рост концентрации дендримера вызывал значительное снижение скорости активации Glu-плазминогена под действием обоих его активаторов. При этом, скорость активации падала более резко до 50 мкМ концентрации дендримера в случае действия uPA (рис. 5б, кривая 1), чем в случае действия tPA (рис. 5а, кривая 1). Ингибирование активации Glu-плазминогена с ростом концентрации дендримера G3.5 вызвано, главным образом, изменением структуры плазминогена (рис. 1) в результате образования комплексов дендример*плазминоген с возрастающим содержанием в них дендримера. Уменьшение собственной каталитической активности tPA и uPA (табл. 1) с ростом концентрации дендримера также дает вклад в ингибирование скорости активации Glu-плазминогена.

Известно, что фибрин резко увеличивает скорость активации Glu-плазминогена под действием tPA и мало влияет на плазминоген-активаторную активность uPA т.к. tPA является фибринспецифическим активатором плазминогена [36], в то время как uPA не имеет сродства к фибрину [37]. В связи с этим, мы проверили влияние растворимого FM на ингибирование дендримером G3.5 плазминоген-активаторной активности двух активаторов. Данные рис. 5а, 5б демонстрируют, что скорости активации Glu-плазминогена под действием обоих активаторов в присутствии 60 мкМ FM значительно выше (кривые 2), чем в его отсутствие (кривые 1), хотя продолжают падать с ростом концентрации дендримера. При низких концентрациях дендримера, FM значительно сильнее повышал скорость активации плазминогена под действием tPA (а), чем под действием uPA (б), что объясняется различием сродства к фибрину двух активаторов. Наблюдаемый частичный защитный эффект FM от инактивирующего действия дендримера указывает на наличие конкуренции между FM и дендримером за связывание молекул плазминогена и его активаторов. Как было сказано выше, с увеличением концентрации дендримера, вероятно, образуются комплексы дендример*плазминоген с возрастающим содержанием в них дендримера, в которых продолжается изменение конформации Glu-плазминогена, в результате чего связь Arg561—Val562 становится менее доступной и скорость активации Glu-плазминогена под действием и tPA, и uPA падает (рис. 5, кривые 1). Напротив, связывание FM с LBS Glu-плазминогена вызывает разрушение межмолекулярных взаимодействий Pap/LBS

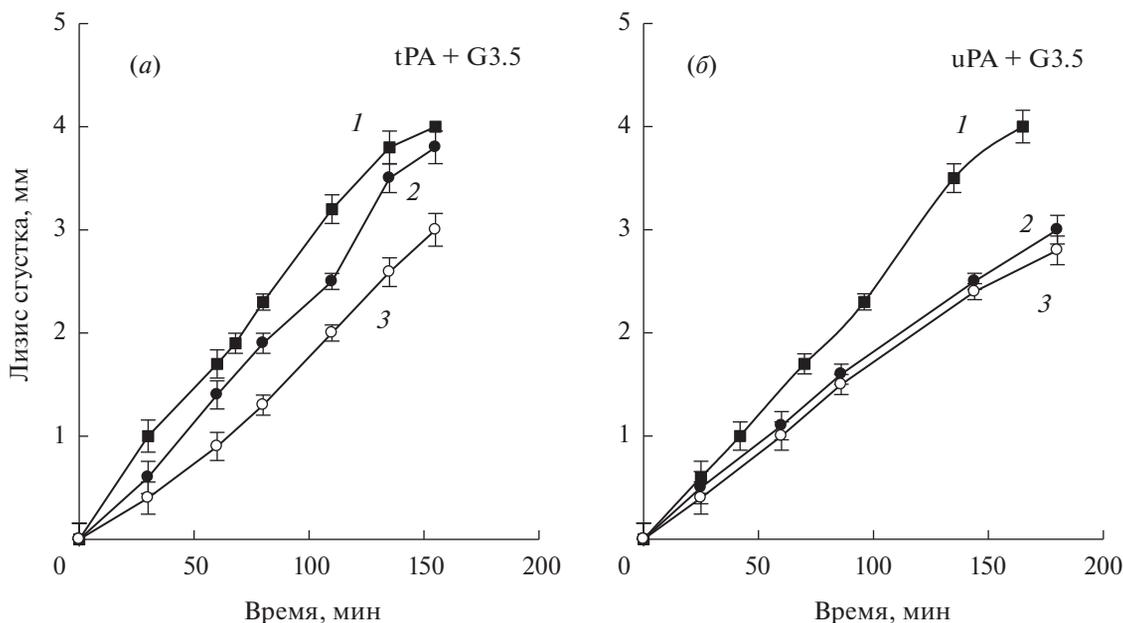


Рис. 6. Кинетика лизиса плазменного сгустка в плазме человека под действием 50 нМ tPA (а) и 90 нМ uPA (б) в отсутствие (1) и в присутствии 200 (2) и 300 мкМ (3) РАМAM дендримера G3.5. $p < 0.01$.

K4 и Pap/LBS K5 [29, 30] и T → R-переход его конформации. Это приводит к повышению доступности активационной связи Glu-плазминогена и увеличению скорости его активации под действием и tPA, и uPA (рис. 5а, 5б, кривые 2). Дополнительный вклад в повышение скорости tPA-индуцированной активации Glu-плазминогена в присутствии FM может давать солокализация tPA и зимогена на растворимом фибрине.

Таким образом, наблюдаемое снижение ингибирующего действия анионного дендримера на скорость активации Glu-плазминогена в присутствии растворимого фибрина является результатом конкуренции стимулирующего эффекта постоянной 60 мкМ концентрации FM и ингибирующего эффекта возрастающих концентраций анионного дендримера (рис. 5а, 5б, кривые 2). Так при 200 мкМ концентрации дендримера G3.5, скорость активации плазминогена падала на 64 и 47% в случае с tPA и на 52 и 40% в случае uPA соответственно, в отсутствие и в присутствии FM. Драматическое падение скорости активации Glu-плазминогена обоими активаторами (на 90–95%), наблюдаемое при увеличении концентрации дендримера от 200 до 300 мкМ даже в присутствии 60 мкМ FM, можно объяснить истощением уровня последнего в результате протеолитической деградации образующимся плазмином. Данные рис. 5а, 5б моделируют влияние дендримера на скорость активации Glu-плазминогена под действием tPA и uPA в циркуляции и возможный эффект на эти процессы фиксированной концентрации растворимого фибрина.

Влияние дендримера на фибринолиз

Рис. 6 демонстрирует влияние двух высоких концентраций дендримера G3.5 на кинетику лизиса плазменного сгустка, погруженного в плазму человека, под действием tPA (а) и uPA (б). Вычисленные из кинетических кривых скорости лизиса ($\Delta l/t$) составляли: 0.030 ± 0.002 , 0.023 ± 0.002 и 0.018 ± 0.003 мм/мин для tPA и 0.026 ± 0.002 , 0.017 ± 0.003 и 0.016 ± 0.002 мм/мин для uPA в отсутствие и в присутствии 200 и 300 мкМ дендримера соответственно. Дендример G3.5, добавленный в плазму над сгустком, вызывал снижение скорости тромболиза на 23 и 40% в случае действия tPA и на 35 и 38% в случае действия uPA, при концентрации дендримера 200 и 300 мкМ соответственно. Из сравнения данных рис. 5 и рис. 6 следует, что дендример G3.5 ингибирует лизис твердофазного плазменного сгустка, индуцированный двумя активаторами, значительно слабее, чем активацию Glu-плазминогена этими активаторами в буфере даже в присутствии растворимого фибрина.

Наблюдаемое на рис. 6а, 6б умеренное снижение скорости тромболиза, индуцированного uPA и tPA, с ростом концентрации дендримера обусловлено с эффектами дендримеров на структуру и функцию плазминогена как на поверхности сгустка, так и в плазме. Активация Glu-плазминогена при связывании с фибрином сгустка усиливается из-за T → R-изменения его конформации, а ингибирующий эффект дендримеров на активацию фибринсвязанного плазминогена значительно снижен из-за меньшего количества поверхност-

ных аминокрупп в молекуле фибринсвязанного зимогена, доступных для связывания дендримеров. Вероятно, ингибирование тромболизиса дендримерами, в большей степени, связано с образованием в плазме комплексов дендример * плазминоген. С ростом соотношения дендример : плазминоген, связывание этих комплексов с новыми центрами связывания плазминогена на поверхности фибрина, образующимися в ходе специфического расщепления пламиноом его лизиновых связей, ухудшается. Снижение сорбции и активируемости комплексов дендример*плазминоген, а также заметное ингибирование активности uPA и tPA приводят к уменьшению скорости образования плазмина на фибрине и тромболизиса.

Из полученных результатов следует, что ПАМАМ-СООН дендримеры связываются с Glu-плазминогеном с образованием комплексов дендример*плазминоген, в которых содержание полимера увеличивается с ростом концентрации добавленного дендримера. Это приводит к значительному изменению конформации Glu-плазминогена и резкому падению скорости его превращения в плазмин под действием активаторов. Связывание анионных дендримеров с tPA и uPA вызывает заметное снижение их собственной амидолитической активности. Эти эффекты увеличиваются с ростом концентрации и генерации дендримера (от G1.5 до G3.5). Растворимый фибрин-мономер заметно снижает, но не аннулирует, ингибирующий эффект дендримеров на активацию Glu-плазминогена в буфере (0.15 М NaCl, pH 7.4). Однако ингибирующий эффект дендримеров на лизис твердофазного плазменного сгустка в плазме существенно ниже, чем на скорость активации плазминогена в жидкой фазе под действием tPA и uPA. Таким образом, ингибирующее действие анионных ПАМАМ дендримеров на активность системы фибринолиза включает значительное изменение конформации и функции циркулирующего Glu-плазминогена и, в меньшей степени, снижение активности его tPA и uPA.

Следует отметить, что ПАМАМ-СООН дендримеры более высоких генераций (G4.5–G6.5) должны изменять конформацию и функцию Glu-плазминогена при значительно меньших концентрациях, чем изученные нами ПАМАМ-СООН дендримеры низких генераций ($G \leq 3.5$). Поэтому при использовании анионных ПАМАМ дендримеров различных генераций в качестве носителей для системной доставки лекарств необходимо оценивать их концентрационные эффекты на структуру и функцию циркулирующего плазминогена, поскольку система плазминоген/плазмин, помимо тромболизиса, играет важную физиологическую и патологическую роль в ряде других жизненно-важных процессах: деградации внеклеточного матрикса, эмбриогенезе, миграции клеток, ремоде-

лировании тканей, заживлении ран, ангиогенезе, воспалении и миграции опухолевых клеток.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы рекомбинантный тканевый активатор плазминогена (tPA, КФ 3.4.21.68) (NIBSC, Великобритания), урокиназа (uPA, КФ 3.4.21.31) (Медак GmbH, Германия), рептилаза (КФ 3.4.21.29) из яда змеи *Bothrops atrox* (≈ 36 кДа, Diagnostica Stago, Франция), *n*-нитроанилид H-D-Ile-Pro-Arg (S-2288) (Diapharma, USA), *n*-нитроанилид p-Glp-Gly-Arg (S-2444) (Sigma, США), *n*-нитроанилид HCO-Ala-Phe-Lys (AFK-pNA), тромбин и фибриноген человека (Технология-Стандарт, Россия), апротинин Gordox (Gedeon Richter, Венгрия), Lys-сефароза 4B (GE Healthcare Life Sciences, Швеция), ПАМАМ дендримеры поколений G1.5 (2934.6 Да), G2.5 (6265.6 Да) и G3.5 (12900 Да) с концевыми карбоксильными группами были любезно предоставлены кафедрой химии нефти и органического катализа химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Чистота дендримеров была подтверждена ^1H ЯМР спектроскопией. Донорская цитратная плазма крови получена на станции переливания крови, Москва, Россия. 96-луночные планшеты (Биомедикал, Россия). Трис (2-амино-2-(гидроксиметил)-1,3-пропандиол) (Sigma, США). Остальные реактивы отечественного производства марки “ос.ч.” или “х.ч.”

Оборудование. Спектрофотометр Biochrom WPA Lightwave II, шейкер-инкубатор для планшет (ST-3, Elmi, Эстония), планшетный фотометр Antos-2020 (Австрия), флуоресцентный спектрофотометр Varian Cary Eclipse (American Laboratory Trading, Inc., США), прибор для электрофореза BIO-RAD Mini-Protean Tetra Cell, коллектор фракций BIO-RAD, модель 2110 (Великобритания), катетометр КМ-6 (Россия).

Статистический анализ результатов был проведен с помощью программы Sigma Plot 11.0. Данные считались достоверными при $p < 0.05$.

Гемолиз эритроцитов (RBC). Свежую кровь доноров отбирали в пробирки, содержащие 3.2% натрий цитратный буфер, центрифугировали (при $2000 \times g$ в течение 15 мин при 4°C), удаляли плазму, и осадок трехкратно промывали фосфатно-солевым буфером, pH 7.4 (PBS). Затем к осадку добавляли PBS для получения суспензии RBC при 2% (v/v) гематокрите. Аликвоты суспензии RBC инкубировали с 600 мкМ ПАМАМ дендримерами G1.5, G2.5 или G3.5. Тритон X-100 (1%, v/v) добавляли к другим аликвотам суспензии RBC для получения полного гемолиза. После инкубации при 37°C в течение 4 ч при мягком встряхивании, суспензии RBC центрифугировали при $1500 \times g$ в течение 10 мин при 4°C , и супернатанты анализи-

ровали с помощью спектрофотометра Lightwave II (Biochrom Ltd., Великобритания) на высвободившийся из эритроцитов гемоглобин при 540 нм [15]. Эксперименты с каждым образцом проводились пять раз.

Фибрин-мономер (FM) (des-AA-фибрин) получали обработкой фибриногена человека (20 мг/мл) тромбиноподобным ферментом рептилазой (0.05 МЕ/мл) и растворением образовавшегося сгустка поперечносшитого полимера в равном объеме 7 М мочевины.

Glu-плазминоген и Lys-плазминоген получали из пула плазмы человека с добавлением и без аprotинина, соответственно. Lys- и Glu-формы плазминогена выделяли из плазмы аффинной хроматографией на Lys-сефарозе 4В при 4°C по методу, описанному нами в работе [38]. Чистоту препаратов проверяли с помощью Ds-Na-ПААГ-электрофореза в невозстанавливающих условиях в 12%-ном геле методом Лэммли [39]. По данным титрования аprotинином плазмينا, полученного активацией Lys- или Glu-форм плазминогена стрептокиназой, содержание зимогена в препаратах составляло 90 и 95% соответственно.

Плазмин получали активацией 2 мкМ раствора Lys-плазминогена каталитической концентрацией стрептокиназы ([Pg] : [SK] = 100 : 1 (М/М)) в 0.1 М Tris-HCl буфере, pH 7.4, содержащем 0.15 М NaCl, 20%-ный глицерин (V/V) и 0.01%-ный Tween-80, при 25°C. Полноту превращения зимогена в фермент определяли по максимальной амидазной активности отобранных проб. Раствор плазмينا хранили в аликвотах при -20°C.

Амидолитические активности ферментов. Собственные активности плазмينا (20 нМ), tPA (20 нМ) и uPA (20 нМ) измеряли по скоростям гидролиза их специфических хромогенных субстратов AFK-pNA (0.6 мМ), S-2288 (1 мМ) и S-2444 (0.1 М), соответственно, в 0.1 М PBS (pH 7.4), содержащем различные концентрации РАМАМ дендримеров (от 0 до 300 мкМ), в 96-луночных планшетах при комнатной температуре. Изменение поглощения при 405 нм регистрировались через 1-минутные интервалы в течение 15–20 мин с помощью планшетного фотометра Anthos 2020 (Anthos, Австрия). Активности плазмينا, tPA и uPA вычисляли из начальных скоростей гидролиза их специфических субстратов. Каждый эксперимент выполняли 3 раза.

Флуоресцентный спектр. Спектр флуоресценции плазминогена (1 мкМ) в 10 мМ фосфатном буфере, pH 7.4, содержащем различные концентрации РАМАМ дендримера, сканировали в диапазоне 300–450 нм в кварцевых ячейках (4 × 1 × 1 см) при комнатной температуре, с использованием флуоресцентного спектрофотометра Varian Cary Eclipse (American Laboratory Trading, Inc., США). Эти сканирования были выполнены при фиксиро-

ванных условиях измерения: λ_{exc} 280 нм, ширина щели возбуждения и излучения 10 нм и скорость сканирования 1200 нм/мин. Все эксперименты были повторены три раза.

Активация плазминогена. Кинетику активации Glu-плазминогена под действием tPA и uPA изучали с помощью сопряженного метода, описанного в работе [41] с некоторыми модификациями. В лунки микропланшета вносили 150 мкл 0.1 М Tris-HCl буфера, 0.15 М NaCl, pH 7.4, содержащего 0.8 мМ AFK-pNA, 0.4 мкМ Glu-Pg и различные концентрации РАМАМ дендримера. После инкубации плазминогена с дендримерами в течение 15 мин при 37°C в термостатируемом шейкере-инкубаторе для планшетов (ST-3, Elmi) в рабочие лунки вносили 50 мкл 80 нМ tPA или 4 нМ uPA в том же буфере, а в контрольные лунки вносили 50 мкл буфера. Конечные концентрации дендримера в реакционной смеси варьировали от 0 до 300 мМ. В экспериментах по изучению влияния растворимого фибрина на скорость активации плазминогена реакционная смесь содержала 0.02 мг/мл FM, а концентрацию tPA снижали до 2 нМ. За кинетикой активации плазминогена следили по высвобождению продукта гидролиза AFK-pNA образующимся плазмином при 405 нм (37°C) с помощью планшетного фотометра Anthos 2020 (Австрия). Скорости активации плазминогена ($\Delta A_{405}/t^2$) вычисляли так, как описано в работе [41]. Каждый эксперимент выполняли 4 раза.

Лизис плазменных сгустков. Кинетику лизиса плазменного сгустка в плазме человека, индуцированного tPA или uPA, изучали с помощью метода, описанного нами в работе [41] с некоторыми модификациями. К сформированным плазменным гелям добавляли 0.45 мл плазмы человека, содержащей различные концентрации дендримера (0–300 мкМ). После термостатирования при 37°C в течение 15 мин, реакцию фибринолиза инициировали добавлением 50 мкл раствора tPA или uPA до конечной концентрации 50 и 90 нМ соответственно. Каждый эксперимент выполняли 4 раза. За кинетикой фибринолиза следили по уменьшению высоты столба геля (l) во времени при 37°C с помощью катетометра (КМ-6, Россия). Скорость фибринолиза определяли как тангенс угла наклона начальных участков кинетических кривых ($\Delta l/t$, мм/мин).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена на Химическом факультете Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова в рамках Госрегистрационной темы № ААА-А16-116052010081-5 “Молекулярный дизайн, структурно-функциональный анализ и регуляция ферментных систем, клеточных конструкций, бионаноматериалов: фундаменталь-

ные основы и приложения в технологии, медицине, охране окружающей среды”.

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. Tomalia D. // Prog. Polym. Sci. 2005. V. 30. P. 3–4.
2. Srinivasa-Gopalan S., Yarema K. // Nanotechnologies for the Life Sciences. 2007. V. 7. P. 1–43.
3. Kannan S., Dai H., Navath R.S., Balakrishnan B., Jyoti A., Janisse J., Romero R., Kannan R.M. // Sci. Transl. Med. 2012. V. 4. P. 130–146.
4. Cheng Y., Wang J., Rao T., He X., Xu T. // Frontiers in Bioscience. 2008. V. 1. P. 1447–1471.
5. Wyszogrodzka M., Haag R. // Chemistry. 2008. V. 14. P. 9202–9214.
6. Orive G., Hernandez R., Gascon A., Pedraz J.L. // Cancer Therapy. 2005. V. 3. P. 131–138.
7. Patri A., Majoros I., Baker J. // Curr. Opin. Chem. Biol. 2002. V. 6. P. 466–471.
8. Madaan K., Kumar S., Poonia N., Lather V., Pandita D. // J. Pharm. Bioall. Sci. 2014. V. 6. P. 139–150.
9. Bielinska A., Eichman J.D., Lee I., Baker J.R., Jr., Balogh L. // J. Nanoparticle Res. 2002. V. 4. P. 395–403.
10. Shadrack D.M., Swai H.S., Munissi J.J.E., Mubofu E.B., Nyandoro S.S. // Molecules. 2018. V. 23. P. 1419.
11. Pan B., Cui D., Xu P., Ozkan C., Feng G., Ozkan M., Huang T., Chu B., Li Q., He R., Hu G. // Nanotechnology. 2009. V. 20. P. 125101.
12. Mukhametova L.I., Aisina R.B., Zakharyan E.M., Karakhanov E.A., Gershkovich K.B., Varfolomeyev S.D. // Thromb. Res. 2017. V. 154. P. 50–52.
13. Han M.H., Chen J., Wang J., Chen S.L., Wang X.T. // J. Biomed. Nanotechnol. 2010. V. 6. P. 82–92.
14. Greish K., Thiagarajan G., Herd H., Price R., Bauer H., Hubbard D., Burckle A., Sadekar S., Anwar T., Yu A., Ray A., Ghandehari H. // Nanotoxicology. 2012. V. 6. P. 713–723.
15. Wang W., Xiong W., Zhu Y., Xu H., Yang X. // J. Biomed. Mater. Res. Part B. 2010. V. 93. P. 59–64.
16. Diaz C., Benitez C., Vidal F., Barraza L.F., Jiménez V.A., Guzman L., Fuenteala J., Yevenes G.E., Alderete J.B. // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine (NBM). 2018. V. 14. P. 2227–2234.
17. Jones C.F., Campbel R.A., Franks Z., Gibson C.C., Thiagarajan G., Vieira-de-Abreu A., Sukavaneshvar S., Mohammad S.F., Li D.Y., Ghandehari H., Weyrich A.S., Brooks B.D., Grainger D.W. // Mol. Pharm. 2012. V. 9. P. 1599–1611.
18. Jones C.F., Campbell R.A., Brooks A.E., Assemi S., Tad-jiki S., Thiagarajan G., Mulcock Ch., Weyrich A.S., Brooks B.D., Ghandehari H., Grainger D.W. // ACS Nano. 2012. V. 6. P. 9900–9910.
19. Dobrovolskaia M.A., Patri A.K., Simak J., Hall J.B., Semberova J., De Paoli Lacerda S.H., McNeil S.E. // Mol. Pharm. 2012. V. 9. P. 382–393.
20. Watala C., Karolczaka K., Kassassira H., Talara M., Przygodzka T., Maczynska K., Labieniec-Watala M. // Intern. J. Pharmaceutics. 2016. V. 503. P. 247–261.
21. Fu Y., Hu R., Li C., Wang Q., Liu Z., Xue W. // J. Bioact. Compat. Polym. 2014. V. 29. P. 165–179.
22. Markowicz-Piasecka M., Sadkowska A., Podsiadlik M.E., Mikiciuk-Olasik E., Sikora J. // Toxicology in Vitro. 2019. V. 59. P. 87–99.
23. Aisina R., Mukhametova L., Ivanova E. // Materials Science and Engineering: C. April. 2020. V. 109. 110605.
24. Wang X., Inapagolla R., Kanna S., Lieh-Lai M., Kannan R.M. // Bioconjug. Chem. 2007. V. 18. P. 791–799.
25. Айсина Р.Б., Мухаметова Л.И., Гершкович К.Б., Иванова Е.М., Захарян Е.М., Караханов Э.А. // Био-орган. химия. 2018, Т. 44. С. 533–543. [Aisina R.B., Mukhametova L.I., Gershkovich K.B., Ivanova E.M., Zakharyan E.M., Karakhanov E.A. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. P. 528–537.]
26. Singh P. // Bioconjug. Chem. 1998. V. 9. P. 54–63. <https://doi.org/10.1021/bc970048a>
27. Thomas T.P., Patri A.K., Myc A., Myaing M.T., Ye J.Y., Norris T.B., Baker J.R., Jr. // Biomacromolecules. 2004. V. 5. P. 2269–2274.
28. Bustos E., Godinez L.A. // Int. J. Electrochem. Sci. 2011. V. 6. P. 1–36.
29. Law R.H.P., Caradoc-Davies T., Cowieson N., Horvath A.J., Quek A.J., Encarnacao J.A., Steer D., Cowan A., Zhang Q., Lu B.G., Pike R.N., Smith A.I., Coughlin P.B., Whisstock J.C. // Cell Reports. 2012. V. 1. P. 185–190.
30. Ponting C.P., Marshall J.M., Cederholm-Williams S.A. // Blood Coagul. Fibrinolysis. 1992. V. 3. P. 605–614.
31. Айсина Р.Б., Мухаметова Л.И. // Биоорган. химия. 2014, Т. 40, С. 642–657. [Aisina R.B., Mukhametova L.I. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2014. V. 40. P. 590–605.]
32. Castellino F.J., Ploplis V.A. // Thromb. Haemost. 2005. V. 93. P. 647–654.
33. Lakowicz J.R. // Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3rd ed. Springer US, 2006.
34. Urano T., Chibber B.A.K., Castellino F.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 4031–4034.
35. Urano T., de Serrano V.S., Chibber B.A.K., Castellino F.J. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 15959–15964.
36. Rijken D.C., Hoylaerts M., Collen D. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 2920–2925.
37. Duffy M.G. // Fibrinolysis. 1993. V. 7. P. 295–302.

38. Левашов М.Ю., Айсина Р.Б., Гершкович К.Б., Варфоломеев С.Д. // Биохимия 2007. Т. 72. С. 872–882. [Levashov M.Yu., Aisina R.B., Gershkovich K.B., Varfolomeyev S.D. // Biochemistry (Moscow). 2007. V. 72. P. 707–715.]
39. Laemmli, U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
40. Aisina R., Mukhametova L., Gershkovich K., Varfolomeyev S.D. // Biochim. Biophys. Acta. 2005. V. 1725. P. 370–376.
41. Aisina R., Mukhametova L., Varfolomeyev S. // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1860. P. 629–635.

Mechanism of Inhibitory Action of Anionic Polyamidoamine Dendrimers of Generation 1.5–3.5 on the Activity of the Fibrinolytic System

R. B. Aisina^{*, #}, L. I. Mukhametova^{*}, and E. M. Ivanova^{*}

[#]Phone: +7 (495) 939-50-83; e-mail: aisina2004@mail.ru

^{*}Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1/3, Moscow, 119991 Russia

Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers are used in medicine for systemic drug delivery. The safety assessment of biomaterials that will come into contact with blood components and tissues is especially important. For example, PAMAM-NH₂ dendrimers G4–G7 cause platelet and fibrinogen aggregation. Here, the effect of PAMAM-COOH dendrimers G1.5–G3.5 on key components of the fibrinolysis system was studied. The dendrimers did not affect plasmin activity, but the amidolytic activities of tissue plasminogen activator (tPA) and urokinase (uPA) decreased markedly with increasing dendrimer concentration and generation. The peak intensity at 340 nm of Glu-plasminogen fluorescence in the absence and presence of 0.15 M NaCl decreased with increasing dendrimer's concentration, indicating a change in the microenvironment of Trp residues and molecular conformation of open and closed Glu-plasminogen forms. From comparing the fluorescence quenching constants, we concluded that anionic dendrimer and chloride ion simultaneously bind to Glu-plasminogen and that each of these ligands exerts its independent effects through separate binding sites. With increasing dendrimer concentration, the rate of tPA- and uPA-initiated Glu-plasminogen activation decreased sharply, probably due to the formation of dendrimer*plasminogen complexes with increasing dendrimer content, which makes the plasminogen bond cleaved by activators increasingly unavailable. The rate of tPA- and uPA-induced plasma clot lysis in plasma decreased moderately with increasing dendrimer concentration, possibly due to the reduced effect of dendrimer on fibrin-bound plasminogen. Thus, the mechanism of inhibitory action of anionic PAMAM dendrimers on Glu-plasminogen activation and thrombolysis induced by tPA and uPA is associated with a marked inactivation of activators and a significant change in plasminogen conformation. In circulation, PAMAM-COOH dendrimers can affect other physiological and pathological processes in which the plasminogen/plasmin system plays an important role.

Keywords: plasminogen, plasminogen activators, activation, inhibition, dendrimers



УДК 547.2.33.4-38.4:57.016

НОВЫЕ СТРУКТУРНЫЕ ФРАГМЕНТЫ МОЛЕКУЛ ХИМИЧЕСКИХ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ, СТИМУЛИРУЮЩИЕ РИЗОГЕНЕЗ

© 2020 г. Р. Г. Гафуров*, #, И. В. Мартынов*, Г. А. Романов**

*Институт физиологически активных веществ РАН,

Россия, 142432 Московская обл., Черноголовка, Северный проезд, 1

**Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Россия, 127276 Москва, ул. Ботаническая, 35

Поступила в редакцию 24.02.2020 г.

После доработки 28.02.2020 г.

Принята к публикации 01.03.2020 г.

На основе результатов, полученных с помощью биотеста на модели укоренения листовых и стеблевых черенков фасоли, предложенный его авторами как специфический тест на ауксины, ранее был сделан вывод, что бензиловым спиртам, бензиламинам и их четвертичным аммониевым производным присуща ауксиновая активность. В данной работе установлено, что указанные соединения не имеют ауксиновой активности. Это сделано с помощью количественного молекулярного биотеста на модели трехдневных проростков трансгенного арабидопсиса *Arabidopsis thaliana* L., трансформированного конструкцией, содержащей ген β -глюкуронидазы под контролем чувствительного к ауксину полусинтетического промотора *DR5*. В результате найдено, что биотест на модели укоренения листовых и стеблевых черенков фасоли не является специфически ауксиновым и отражает лишь ризогенезную, но не собственно ауксиновую активность исследуемых соединений. С помощью биотеста по влиянию на ризогенез десятидневных проростков гороха (*Pisum sativum* L.) сорта “Шести-недельный” установлено, что по ризогенезной активности исследованные стресспротекторы-фиторегуляторы сопоставимы с природным ауксином индолил-3-уксусной кислотой (ИУК), хотя не являются ауксинами. Это согласуется с прежними данными о ризогенезной активности, полученными на моделях укоренения листовых и стеблевых черенков фасоли и проращивания семян ячменя. Показано, что оксабензильная –OBzI и азабензильная –NHbzI группы являются новыми структурными фрагментами, которые придают химическим регуляторам роста растений высокую ризогенезную активность.

Ключевые слова: регуляторы роста и развития растений, стресспротекторы-фиторегуляторы, бензихол, этихол, ауксин, ретардант, ризогенезная активность, молекулярный биотест

DOI: 10.31857/S0132342320050085

ВВЕДЕНИЕ

Растение, как живой организм, прикреплено к земле и не может уклониться от воздействий окружающей среды. Жизнь растения полностью зависит от почвенных, климатических, погодных и других текущих условий среды. При этом устойчивость его роста и развития, а также постоянство внутренней среды обеспечивается высокочувствительными системами регуляции физиологических процессов, включая ферментную, генетическую, мембранную, трофическую, гормональную, электрофизиологическую системы. Они объединены в единую надсистему организменной интеграции и разражимости [1].

Физиология растения выстроена так, что определенные внешние воздействия оно может воспри-

нимать как стресс и в ответ до некоторого уровня повышать энергетику роста и развития, решая главную задачу — дать семена, оставить потомство. На этой основе реализован целый ряд физических методов активации всхожести семян и развития растений, путем воздействия на семена теплом или холодом, магнитным полем, лазерным излучением, радиоволнами и т.д. [2]. В качестве регуляторов роста и развития растений (РРРР) описаны тысячи химических веществ [2, 3]. Отдельные из них широко вошли в практику растениеводства и имеют такое же значение для защиты и сохранения урожая, как и известные пестициды — инсектициды, фунгициды, гербициды [4]. РРРР повышают устойчивость сельскохозяйственных растений, массу и качество урожая, будучи применены для предпосевной обработки семян, опрыскивания вегетирующих растений, обработки полученных

Автор для связи: (эл. почта: ravig@icp.ac.ru).

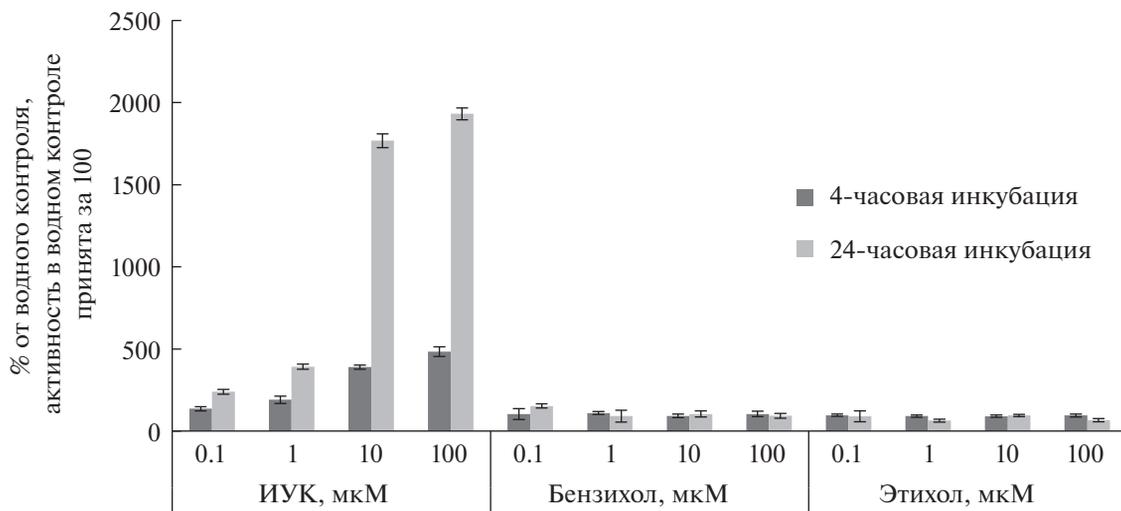


Рис. 1. Влияние индолил-3-уксусной кислоты ИУК, N,N,N,N-диметилбензил-(2-бензилоксиэтил)-аммонийхлорида (бензихола) и N,N,N,N-триэтил-(2-бензилоксиэтил)-аммонийхлорида (этихола) на экспрессию *DR5::GUS* и изменение активности β-глюкуронидазы в трехдневных проростках *Arabidopsis thaliana*. Погрешности средних значений соответствуют диапазонам стандартных отклонений.

плодов или с помощью иных операций, Например, ретарданты позволяют выращивать высокоурожайные длинностебельные сорта зерновых с применением высоких доз минеральных удобрений для повышения урожайности и при этом избежать потерь от полегания хлебов в период уборки [4].

Синтез и системный поиск новых химических соединений, превосходящих по эффективности известные регуляторы роста и развития растений, до сих пор остается актуальной задачей.

Исследования, проведенные в научно-исследовательских институтах бывшей Россельхозакадемии, показали, что объединение в молекуле фрагментов с ретардантной (антигиббереллиновой) и проауксиновой активностью резко повышает эффективность полученных соединений как стресспротекторов-фиторегуляторов. Если гектарная доза хлорохолинхлорида, наиболее распространенного ретарданта, составляет по действующему веществу (д. в.) на зерновых 1800–4000 г/га [5], то стресспротектор-фиторегулятор бензихол (N,N,N,N-диметилбензил-(2-бензоксиэтил)-аммонийхлорид) в опытах на яровом ячмене был максимально эффективен в дозе 3 г/га по д. в. [6, 7], т.е. меньшей более, чем на три порядка. При этом биологическая эффективность бензихола была выше, чем у эталона хлорохолинхлорида.

Ранее было показано, что соединения, содержащие в молекуле оксабензильный –OBzl или азабензильный –NHbzl фрагмент, в том числе, бензиловый спирт, бензиламин и их четвертичные аммониевые производные, например, N,N,N,N-диметилбензил-(2-бензоксиэтил)-аммонийхлорид (стресспротектор-фиторегулятор

бензихол) и N,N,N,N-триэтил-(2-бензоксиэтил)-аммонийхлорид (стресспротектор-фиторегулятор этихол) (рис. 1) стимулируют укоренение листовых и стеблевых черенков фасоли, а также ризогенез и развитие проростков ячменя, проявляя при этом ризогенезную активность на уровне ауксинов-эталонов – 3-индолилуксусной (ИУК) и 2-нафтилуксусной кислот [8–10]. Исследования проводили с помощью применявшегося в то время доступного биотеста на ауксиновую активность [11], хотя уже были указания на то, что “биологические методы недостаточно специфичны, получаемые результаты зависят от практически не контролируемых колебаний чувствительности и реакционной способности” [12].

Авторы [11] указывали, что “тест на черенках фасоли обладает высокой специфичностью: только индолил-3-уксусная кислота (ИУК), как природный ауксин, вызывала активное корнеобразование, тогда как другие фитогормоны и ингибиторы на этом тесте были инертны или подавляли указанный процесс”. На основе результатов такого биотестирования был сделан вывод, что азабензильный и оксабензильный фрагменты придают вышеуказанным соединениям ауксиновую активность [8–10].

В этой связи цель настоящей работы состояла в том, чтобы путем применения современных высокочувствительных методов получить количественные данные об ауксиновой активности отдельных стресспротекторов-фиторегуляторов. В дальнейшем планировалось умножить их число путем синтеза на основе стратегии химического дизайна [13], затем количественно определить ауксиновую активность полученных соединений

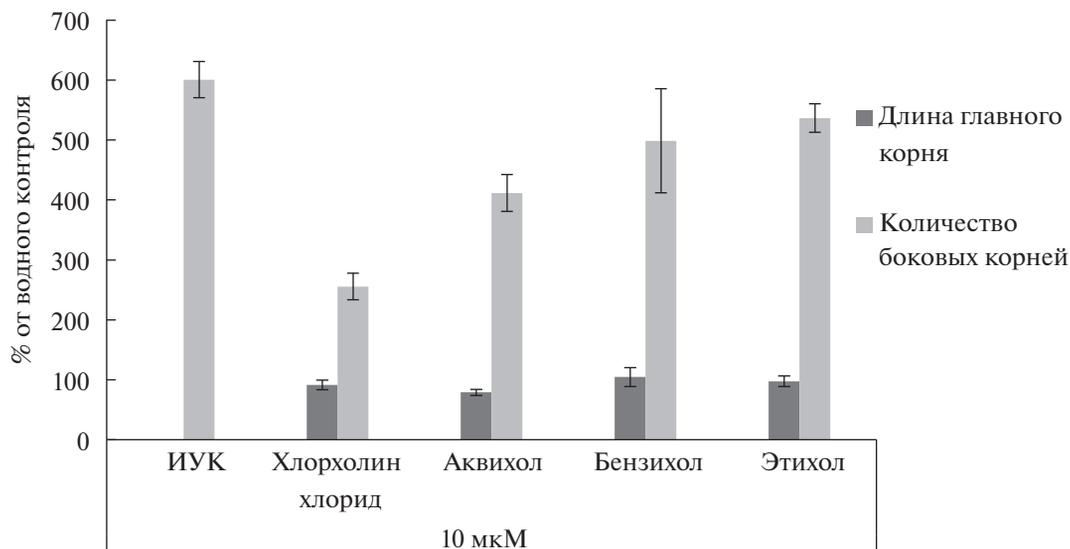


Рис. 2. Влияние N,N,N,N-триметил-(2-хлорэтил)-аммонийхлорида (хлорхолинхлорида), N,N,N,N-триметил-(2-бензоксиэтил)-аммонийхлорида (аквихола), N,N,N,N-диметилбензил-(2-бензоксиэтил)-аммонийхлорида (бензихола) и N,N,N,N-триэтил-(2-бензоксиэтил)-аммонийхлорида (этихола) в концентрации 10 мкМ на развитие корневой системы десятидневных проростков гороха (*Pisum sativum* L.) сорта “Шести недельный”. Результаты в водном контроле приняты за 100%. Погрешности средних значений соответствуют диапазонам стандартных отклонений.

и, применив методы QSAR, выйти на уравнения структура – ауксиновая активность для этой группы. Ранее это было сделано для антигиббеллиновой активности группы ретардантов [14]. Применение методов QSAR является мощным современным средством, ускоряющим поиск химических соединений с полезными свойствами [15].

Предполагаемая ауксиновая активность у 2-бензоксиэтиловых производных четвертичных аммониевых солей была оценена с помощью молекулярного биотеста [16] на модели трехдневных проростков трансгенного арабидопсиса *Arabidopsis thaliana*, трансформированного конструкцией, содержащей ген репортерного фермента β-глюкуронидазы (GUS) под контролем чувствительного к ауксину полусинтетического промотора *DR5*. Ранее данный биотест активно использовался для обнаружения как аналогов ауксина [17], так и его антагонистов [18].

Параллельно исследовали ризогенезную активность бензихола, этихола и их аналогов аквихола (N,N,N,N-триметил-[2-бензоксиэтил]-аммонийхлорид) и хлорохолинхлорида (N,N,N,N-триметил-[2-хлорэтил-аммоний]хлорид) (рис. 1) в биотесте по их влиянию на ризогенез гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Шести недельный в сопоставлении с эталонным ауксином индоллил-3-уксусной кислотой (ИУК).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 приведены результаты биотестирования N,N,N,N-диметилбензил-(2-бензилоксиэтил)-ам-

монийхлорида (бензихол) и N,N,N,N-триэтил-(2-бензилоксиэтил)-аммонийхлорида (этихол) на ауксиновую активность по их влиянию на активность β-глюкуронидазы. Видно, что в молекулярном биотесте ауксиновая активность не регистрировалась ни у бензихола, ни у этихола даже при 24-часовой инкубации. На сегодняшний день этот биотест на ауксины на основе *DR5::GUS* арабидопсиса считается одним из самых чувствительных и специфичных. Таким образом, биологический биотест [11] для определения ауксиновой активности по укоренению листовых и стеблевых черенков фасоли оказался неспецифичным, он фиксировал ризогенезную, но не ауксиновую активность испытуемых веществ.

Ризогенезная активность бензихола, этихола и их аналога аквихола (N,N,N,N-триметил-(2-бензилоксиэтил)-аммонийхлорида) была проверена в опытах по их влиянию на формирование корневой системы проростков гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Шести недельный в сопоставлении с влиянием эталонов ИУК и хлорохолинхлорида. Как видно из рис. 2, все три испытуемых соединения, содержащие оксабензильный фрагмент –OBzI₃, вызывали у проростков мощное развитие боковых корней. Активности всех трех соединений сопоставимы с ризогенезной активностью ИУК. В хлорохолинхлориде оксабензильная группа отсутствует, ее заменяет атом хлора. Соответственно ризогенезная активность хлорохолинхлорида в этом биотесте была существенно ниже и проявлялась лишь на уровне характерном для ретардантов – производных солей четвертичного аммония [19].

Итак, экспериментально показано, что оксабензильная группа –OBzl, соединенная с четвертичным аммониевым фрагментом через диметиленовый линкер (рис. 1), придает исследованным соединениям существенную ризогенезную активность, которая не имеет ауксиновой природы. Ранее было найдено, что высокой ризогенезной активностью обладают также соединения, содержащие азабензильную группу –NHbz [8–10]. Следовательно, эти два химических фрагмента на основе остатка бензила являются теми структурными единицами, которые придают химическому соединению, где они присутствуют, высокую ризогенезную активность. Природа этого феномена требует дальнейшего изучения, которое может иметь три направления.

Во-первых, изучаемые 2-бензоксиэтиловые производные четвертичных аммониевых солей, не имея собственной ауксиновой активности, могут тем или иным образом действовать на ферменты метаболизма ауксина, например, подавляя активность белков семейств GH3 и/или UGT, инактивирующих ауксин. Это может приводить к локальному повышению концентрации эндогенного ауксина в месте воздействия изучаемых соединений. В пользу этого предположения свидетельствуют указания на то, что опрыскивание вегетирующих растений ячменя раствором бензихола повышало содержание ауксинов в стебле и листьях [20]. Во-вторых, существует ненулевая вероятность того, что аппарат рецепции ауксинов в растениях разных видов может иметь различную специфику в отношении веществ с ауксиновой активностью. В частности, тестируемые сельскохозяйственные растения теоретически могут, в отличие от модельных растений арабидопсиса, идентифицировать определенные 2-бензоксиэтиловые производные как ауксины. Однако это предположение представляется маловероятным, т.к. подобные видоспецифичные ауксины, насколько нам известно, до сих пор не обнаружены, а аппарат рецепции ауксинов у разных видов растений очень консервативен [21, 22]. Более вероятным представляется третье предположение о том, что изучаемые соединения могут иметь антицитокининную активность. Цитокинины, другой важный класс гормонов растений, известны тем, что подавляют рост и развитие корневой системы, в том числе образование боковых корней. Умеренное снижение сигнала цитокининов в корнях, достигнутое тем или иным способом, благоприятно влияет на развитие корневой системы. Таким путем действуют, кстати, и ауксины, которые подавляют синтез и снижают концентрацию цитокининов в тканях [23]. В пользу данного предположения свидетельствует определенное структурное сходство описываемых здесь окса- и азабензил-содержащих соединений с известными антицитокининами, которые струк-

турно представляют собой бензильные производные аденина [24].

Ранее сообщалось, что исследованные соединения, как производные четвертичного аммония, проявляют также ретардантную активность на уровне хлорхолинхлорида [13]. Поэтому в данном случае физиологическая активность соединения является по сути суммой активности его эффекторных фрагментов, а именно ризогенезной и ретардантной, как и сообщалось ранее [24]. Термин “физиологическая активность” вещества, на самом деле подразумевает понятие “спектр физиологической активности”.

Таким образом, установлено, что ранее предложенный биотест [11] по укоренению черенков фасоли выявлял не ауксиновую, а лишь ризогенезную активность. На проростках гороха показано, что стресспротекторы-фиторегуляторы N,N,N,N-диметилбензил-(2-бензилоксиэтил)-аммонийхлорид (бензихол) и N,N,N,N-триэтил-(2-бензилоксиэтил)-аммонийхлорид (этихол) и их аналог N,N,N,N-триметил-(2-бензилоксиэтил)-аммонийхлорид (аквихол), содержащие общий оксабензильный фрагмент –OBzl (рис. 1), сопоставимы по ризогенезной активности с индолил-3-уксусной кислотой, но при этом не являются ауксинами. Это согласуется с данными о высокой ризогенезной активности соединений, содержащих оксабензильный или азабензильный фрагмент, которые ранее были получены в тест-системах укоренения черенков фасоли и проращивания семян ярового ячменя [8–10]. Таким образом, оксабензильная –OBzl и азабензильная –NHbz группы являются новыми структурными фрагментами молекул химических регуляторов роста и развития растений, придающими последним высокую ризогенезную активность, не имеющую ауксиновой природы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

*Биотест на ауксиновую активность на основе трансгенного арабидопсиса *Arabidopsis thaliana* L., экспрессирующего репортерный ген *GUS* под контролем ауксин-чувствительного промотора *DR5* (*DR5::GUS A. thaliana*)*

Для проведения биотеста использовали трехдневные проростки трансгенного *DR5::GUS A. thaliana*. Соединения испытывали в широком диапазоне концентраций от 0.1 до 100 мкМ, время инкубации 4 или 24 ч при температуре 23°C. В качестве положительного контроля брали ИУК в тех же концентрациях. Критерием наличия ауксиновой активности являлся подъем активности *GUS*, который измеряли количественно флуориметрическим методом [25] в белковых экстрактах проростков. Расчет активности репортерного белка осуществ-

ляли с нормированием на концентрацию белка в пробе, определяемого по методу Bradford.

*Биотест на ризогенезную активность бензихола, этихола и аквихола на проростках гороха (*Pisum sativum* L.), сорт “Шестинедельный”*

Сорт гороха “Шестинедельный” был отобран как наиболее чувствительный к действию испытуемых соединений из четырех сортов гороха после предварительных испытаний. Семена стерилизовали в растворе “Белизна” в течение 30 мин (стерилизация не влияла на всхожесть семян), многократно отмывали дистиллированной водой. Проращивали на 1/10 среды Мурасиге–Скуга в течение 3 дней, отбирали наклонившиеся семена по 15 штук на повторность и раскладывали на агаризованную среду (0.7% агар-агара, 1/10 минеральных солей по Мурасиге–Скугу). Каждый вариант состоял из 3-х повторностей. Среда содержала испытуемые вещества в концентрации 10 мкМ, отобранной после предварительных проб. Контролем служил вариант с индолил-3-уксусной кислотой. Растения выращивали в течение десяти дней, после чего подсчитывали количество боковых корней на главном корне, а также проводили промер длин главного корня.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского государственного фонда содействия развитию малых предприятий в научно-технической сфере и Инновационно-венчурным фондом Республики Татарстан [26].

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. Полевой В.В. // Физиология растений. М.: Высшая школа, 1989. С. 31–54.
2. Икрина М.А., Колбин А.М. // Регуляторы роста и развития растений. Т. 1. Стимуляторы. М.: Химия, 2004. 695 с.
3. Икрина М.А., Колбин А.М. // Регуляторы роста и развития растений. Т. 2. М.: Химия, 2005. 471 с.
4. Никелл Л.Дж. // Регуляторы роста растений. Применение в сельском хозяйстве. М.: Колос, 1984. 192 с.
5. Мельников Н.Н., Новожилков К.В., Белан С.Р., Пылова Т.Н. // Справочник по пестицидам. М.: Химия, 1985. С. 117.
6. Безлер Н.В., Панина Н.В., Гафуров Р.Г. // Агрохимия. 2006. Т. 32. С. 49–55.
7. Гафуров Р.Г., Еров Ю.В., Валиев Р.Г., Заринов Н.В., Саханов Р.Л., Безлер Н.В. // Проблемы агрохимии и экологии. 2017. № 2. С. 54–58.
8. Гафуров Р.Г. // Российский патент № 2211562 от 13.09.1999 “Регуляторы роста, развития и плодоношения растений”.
9. Гафуров Р.Г., Махмутова А.А. // Докл. РАН. 2003. Т. 391. С. 562–565.
10. Гафуров Р.Г., Махмутова А.А. // Прикл. биохим. микробиол. 2005. Т. 41. С. 243–249.
11. Кефели В.И., Чайлахян М.Х., Турецкая Р.Х., Коф Э.М., Кочанков В.Г., Ложникова В.Н., Хлопенкова Л.П., Янина Л.И., Комизерко Е.И., Мазин В.В., Фролова И.А., Яковлева Л.В., Власов П.В., Подольный В.З. // Физиология растений. 1975. Т. 22. С. 1291–1298.
12. Дерфлинг К. // Гормоны растений. Системный подход. М.: Мир, 1985. С. 33.
13. Гафуров Р.Г., Зефирова Н.С. // Доклады РАН. 2004. Т. 399. С. 422–424.
14. Гафуров Р.Г., Григорьев В.Ю., Прошин А.Н., Чистякова В.Г., Мартынов И.В., Зефирова Н.С. // Биоорганическая химия. 2004. Т. 30. С. 656–662. [Gafurov R.G., Grigor'ev V.Yu., Proshin A.N., Chistyakov V.G., Martynov I.V., Zefirova N.S. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2004. V. 30. P. 592–596.] <https://doi.org/10.1023/B:RUBI.0000049778.67576.cc>
15. О.А. Раевский. Моделирование соотношения “Структура–свойство”. М.: Добросвет, 2015. 288 с.
16. Ulmasov T., Murfett J., Hagen G., Guilfoyle T.J. // Plant Cell. 1997. V. 9. P. 1963–1971 <https://doi.org/10.1105/tpc.9.11.1963>
17. Savaldi-Goldstein S., Baiga T.J., Pojer F., Dabi T., Butterfield C., Geraint Parry G., Santner A., Dharmasiri N., Tao Y., Estelle M., Noel J.P., Chory J. // PNAS. 2008. V. 105. P. 15190–15195. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806324105>
18. Hayashi K., Kamio S., Oono Y., Townsend L.B., Nozaki H. // Phytochem. 2009. V. 70. P. 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.12.020>
19. Муромцев Г.С., Чканников Д.И., Кулаева О.Н., Гамбург К.З. // Основы химической регуляции роста и развития растений. М.: Агропромиздат, 1987. 383 с.
20. Панина Н.В. // Защита и карантин растений. 2005. Т. 3. С. 26.
21. Kolachevskaya O.O., Lomin S.N., Arkhipov D.V., Romanov G.A. // Plant Cell Rep. 2019. V. 38. P. 681–698. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02395-0>
22. Kolachevskaya O.O., Sergeeva L.I., Floková K., Getman I.A., Lomin S.N., Alekseeva V.V., Rukavtsova E.B., Buryanov Y.I., Romanov G.A. // Plant Cell Rep. 2017. V. 36. P. 419–435. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2091-y>
23. Кривошеев Д.М., Колячкина С.В., Михайлов С.Н., Тараров В.И., Ванюшин Б.Ф., Романов Г.А. // Доклады РАН 2012. Т. 444. С. 687–690. <https://doi.org/10.1134/S1607672912030155>
24. Гафуров Р.Г., Зефирова Н.С. // Вестник Моск. университета. Сер. 2. Химия. 2007. Т. 48. С. 60–64.

25. Зверева С.Д., Романов Г.А. // Физиология растений. 2000. Т. 47. С. 479–488.
26. Гафуров Р.Г., Григорьев В.Ю., Соколов В.Б., Костылев П.И., Метлина Г.В., Романов Г.А., Прошин А.Н., Загоскина Н.В., Безлер Н.В., Шаповал О.А. // Заключительный отчет по контракту № 10799р/19752 от 13.08.2012 с Российским государственным фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере. Черноголовка. ИФAB РАН, 2014. 278 с.

New Structural Fragments of Molecules of Chemical Regulators of Plant Growth and Development Stimulating Rhizogenesis

R. G. Gafurov*, #, I. V. Martynov*, and G. A. Romanov**

#E-mail: ravig@icp.ac.ru

*Institute of Physiologically Active Substances of the Russian Academy of Sciences,
Severnnyi proyezd 1, Moscow region, Chernogolovka, 142432 Russia

**Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, ul. Botanicheskaya 35, Moscow, 127276 Russia

Earlier, based on the results obtained using the biotest on the model of rooting of leaf and stem cuttings of beans, which was proposed by its authors as a specific test for auxins, it was concluded that auxin activity is inherent in benzyl alcohols, benzylamines and their quaternary ammonium derivatives. In the present work, it was found that these compounds do not have auxin activity. This was done using a quantitative molecular biotest on a model of three-day-old seedlings of the transgenic *Arabidopsis thaliana* L. transformed with a construct expressing the β -glucuronidase gene under the control of the auxin-sensitive DR5 semisynthetic promoter. As a result, it was found that the biotest on the model of rooting of leaf and stem bean cuttings is not specifically auxinic and reflects only the rhizogenous, but not proper auxin activity of the studied compounds. Using the biotest on the rhizogenesis effect of ten-day-old seedlings of peas (*Pisum sativum* L.) of the Six-Weekly variety, it was established that the studied stress-protectors-phytoregulators are comparable by rhizogenesis with natural auxin indolyl-3-acetic acid (IAA), although they are not auxins. This is consistent with previous data on rhizogenesis activity obtained on the models of rooting of leaf and stem cuttings of beans and germination of barley seeds. Thus, it has been shown that oxabenzyl –OBzl and azabenzyl –NHBzl groups are those structural elements that ensure high rhizogenic activity to chemical plant growth regulators.

Keywords: plant growth and development regulators, stress-protectors-phytoregulators, benzyhol, ethyhol, auxin, retardant, rhizogenesis activity, molecular biotest



УДК 577.113.4

ОДНОВРЕМЕННОЕ ВСТРАИВАНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ dU И dC В РАСТУЩУЮ ЦЕПЬ ДНК В РЕАКЦИИ УДЛИНЕНИЯ ПРАЙМЕРА И ПЦР

© 2020 г. А. В. Чудинов*, В. Е. Шершов*, А. С. Павлов*,
О. С. Волкова*, В. Е. Кузнецова*, А. С. Заседателей*, С. А. Лапа*, #

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

Поступила в редакцию 04.04.2020 г.

После доработки 15.04.2020 г.

Принята к публикации 18.04.2020 г.

Изучена субстратная эффективность модифицированных производных 2'-дезоксисуридин (mod-dUTP) и 2'-дезоксцитидин-5'-трифосфатов (mod-dCTP) при их одновременном введении в реакции удлинения праймера (PEX) и ПЦР с полной заменой природных дезокситимидина (dT) и дезоксцитидина (dC). Применены полимеразы с отсутствующей 3'-5' экзонуклеазной активностью: Taq и Vent (exo-), а также природные и сконструированные ДНК-матрицы. Получены фрагменты ДНК, модифицированные одновременно двумя типами нуклеотидов как с аналогичными, так и с различными функциональными группами. Исследования важны для получения аптамеров с расширенными свойствами.

Ключевые слова: модифицированные нуклеотиды, модифицированные ДНК, реакция удлинения праймера, ПЦР, аптамеры

DOI: 10.31857/S0132342320050061

ВВЕДЕНИЕ

Аптамеры – РНК- или ДНК-олигонуклеотиды, способные проявлять аффинное сродство к биомолекулам. Введение модификаций в аптамеры позволяет изменить их физико-химические свойства и увеличить сродство к их мишеням [1, 2]; наиболее широко применяются ферментативные методы с использованием модифицированных трифосфатов дезоксинуклеозидов. Одновременное встраивание нуклеотидов с различными модификациями в одну растущую цепь ДНК способно изменить свойства получаемых модифицированных аптамеров, аптазимов и ДНК-зондов [3]. В настоящей работе проанализированы особенности одновременного встраивания в растущую цепь ДНК модифицированных dUTP и dCTP как с аналогичными, так и с различными функциональными модификациями.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовали субстратные свойства модифицированных аналогов дезоксинуклеозидов (mod-dUTP и mod-dCTP), структуры которых приведе-

ны на рис. 1. Проводили реакцию удлинения праймера (PEX) и ПЦР при одновременном введении mod-dUTP и mod-dCTP в реакционную смесь с полным замещением природных dTTP и dCTP. Создавали пары dU + dC с аналогичными и с различными модификациями. В качестве матриц для PEX и ПЦР применяли синтетические олигонуклеотиды и бактериальную ДНК, соответственно. Использовали ДНК-полимеразы Taq и Vent (exo-). Синтетические матрицы содержали участки для последовательного включения 1, 2, 3 и 4 модифицированных нуклеотидов.

В PEX с синтетическими матрицами Taq-полимераза воспринимала модифицированные производные dU, но показала слабую субстратную совместимость с mod-dC. Выходы продукта около 30% удалось получить лишь для 5-пропинил-производного. Введение в реакцию dCTP с массивным заместителем (индол) приводило к получению неполноразмерных продуктов либо полному их отсутствию. В парах модифицированных dU + dC выход реакции зависел от более “сложного” для полимеразы субстрата в паре, а именно модифицированного dC, и не превышал 10%. Для модифицированных dU удалось получить полноразмерные продукты для dU-i и dU-p с выходом около 30%.

Полимераза Vent (exo-) показала способность встраивать субстрат с гетероциклической моди-

Сокращения: mod-dUTP – модифицированный 2'-дезоксисуридин-5'-трифосфат; mod-dCTP – модифицированный 2'-дезоксцитидин-5'-трифосфат.

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

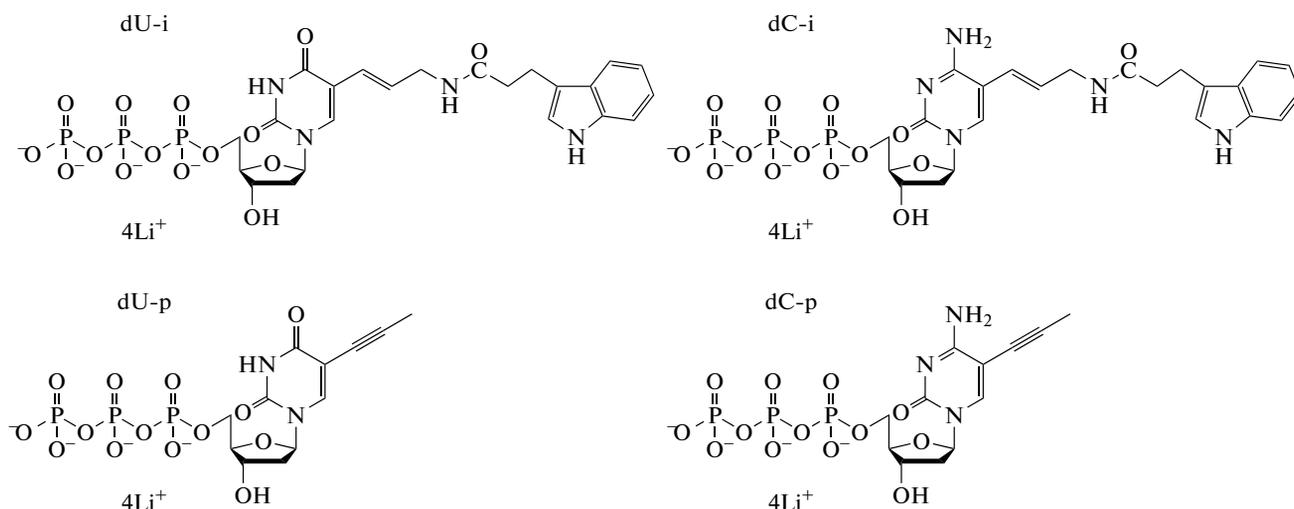


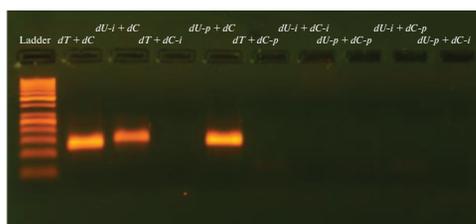
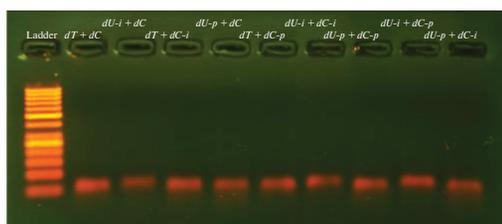
Рис. 1. Модифицированные трифосфаты дезоксиуридина (слева) и дезоксицитидина (справа). dU-i и dC-i – производные, содержащие на пиримидиновых основаниях фрагменты 3-индолпропионовой кислоты, dU-p и dC-p – производные, содержащие на пиримидиновых основаниях 5-пропинил.

(а) PEX

(б) PCR

Матрица M2UC

Taq



Матрица M2CU

Vent(exo-)

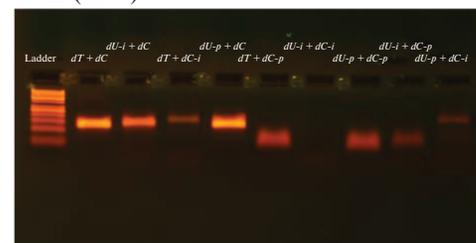
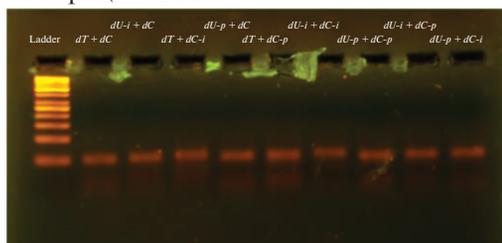


Рис. 2. (а) PEX с применением модельных матричных олигонуклеотидов M2UC и M2CU (длина 49 нт). На примере Vent (exo-) ДНК-полимеразы. Ladder – маркер длин продуктов GeneRuler 50bp; пары использованных dNTP указаны над соответствующими лунками геля. Сверху каждой фореграммы указана использованная синтетическая матрица. Различная подвижность продуктов в геле, по-видимому, обусловлена структурными различиями модификаций. При выбранном временном интервале элонгации праймера наблюдается наличие полноразмерных продуктов реакции. (б) ПЦР с применением бактериальной ДНК-матрицы. Сверху каждой фореграммы указана использованная полимеразы. Окрашивание бромистым этидием.

фикацией (индол). В парах с различными модификациями выход определялся наиболее сложным субстратом, как и в случае Taq-полимеразы. Однако, в случае Vent (exo-) во всех вариантах комбинаций удалось получить полноразмерные продукты. Результат проведения PEX с Vent (exo-) полимеразой представлен на рис. 2а.

В случае ПЦР использовали те же комбинации модифицированных трифосфатов. В качестве матрицы использовали фрагмент гена groB *Mycobacterium tuberculosis* длиной 126 п.о. [4]. На рис. 2б показан результат ПЦР как для индивидуального применения разноименных нуклеотидов (mod-dU или mod-dC), так и для совместного введения

(mod-dU + mod-dC) в различных комбинациях. Из электрофореграмм видно, что Taq-полимераза способна встраивать некоторые модифицированные dU, но модифицированные dC оказываются для нее более сложным субстратом, что хорошо коррелирует как с полученными ранее данными [5], так и с результатами РЕХ настоящего исследования.

Анализ методом ПЦР в режиме реального времени показывает, что производные с менее объемными функциональными группами (dU-p и dC-p) демонстрируют высокую скорость накопления продукта, в то время как массивные (dU-i и dC-i) демонстрируют либо пологую кривую накопления сигнала, либо задержку порогового цикла (C_t) в зависимости от использованной комбинации dU + dC. Поскольку в ПЦР временные интервалы элонгации праймеров гораздо меньше, чем в РЕХ, ингибирующее влияние модифицированных производных проявлялось сильнее. Увеличение времени элонгации праймеров может привести к большим выходам целевого продукта.

Наиболее сложным субстратом для Vent (exo-) оказался dC-i (индол). При индивидуальном применении для него удается получить полноразмерный продукт. Но в комбинации с модифицированными dU видно большое количество неполноразмерных продуктов.

Полимераза Vent (exo-) применима для проведения одновременного встраивания разноименных модифицированных трифосфатов в растущую цепь ДНК методом РЕХ при использовании матриц, содержащих последовательно от 1 до 4 повторов встраивания модифицированных производных. Показана возможность применения полимеразы Vent (exo-) в ПЦР для одновременного попарного введения разноименных модифицированных трифосфатов дезоксинуклеозидов (mod-dU + mod-dC) с различными модификациями. Эффективность амплификации зависит от природы введенных модификаций.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Модифицированные аналоги трифосфатов дезоксинуклеозидов

Соединения dU-i и dC-i синтезированы в ИМБ РАН, соединения dU-p и dC-p произведены Trilink Biotechnologies (США). Структуры соединений приведены на рис. 1.

ДНК-матрицы

В работе использован фрагмент гена groV *M. tuberculosis* [4] для ПЦР и синтетические ДНК-матрицы для РЕХ длиной 49 нт, последовательности которых приведены ниже,

M1C 5'-СТ**GGGG**СТСТ**GGG**СТСТ**GG**СТСТ**GT**-GGCTACCAGTATGGAGCTGACAG-3'
M1U 5'-СТ**AAAA**СТСТ**AAA**СТСТ**AA**СТСТ**ACT**-GGCTACCAGTATGGAGCTGACAG-3'
M2CU 5'-СТ**AGAG**СТСТ**GAG**СТСТ**AG**СТСТ**GT**-GGCTACCAGTATGGAGCTGACAG-3'
M2UC 5'-СТ**GAGA**СТСТ**AGA**СТСТ**GA**СТСТ**ACT**-GGCTACCAGTATGGAGCTGACAG-3'

Полужирным шрифтом отмечены нуклеотиды, комплементарные исследуемому. Курсивом выделен праймерный участок.

Реакция удлинения праймера (РЕХ)

Реакционная смесь содержала природные dATP и dGTP в концентрации 0.2 мМ каждого, а также различные сочетания трифосфатов дезоксинуклеозидов, указанные на рис. 2; 1.5 U Taq- либо 0.5 U Vent (exo-) ДНК-полимеразы (реакционный буфер соответствовал примененной полимеразе); праймер для РЕХ; одну из синтетических матриц. Реакцию проводили на ДНК-амплификаторе MiniCycler (MJ Research, США) по следующей программе: 5 мин при 95°C; далее 30 с при 65°C и 40 минут при 72°C.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Реакционная смесь для ПЦР была аналогична примененной для РЕХ. В качестве матрицы использовали фрагмент гена groV *M. Tuberculosis* и соответствующие праймеры. Температурно-временной профиль ПЦР состоял из предварительной денатурации при 95°C в течение 3 мин, за которой следовал 31 цикл: 95°C в течение 30 с, 65°C в течение 30 с, 72°C в течение 40 с и далее завершающая инкубация при 72°C в течение 5 мин.

ПЦР в режиме реального времени

Для визуализации процесса в реакционную смесь добавляли краситель EvaGreen (Biotium, Россия). Амплификацию проводили на приборе IQ5 (Bio-Rad, США).

Определение выхода продуктов амплификации

Полученные ПЦР-продукты разделяли в 4% агарозном геле. Окрашивание проводили бромидом этидия. Количество продукта оценивали по оптической плотности соответствующих полос в дорожках геля с использованием программы ImageJ (НИН, США).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование поддержано грантом РФФИ № 19-04-01217.

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. Rohloff J.C., Gelinas A.D., Jarvis T.C., Ochsner U.A., Schneider D.J., Gold L., Janjic N. // *Mol. Ther. Nucleic Acids*. 2014. V. 3. e201. <https://doi.org/10.1038/mtna.2014.49>
2. Tolle F., Mayer, G. // *Chem. Sci*. 2013. V. 4. P. 60–67. <https://doi.org/10.1039/c2sc21510a>
3. Gawande B.N., Rohloff J.C., Carter J.D., von Carlowitz I., Zhang C., Schneider D.J., Janjic N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. V. 114. P. 2898–2903. <https://doi.org/10.1073/pnas.1615475114>
4. Mikhailovich V., Lapa S., Gryadunov D., Sobolev A., Strizhkov B., Chernyh N., Skotnikova O., Irtuganova O., Moroz A., Litvinov V., Vladimirkii M., Perelman M., Cherenousova L., Erokhin V., Zasedatelev A., Mirzabekov A. // *J. Clin. Microbiol.* 2001. V. 39. P. 2531–2540. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.7.2531-2540.2001>
5. Лана С.А., Гусейнов Т.О., Павлов А.С., Шершов В.Е., Кузнецова В.Е., Заседателев А.С., Чуудинов А.В. // *Биоорганическая химия*. 2020. Т. 46. № 4. С. 411–417. [Lapa S.A., Gusejnov T.O., Pavlov A.S., Shershov V.E., Kuznetsova V.E., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // *Rus. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. P. 551–556.] [doi 10.1134/S106816202004010X](https://doi.org/10.1134/S106816202004010X)

Simultaneous Incorporation of Modified dU and dC Derivatives in the Growing DNA Chain Using PEX and PCR

A. V. Chudinov*, V. E. Shershov*, A. S. Pavlov*,
O. S. Volkova*, V. E. Kuznetsova*, A. S. Zasedatelev*, and S. A. Lapa*.*

*Phone: +7 (495) 135-98-00; fax: +7 (495) 135-14-05; e-mail: lapa@biochip.ru

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

The substrate efficiency of modified derivatives of 2'-deoxyuridine-(mod-dUTP) and 2'-deoxycytidine-5'-triphosphates (mod-dCTP) was studied in the regime of simultaneous incorporation using the primer elongation reaction (PEX) and PCR with complete replacement of natural deoxythymidine (dT) and deoxycytidine (dC). Polymerases with missing 3'-5' exonuclease activity were used: Taq and Vent (exo-), as well as natural and constructed DNA templates. DNA fragments modified simultaneously by two types of nucleotides with similar and different functional groups were obtained. Research is important for obtaining aptamers with extended properties.

Keywords: modified nucleotides, modified DNA, primer extension reaction, PCR, aptamers



УДК 57.083.18

МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ ПЦР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННОЙ ПНЕВМОНИИ

© 2020 г. С. А. Лапа^{*,#}, Е. С. Клочихина^{*}, Р. А. Мифтахов^{*},
А. М. Золотов^{*}, А. С. Заседателев^{*}, А. В. Чудинов^{*}

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

Поступила в редакцию 04.04.2020 г.

После доработки 16.04.2020 г.

Принята к публикации 20.04.2020 г.

Разработана и оптимизирована система мультиплексной ПЦР для быстрого выявления пяти основных возбудителей бактериальной пневмонии. Система может быть расширена для анализа возбудителей пневмонии вирусной (ДНК- и РНК-содержащие вирусы), а также грибковой природы.

Ключевые слова: инфекционная пневмония, мультиплексная ПЦР, диагностика

DOI: 10.31857/S0132342320050139

ВВЕДЕНИЕ

Инфекционная пневмония — острый воспалительный процесс легочной ткани, вызываемый широким рядом возбудителей бактериальной, вирусной и грибковой природы. Вспышки инфекционных пневмоний, вызванных коронавирусами SARS-CoV (2002–2003 г.), MERS-CoV (2012–2013 г.), SARS-CoV-2 (2019–?), вирусами гриппа А и В, а также бактериальных пневмоний, становятся реальной социальной угрозой. Бактериальные пневмонии характеризуются летальностью около 15%, при этом летальность в случаях тяжелого течения внебольничной пневмонии (ТВП) может достигать 21–58% [1], что сравнимо с таковыми показателями SARS (т.н. атипичная пневмония, ТОРС), MERS [2] и превышает этот показатель для CoViD-19 и гриппа.

Специализированные лечебные учреждения, в которые поступают пациенты с клиническим диагнозом “пневмония”, сталкиваются с проблемой установления этиологии заболевания и быстрой идентификации возбудителя, поскольку часто вирусные и бактериальные пневмонии характеризуются сходной клинической картиной. Ситуация резко обострилась с возникновением пандемии CoViD-19, для которого необходима своевременная дифференциальная диагностика вторичной бактериальной инфекции, часто возникающей как одно из осложнений при течении болезни.

От своевременной постановки точного диагноза зависит правильный подбор препаратов и стратегия лечения пациента [3]. Сложившаяся ситуация сигнализирует об острой необходимости создания экспресс-методов дифференциальной диагностики.

Разработана мультиплексная ПЦР для видового определения пяти основных возбудителей бактериальной пневмонии человека. Система ориентирована на применение в клинической диагностике для определения этиологии заболевания благодаря возможности дифференцировать бактериальную от вирусной и грибковой пневмонии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одними из наиболее распространенных возбудителей бактериальной пневмонии являются представители нескольких родов: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Klebsiella pneumoniae* и некоторые другие [4]. Для перечисленных пяти бактериальных видов были выбраны генетические мишени и сконструированы праймеры для осуществления мультиплексной ПЦР. При конструировании праймеров руководствовались требованием видовой специфичности и внутривидовой консервативности выбранных участков генетических мишеней, необходимым для надежной дифференциальной диагностики, например, ген *ebpS* для идентификации *S. aureus* [5] и ген *sidA* для *L. pneumophila* [6]. Учитывали необходимость получения различных длин ПЦР-продуктов для удобства идентификации возбудителя при электрофоретическом разделении.

Сокращения: ТОРС — тяжелый острый респираторный синдром; ТВП — тяжелая внебольничная пневмония; СТАВ — цетил-триметил аммоний бромид.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (495) 135-98-00; факс: +7 (495) 135-14-05; эл. почта: lapa@biochip.ru).

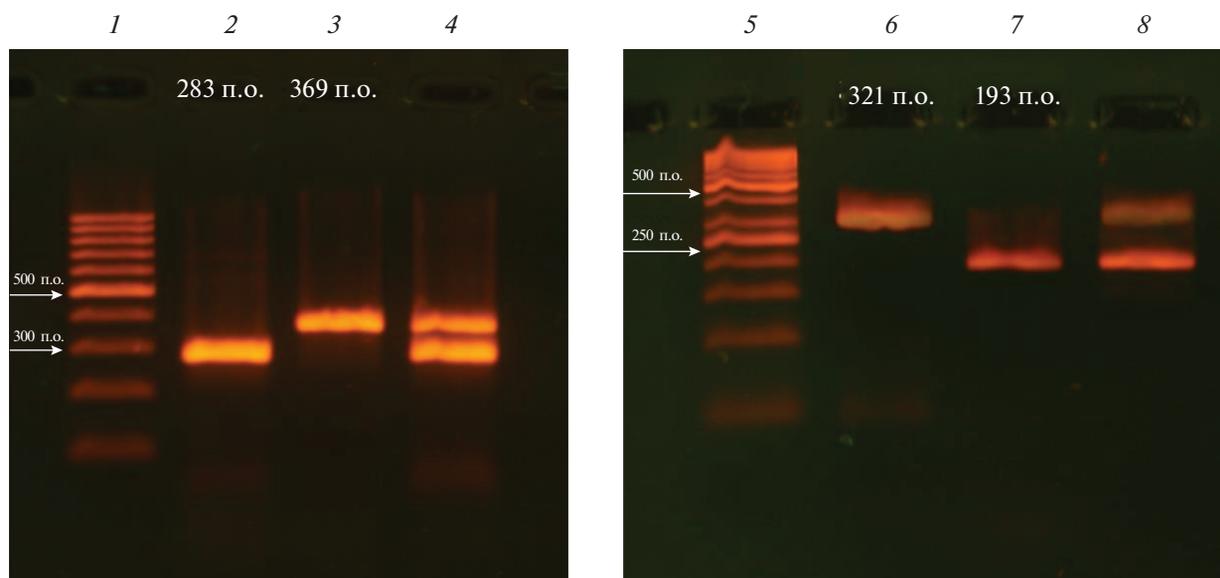


Рис. 1. Определение ДНК возбудителя электрофоретическим разделением ПЦР-продуктов. 1 – маркер длин ДНК GeneRuler 100bp (Thermo Scientific, США), 2 – *S. aureus*, 3 – *L. pneumophila*, 4 – *S. aureus* + *L. pneumophila*, 5 – маркер длин ДНК GeneRuler 50bp (Thermo Scientific, США), 6 – *P. aeruginosa*, 7 – *H. influenzae*, 8 – *P. aeruginosa* + *H. influenzae*. 4% агарозный гель, окрашивание бромистым этидием.

Для каждого праймера проводили процедуру BLAST-анализа, определяли его физико-химические характеристики, включая тестирование на наличие как внутри- так и межмолекулярных вторичных структур.

Проводили оптимизацию температурно-временного профиля ПЦР с применением градиентной ПЦР, а также состава компонентов буфера и концентрации каждого из праймеров в смеси. Экспериментально определяли специфичность праймеров к целевым и нецелевым мишеням (используя тотальную геномную ДНК каждого из тестируемых бактериальных штаммов), как в режиме применения индивидуальных ДНК-матриц, так и в режиме смесей ДНК нескольких возбудителей в одной пробирке. Установили, что праймеры обладают высокой специфичностью в смеси, содержащей ДНК различных микроорганизмов и способны выявлять исключительно свои специфические мишени, не давая ложноположительный результат при наличии в смеси неспецифичной ДНК.

Определяли чувствительность сконструированной тест-системы раститровкой ДНК каждого из анализируемых возбудителей, которая составила от 10^2 до 10^3 копий геномной ДНК на реакционную пробирку, в том числе при одновременном введении в смесь нескольких матриц.

Результат дифференциального обнаружения ДНК возбудителя в образце методом мультиплексной ПЦР показан на рис. 1.

Разработанная система может быть расширена для выявления возбудителей пневмонии вирус-

ной и грибковой природы. В настоящее время планируется проведение испытаний на клинических образцах, применение меченых производных dNTP для последующего анализа на биочипах, а также разработка математического алгоритма расчетов сигналов амплификации. Система подходит для диагностических лабораторий, специализирующихся на клинических анализах с использованием ПЦР.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы

В работе использована деконтаминированная полногеномная ДНК бактериальных штаммов из коллекции ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (п. Оболенск). Выделение ДНК из клеточных культур осуществляли СТАВ-методом [7].

Праймеры

Множественное выравнивание последовательностей геномных мишеней проводили с помощью алгоритма ClustalW (www.clustal.org). Конструирование праймеров осуществляли с помощью сетевого ресурса www.idtdna.com, анализ специфичности проводили с помощью алгоритма BLAST (NIH, США). Последовательности, видоспецифичность, генетические мишени и длина ПЦР-продуктов для всех использованных пар праймеров приведены ниже: *S. aureus*, ген *ebpS*, прямой *ebpS*-f (5'-ACTCGACTGAGGATAAAGC-

GTCT-3'), обратный *ebpS*-г (5'-CCTCCAAATATC-GCTAATGCACC-3'), длина продукта – 283 п.о.; *L. pneumophila*, ген *sidA*, прямой *sidA*-f (5'-TTC-CACTGGTGGGTGGGGTTTTG-3'), обратный *sidA*-г (5'-TCATGTTGGAGTTCTATGGCACC-3'), длина ПЦР-продукта – 369 п.о.; *H. influenzae*, ген *fucK*, прямой *fucK*-f (5'-TGCTCACTCAAC-GCTTAACTGGT-3'), обратный *fucK*-г (5'-TTCTGGGTAATGGTGTACGТАА-3'), длина ПЦР-продукта – 193 п.о.; *P. aeruginosa*, ген *oprL*, прямой *oprL*-f (5'-GCGTGCATCACCACSTTCTACT-3'), обратный *oprL*-г (5'-TTCTTCAGCTCGACGCGAC-GGTT-3'), длина ПЦР-продукта – 321 п.о.; *K. pneumoniae*, ген *mpaA*, прямой *mpaA*-f (5'-ATCAATAGCAATTAAGCACAААА-3'), обратный *mpaA*-г (5'-TCATAATCACCSTTTAGGATA-3'), длина ПЦР-продукта – 177 п.о.

Мультиплексная ПЦР

Реакционная смесь (30 мкл) содержала 1.5 единицы Taq-полимеразы (Thermo Scientific, США) в буфере той же фирмы, dNTP в концентрации 200 мкМ каждого, пять пар специфичных праймеров и полногеномную бактериальную матрицу (либо смесь бактериальных ДНК). Реакцию проводили на ДНК-амплификаторе MiniCycler (MJResearch, США) при следующих условиях: 95°C в течение 5 мин (начальная денатурация); 36 циклов по 20 с при 95°C, 30 с при 66°C и 40 с при 72°C; завершающая инкубация в течение 5 мин при 72°C. Градиентную ПЦР и определение чувствительности системы с помощью ПЦР в режиме реального времени проводили на амплификаторе IQ5 (BioRad, США). Продукты ПЦР разделяли в 4% агарозном геле, окрашивали бромистым этидием. Тип анализируемой ДНК определяли по длинам продуктов амплификации (рис. 1).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование поддержано грантом РФФ № 20-14-00287.

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. *Sligl W.I., Marrie T.J.* // Crit. Care. Clin. 2013. V. 29. P. 563–601. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2013.03.009>
2. *Song Z., Xu Y., Bao L., Zhang L., Yu P., Qu Y., Zhu H., Zhao W., Han Y., Qin C.* // Viruses. 2019. V. 11. E59. <https://doi.org/10.3390/v11010059>
3. *Harris M., Clark J., Coote N., Fletcher P., Harnden A., McKean M., Thomson A.* // Thorax. 2011. 66:ii1ei23. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2011-200598>
4. *Han Y.C., Woo J.H.* // Respirology. 1996. V. 1. P. 115–122. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.1996.tb00019.x>
5. *Liu Y., Cao Y., Wang T., Dong Q., Li J., Niu C.* // Front. Microbiol. 2019. V. 10. A222. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00222>
6. *Tabatabaei M., Hemati Z., Moezzi M.O., Azimzadeh N.* // Mol. Biol. Res. Commun. 2016. V. 5. P. 215–223.
7. *Doyle J.J., Doyle J.L.* // Phytochemical Bulletin. 1987. V. 19. P. 11–15.

Multiplex PCR for Detection of Bacterial Pathogens of Infectious Pneumonia

S. A. Lapa*, #, E. S. Klochikhina*, R. A. Miftakhov*,
A. A. Zolotov*, A. S. Zasedatelev*, and A. V. Chudinov*

*Phone: +7 (495) 135-98-00; fax: +7 (495) 135-14-05; e-mail: lapa@biochip.ru

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

A multiplex PCR system has been developed and optimized for rapid detection of the five main pathogens of bacterial pneumonia. The system can be expanded to analyze viral pathogens of pneumonia (DNA- and RNA-containing viruses), as well as fungal nature.

Keywords: infectious pneumonia, multiplex PCR, diagnosis



УДК 547.782

СИНТЕЗ И ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОНФОРМАЦИОННО-ФИКСИРОВАННЫХ ИНДОЛЬНОГО И ИНДОЛИНОВОГО ПРОИЗВОДНЫХ ХРОМОФОРА GFP

© 2020 г. Н. С. Балеева^{*,#}, А. Ю. Смирнов^{*}, И. Н. Мяснянко^{*}, М. С. Баранов^{*,**}^{*}ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10^{**}Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Поступила в редакцию 09.04.2020 г.

После доработки 11.04.2020 г.

Принята к публикации 13.04.2020 г.

Синтезированы новые конформационно-фиксированные аминокислотные производные хромофора GFP, содержащие индольный и индолиновый фрагменты. Изучены оптические свойства полученных соединений. Установлено, что введение индолинового фрагмента позволяет сместить максимумы поглощения и испускания в более длинноволновую область и стабилизировать величину квантового выхода флуоресценции. Введение индольного фрагмента приводит к гипсохромному сдвигу и резкому уменьшению интенсивности флуоресценции.

Ключевые слова: имидазолы, хромофоры, флуоресцентные красители, зеленый флуоресцентный белок, GFP, оптические свойства

DOI: 10.31857/S0132342320050048

Изучение процессов, происходящих в живых организмах невозможно без современных методов визуализации, среди которых наибольшую популярность приобрела флуоресцентная микроскопия. Возрастающий круг задач, решаемых с помощью этого метода, требует все большего разнообразия используемых маркеров. В качестве основы для создания такого типа соединений все чаще встречаются производные хромофора зеленого флуоресцентного белка (GFP), так как они имеют небольшой размер, хорошо растворимы в воде, нетоксичны и характеризуются большим разнообразием оптических свойств [1–3]. Разработанные подходы к внешней или внутренней фиксации бензилиденового фрагмента этих молекул позволяют многократно увеличивать квантовый выход флуоресценции и использовать их в роли флуорогенных [4–9] или флуоресцентных [10–15] красителей.

Ранее нами было показано, что замена гидроксильной группы бензилиденового фрагмента производных хромофора GFP на аминокислотную позво-

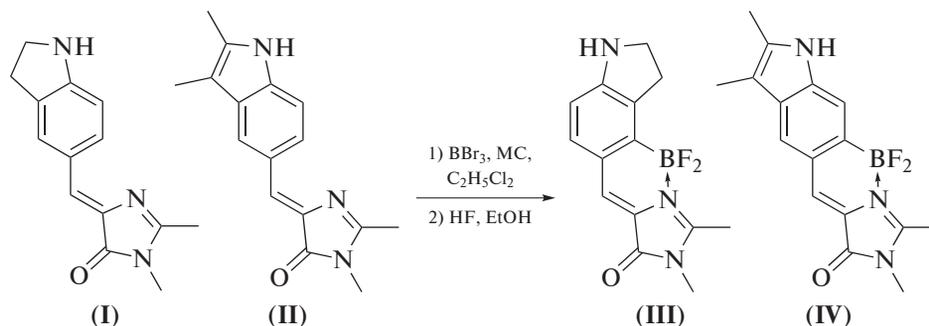
ляет сместить положение спектральных максимумов в длинноволновую область [11–13]. Однако наличие свободных алкильных заместителей при атоме азота часто обуславливает заметное варьирование величины квантового выхода флуоресценции этих веществ в различных растворителях. Избежать этой проблемы позволяет введение разнообразных циклических групп. В частности, эффективным оказалось введение в молекулы тетра- и дигидрохинолинового фрагмента (соединения (V) и (VI), схема 1).

В данной работе мы продолжили свое исследование в этом направлении и создали похожие конформационно-фиксированные производные, содержащие индолиновый и индольный фрагменты (соединения (III) и (IV), схема 1). Эти вещества были получены по классической схеме из имидазолонов (I) и (II). Введение дифторборильной группы проводилось в дихлорэтаноле в присутствии трибромид бора и молекулярных сит (схема 1). Удивительным результатом оказался тот факт, что в случае соединения (I) борирование приводило к образованию стерически более нагруженного продукта, чего не наблюдалось ранее для соединения (V).

Сокращения: GFP – зеленый флуоресцентный белок; MS – молекулярные сита.

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

Данная работа:



Прошлые работы:

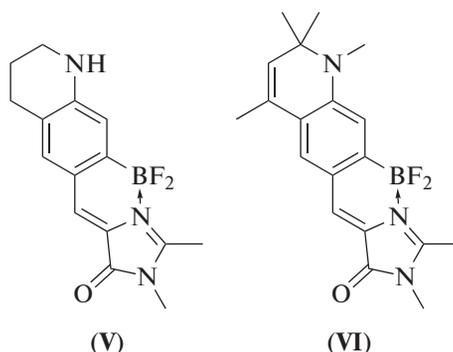


Схема 1. Схема синтеза производных (III) и (IV) и строение производных (V) и (VI).

Изучение оптических свойств полученных веществ показало, что индолиновый аналог (III) характеризуется заметным батохромным смещением максимумов поглощения и испускания относительно GFP и соответствующего ему хромофора, а также не отличается заметным варьированием квантового выхода флуоресценции в разных растворителях в отличие от родственных веществ с подвижными алкильными группами. Тем не менее отличия от соединения (V) для этого индолинового производного оказались не велики (рис. 1, табл. 1). Неожиданно было обнаружено, что полученное нами индольное производное (IV) и вовсе характеризуется весьма коротковолновым положением максимумов (рис. 1), более того, для него также было обнаружено резкое падение интенсивности эмиссии – квантовый выход флуоресценции снизился до ~1% во всех растворителях.

Таким образом, можно заключить, что индолиновое производное фиксированного хромофора GFP может быть использовано в качестве основы для новых флуоресцентных красителей и сенсоров, в то время как введение индольного фрагмента в подобные красители представляется нецелесообразным.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР (δ , м.д.; J , Гц) зарегистрированы на приборе Bruker Avance III (700 МГц, США)

при 303 К в $\text{DMSO}-d_6$ (внутренний стандарт – Me_4Si). 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.

Z-5-(Аминобензилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4оны. Соответствующий ароматический альдегид (5 ммоль) растворяли в хлороформе (25 мл), к полученному раствору добавляли раствор метиламина (40% водный, 2 мл), каталитическое количество пирролидина (0.05 ммоль) и безводный Na_2SO_4 (5 г). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 48 ч, после чего отфильтровывали, дополнительно сушили над безводным Na_2SO_4 и упаривали на роторном испарителе. К полученному остатку добавляли этил(метоксиэтилиден)аминоацетат и выдерживали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 24 ч. Затем реакционную смесь упаривали на роторном испарителе. Полученный продукт дополнительно очищали методом колоночной хроматографии (элюент – хлороформ–этиловый спирт, 50 : 1).

Z-5-(Индолин-5-илметил)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4он (I). Желтый порошок

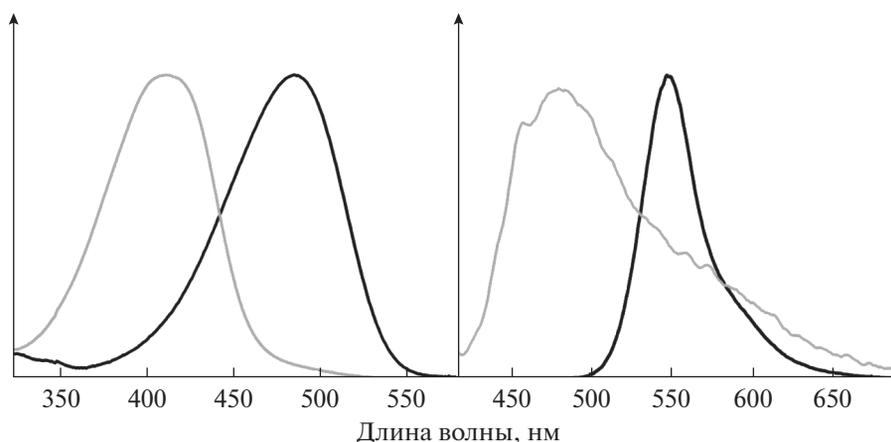


Рис. 1. Нормализованные спектры поглощения (слева) и испускания (справа) соединений (III) (черный) и (IV) (серый) в ацетонитриле.

(0.73 г, 60%); т. пл. 221–224°C; ¹H-ЯМР: 8.03 (с, 1H), 7.70 (д, *J*₂ 8.0, 1H), 6.81 (с, 1H), 6.48 (д, *J*₂ 8.2, 1H), 6.40 (с, 1H), 3.54 (т, *J*₂ 8.6, 2H), 3.07 (с, 3H), 2.98 (т, *J*₂ 8.5, 2H), 2.30 (с, 3H); ¹³C-ЯМР: 169.6, 159.7, 154.9, 134.0, 133.8, 129.2, 128.0, 127.0, 122.7, 107.1, 46.2, 28.2, 26.1, 15.1; HRMS (ESI) *m/z*: найдено М 242.1295; рассчитано для C₁₄H₁₆N₃O⁺, [M + H]⁺ 242.1288.

Z-5-((2,3-Диметил-1H-индол-5-ил)метил)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4он (II). Желтый порошок (1.23 г, 92%); т. пл. 294–297°C; ¹H-ЯМР: 10.93 (с, 1H), 8.17 (с, 1H), 8.06 (д, *J*₂ 8.4, 1H), 7.27 (д, *J*₂ 8.4, 1H), 7.06 (с, 1H), 3.10 (с, 3H), 2.35 (с, 3H), 2.31 (с, 3H), 2.18 (с, 3H); ¹³C-ЯМР: 169.9, 161.3, 136.3, 135.7, 132.6, 129.2, 128.1, 124.5, 124.4, 123.1, 110.5, 106.3, 26.1, 15.2, 11.1, 8.2; HRMS (ESI) *m/z*: найдено М 268.1449; рассчитано для C₁₆H₁₈N₃O⁺, [M + H]⁺ 268.1444.

Z-5-((Дифторборанил)аминобензильден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4оны. Соответствующий имидазолон (2 ммоль) растворяли в дихлорэтано (100 мл), к полученному раствору добавляли молекулярные сита (8 г 3Å и 8 г Å) и трибромид бора (8 ммоль). Полученную смесь кипятили в течение 3 часов (для соединения II перемешивали при комнатной температуре в течение 96 ч). Полученную смесь охлаждали и фильтровали, сита

промывали этиловым спиртом (2 × 10 мл). К полученному фильтрату добавляли раствор плавиковой кислоты (40% водный, 4 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут. Смесь разбавляли этилацетатом (100 мл), промывали водным раствором карбоната калия (5%, 2 × 50 мл), водой (2 × 50 мл) и насыщенным раствором хлорида натрия (2 × 50 мл). Полученный раствор сушили над безводным Na₂SO₄ и упаривали на роторном испарителе. Полученный продукт дополнительно очищали методом колоночной хроматографии (элюент – хлороформ–этиловый спирт, 50 : 1).

Z-5-((4-(Дифторборанил)индолин-5-ил)метил)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4он (III). Оранжевый порошок (0.1 г, 18%); т. пл. около 300°C с разложением; ¹H-ЯМР: 7.41 (с, 1H), 7.25 (д, *J*₂ 8.1, 1H), 6.98 (с, 1H), 6.41 (д, *J*₂ 8.1, 1H), 3.61 (т, *J*₂ 8.6, 2H), 3.21 (с, 3H), 3.05 (т, *J*₂ 8.6, 2H), 2.67(с, 3H); ¹³C-ЯМР: 161.9, 159.8, 156.8, 135.4, 133.1, 130.6, 122.8, 120.5, 106.4, 46.1, 27.6, 26.2, 12.5; HRMS (ESI) *m/z*: найдено М 290.1277; рассчитано для C₁₄H₁₅BF₂N₂O⁺, [M + H]⁺ 290.1271.

Z-5-((6-(Дифторборанил)-2,3-диметил-1H-индол-5-ил)метил)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4он (IV). Оранжевый порошок (0.06 г, 10%); т. пл. около 300°C с разложением; ¹H-ЯМР: 11.18 (с, 1H), 7.82 (с, 1H), 7.72 (с, 1H), 7.48 (с, 1H),

Таблица 1. Оптические свойства соединений (III), (IV), (V) и (VI) в ацетонитриле

Соединение	Максимум поглощения	Максимум эмиссии	Коэффициент молярного поглощения	Квантовый выход флуоресценции
(III)	486	549	39000	59%
(IV)	412	480	30000	1%
(V)	487	547	44000	67%
(VI)	515	595	35000	57%

3.23 (с, 3H), 2.73 (с, 3H), 2.50 (с, 1H), 2.25 (с, 1H); ¹³C-ЯМР: 163.6, 162.7, 138.7, 132.9, 131.6, 128.2, 124.5, 124.0, 114.3, 109.4, 106.6, 26.4, 15.0, 12.8, 8.2; HRMS (ESI) *m/z*: найдено *M* 316.1429; рассчитано для C₁₆H₁₇BF₂N₃O⁺, [*M* + H]⁺ 316.1427.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 18-03-00094_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., Bommaris A.S., Duraj-Thatte A.M., Azizi B., Tolbert L.M., Solntsev K.M. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2015. V. 27. P. 64–74.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.06.002>
- Baleeva N.S., Baranov M.S. // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2016. V. 52. P. 444–446.
<https://doi.org/10.1007/s10593-016-1909-4>
- Yampolsky I.V., Kislukhin A.A., Amatov T.T., Shcherbo D., Potapov V.K., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // *Bioorg. Chem.* 2008. V. 36. P. 96–104.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2007>
- Feng G., Luo C., Yi H., Yuan L., Lin B., Luo X., Hu X., Wang H., Lei C., Nie Z., Yao S. // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. P. 10380–10392.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx803>
- Filonov G.S., Moon J.D., Svensen N., Jaffrey S.R. // *J. Am. Chem. Soc.* 2014. V. 136. P. 16299–16308.
<https://doi.org/10.1021/ja508478x>
- Ge S., Deng H., Su Y., Zhu X. // *RSC Adv.* 2017. V. 7. P. 17980–17987.
<https://doi.org/10.1039/C7RA00974G>
- 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. Commun.* 2019. V. 55. P. 2537–2540.
<https://doi.org/10.1039/C8CC10007A>
- Paige J.S., Wu K.Y., Jaffrey S.R. // *Science.* 2011. V. 333. P. 642–646.
<https://doi.org/10.1126/science.1207339>
- Povarova N.V., Zaitseva S.O., Baleeva N.S., Smirnov A.Yu., Myasnyanko I.N., Zagudaylova M.B., Bozhanova N.G., Gorbachev D.A., Malyshevskaya K.K., Gavrikov A.S., Mishin A.S., Baranov M.S. // *Chem. – A Eur. J.* 2019. V. 25. P. 9592–9596.
<https://doi.org/10.1002/chem.201901151>
- Zaitseva S.O., Farkhutdinova D.A., Baleeva N.S., Smirnov A.Yu., Zagudaylova M.B., Shakhov A.M., Astafiev A.A., Baranov M.S., Bochenkova A.V. // *RSC Adv.* 2019. V. 9. P. 38730–38734.
<https://doi.org/10.1039/C9RA08808C>
- Baleeva N.S., Myannik K.A., Yampolsky I.V., Baranov M.S. // *Eur. J. Org. Chem.* 2015. V. 2015. P. 5716–5721.
<https://doi.org/10.1002/ejoc.201500721>
- Baleeva N.S., Zaitseva S.O., Gorbachev D.A., Zagudaylova M.B., Baranov M.S. // *Eur. J. Org. Chem.* 2017. V. 35. P. 5219–5224.
<https://doi.org/10.1002/ejoc.201700805>
- Baranov M.S., Solntsev K.M., Baleeva N.S., Mishin A.S., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A., Yampolsky I.V. // *Chem. Eur. J.* 2014. V. 20. P. 13234–13241.
<https://doi.org/10.1002/chem.201403678>
- Wu L., Burgess K. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. P. 4089–4096.
<https://doi.org/10.1021/ja710388h>
- Baldrige A., Solntsev K.M., Song C., Tanioka N., Kowalik J., Hardcastle K., Tolbert L.M. // *Chem. Comm.* 2010. V. 46. P. 5686–5688.
<https://doi.org/10.1039/B927313A>

Synthesis and Optical Properties of the Conformationally Locked Indole and Indoline Derivatives of GFP Chromophore

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

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

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

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

We report novel conformationally locked GFP chromophore amino-derivatives containing indole and indoline moieties. Optical properties of the obtained compounds were studied. The introduce of the indoline group allows to shift the absorption and emission maxima to the long-wavelength region and stabilize the quantum yield of fluorescence. The introduce of the indole group leads to hypsochromic shift and noticeable decrease of fluorescence intensity.

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



УДК 577.15.08

ПОЛИКОНДЕНСАЦИЯ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ И ТИТАНА НА МАТРИЦАХ ИЗ ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРОВ

© 2020 г. Ю. Н. Шкрыль*.,# , А. И. Дегтяренко* ,
Т. Ю. Горпенченко* , Т. В. Авраменко* , В. П. Булгаков*

*ФГБУН “Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии” Дальневосточного
отделения Российской академии наук, Россия, 690022 Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159

Поступила в редакцию 28.03.2020 г.

После доработки 30.03.2020 г.

Принята к публикации 31.03.2020 г.

Исследована способность некоторых природных и синтетических полимеров служить в качестве катализатора и темплата для поликонденсации оксида кремния и титана из водорастворимых предшественников тетраakis(2-гидроксиэтил)ортосиликата (ТГЭОС) и титан бис(аммоний лактат)дигидроксида (ТБАЛДГ). Каталитический потенциал исследованных полимеров оценивали спектрофотометрическим методом, а размер, форму и элементный состав образующихся структур определяли методами сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС). Показано, что альбумин и полиэтиленмин могут применяться для получения частиц SiO₂ и TiO₂ соответственно. Такие гомополимеры как поли-D- и поли-L-лизин эффективно катализируют синтез как кремниевых, так и титановых нанокompозитных материалов.

Ключевые слова: диоксид кремния, диоксид титана, нанокompозит, тетраakis(2-гидроксиэтил)ортосиликат, титан бис(аммоний лактат)дигидроксида

DOI: 10.31857/S0132342320050218

Наночастицы диоксида кремния и титана применяются в качестве опорных структур для полимерных трансплантов, инертных матриц для катализаторов, в системах контролируемого высвобождения биологически активных молекул, а также в прототипах новейших оптических компонентов биосенсоров [1, 2]. Разнообразные синтетические подходы, используемые для получения кремниевых и титановых нанокompозитов часто связаны с использованием экстремальных значений температуры, pH, давления и др.

Биоминерализация используется в природе для построения сложных скелетов организмами из двух отдаленных таксонов — диатомеями и губками. Особые белки — силикатеины и силаффины

направляют формирование упорядоченных кремниевых структур на нано- и микрометровом масштабе, создавая конструкции, обладающие выдающимися физическими характеристиками [3]. Как сами белки, так и белковые и небелковые полимеры, разработанные на их основе способны катализировать биомиметический синтез нанокompозитных материалов диоксида кремния и титана в условиях *in vitro* [4–6]. Однако использованию таких специализированных биополимеров в технологическом синтезе биоминералов препятствует их высокая стоимость и сложность получения.

В настоящей работе мы проверили возможность использования относительно недорогих и доступных полимеров природного и синтетического происхождения выступать в качестве катализатора и темплата для поликонденсации диоксида кремния и титана. При этом в качестве предшественников были использованы новые водорастворимые субстраты, тетраakis(2-гидроксиэтил)ортосиликата (ТГЭОС) и титан бис(аммоний лактат)дигидроксида (ТБАЛДГ), которые не требуют предвари-

Сокращения: БСА — бычий сывороточный альбумин; ЛПЭИ — линейный полиэтиленмин; МГЛ — миоглобин лошади; ПДЛ — поли-D-лизин; РПЭИ — разветвленный полиэтиленмин; ПЛЛ — поли-L-лизин; ПХ — пероксидаза хрена; ТБАЛДГ — титан бис(аммоний лактат)дигидроксида; ТГЭОС — тетраakis(2-гидроксиэтил)ортосиликат.

Автор для связи: (тел.: +7 (423) 231-04-10; эл. почта: yn80@mail.ru).

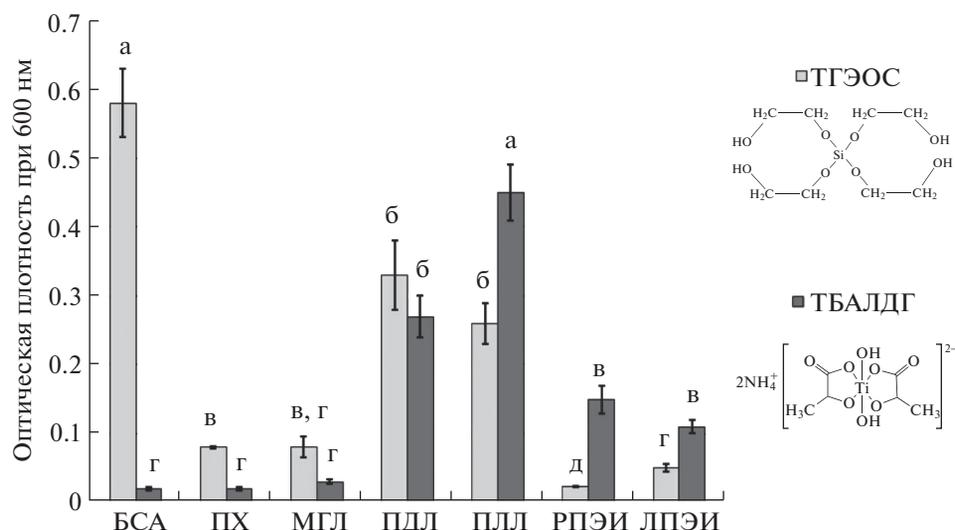


Рис. 1. Сравнение эффективности поликонденсации ТГЭОС и ТБАЛДГ под действием природных и синтетических полимеров. Показаны средние значения и стандартные ошибки по результатам трех экспериментов. Разные буквы над столбцами указывают значимые различия средних значений для каждого из предшественников, $P < 0.05$ (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Фишера).

тельного гидролиза, отличаются высокой реакционной способностью и биосовместимостью [7, 8]. Поликонденсацию ТГЭОС (ABCR, Германия) и ТБАЛДГ (Sigma, США) в концентрации 10 мМ проводили в фосфатно-солевом буфере (рН 7.4), при комнатной температуре (24°C) в течение 16 часов при постоянном перемешивании в присутствии 10 мг/мл следующих полимеров: бычий сывороточный альбумин (БСА), пероксидаза хрена (ПХ), миоглобин лошади (МГЛ), поли-L- и поли-D-лизин (ПЛЛ и ПДЛ соответственно), разветвленный и линейный полиэтиленимин (РПЭИ и ЛПЭИ соответственно). Первичную оценку эффективности реакции проводили по возрастанию в растворе количества взвешенных частиц, что выражалось в увеличении оптической плотности при 600 нм. Морфологию и состав образованных структур определяли с помощью электронного сканирующего микроскопа Merlin (Carl Zeiss, Германия) с приставкой для энергодисперсионного микроанализа.

Такие полимеры как БСА, ПХ, МГЛ, РПЭИ и ЛПЭИ не проявляли значительной каталитической активности в отношении ТГЭОС (рис. 1). При этом наибольшая эффективность формирования SiO_2 отмечена для БСА, за которым следуют ПДЛ и ПЛЛ, активность которых уменьшалась в 1.8 и 2.2 раза соответственно, по сравнению с БСА (рис. 1). В результате реакции образовались сферические частицы кремнезема, размер которых варьи-

ровал от 50 нм (ПДЛ) до 1 мкм (БСА) (рис. 2а–2в). Все синтетические полимеры были способны индуцировать поликонденсацию ТБАЛДГ, тогда как белковые матрицы оказались неактивны в отношении этого субстрата. Эффективность поликонденсации в данном случае убывала в ряду ПЛЛ > ПДЛ > РПЭИ > ЛПЭИ (рис. 1). Образовавшиеся гибридные полимер-диоксид титановые композиты представлены сферическими структурами от 30 нм (ЛПЭИ) до 200 нм (РПЭИ) (рис. 2г–2е). ЭДС-спектр показывает присутствие характерных линий O, а также Si и Ti в соответствующих образцах (рис. 2). Это доказывает, что полученные нанокомпозитные гранулы состоят из оксидов кремния и титана. Присутствуют также пики C – материал подложки и Sr – предварительно нанесенный проводящий слой.

Морфология частиц, описанных в данной работе, имеет значительное сходство с частицами SiO_2 и TiO_2 , полученными ранее с использованием биополимеров из губок и диатомей [5, 6, 9]. Такой результат может указывать на наличие универсальных фундаментальных принципов биоминерализации и возможности их трансляции в инновационные синтетические подходы для производства биомиметических органических и неорганических гибридных материалов. Описанная способность доступных полимеров к поликонденсации оксидов кремния и титана может быть в дальнейшем

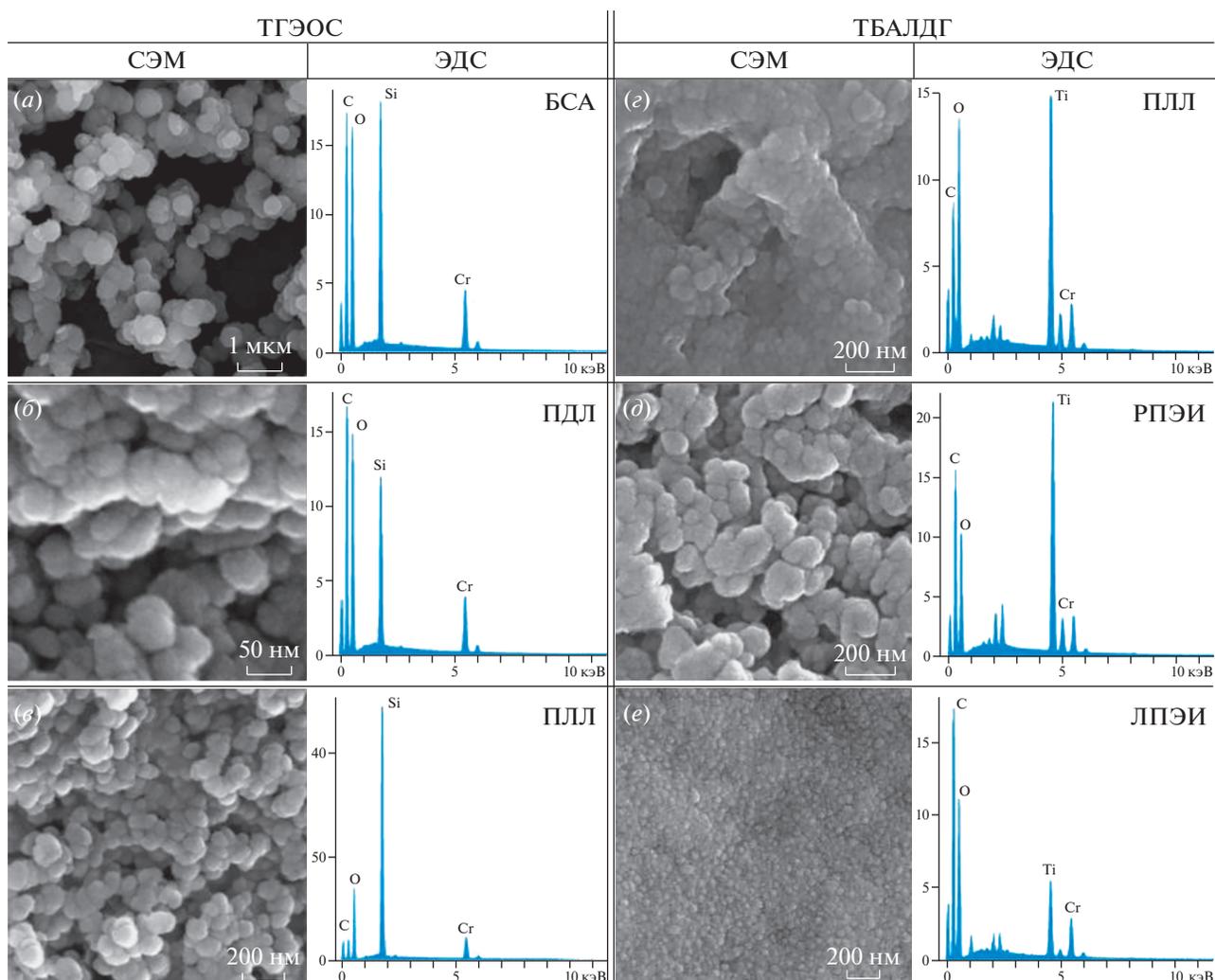


Рис. 2. СЭМ изображение и ЭДС спектр кремниевых и титановых наноконкомпозитов, полученных с различными полимерными матрицами.

испробована для получения упорядоченных наноструктур на различных поверхностях.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа поддержана грантом ДВО РАН 18-3-045. СЭМ выполнена с использованием оборудования ЦКП “Биотехнология и генетическая инженерия” ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН.

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. Singh P., Srivastava S., Singh S.K. // ACS Biomater. Sci. Eng. 2019. V. 5. P. 4882–4898. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00464>
2. Haider A.J., Jameel Z.N., Al-Hussaini I.H.M. // Energy Procedia. 2019. V. 157. P. 17–29. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.11.159>
3. Aguilar-Camacho J.M., Doonan L., McCormack G.P. // Mol. Phylogenet. Evol. 2019. V. 131. P. 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.11.159>
4. Shkryl Y.N., Bulgakov V.P., Veremeichik G.N., Kovalchuk S.N., Kozhemyako V.B., Kamenev D.G., Semiletova I.V., Timofeeva Y.O., Shchipunov Y.A., Kulchin Y.N. // Bioprocess Biosyst. Eng. 2016. V. 39. P. 53–58. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1488-2>
5. Shimizu K., Morse D.E. // Methods Enzymol. 2018. V. 605. P. 429–455. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.02.025>

6. Buckle E.L., Roehrich A., Vandermoon B., Drobny G.P. // *Langmuir*. 2017. V. 33. P. 10517–10524. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01048>
7. Поварова Н.В., Баранов М.С., Ковальчук С.Н., Семилетова И.В., Лукьянов К.А., Кожемяко В.Б. // *Биоорганическая химия*. 2015. Т. 41. С. 380–382. [Povarova N.V., Baranov M.S., Kovalchuk S.N., Semiletova I.V., Lukyanov K.A., Kozhemyako V.B. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2015. V. 41. P. 338–339.] <https://doi.org/10.7868/S0132342315030070>
8. Hernández-Gordillo A., Hernández-Arana A., Camperocelis A., Vera-Robles L.I. // *RSC Adv.* 2019. V. 9. P. 34559–34566. <https://doi.org/10.1039/C9RA05923G>
9. Шкрыль Ю.Н., Семилетова И.В., Непомнящий А.В., Ковальчук С.Н., Веремейчик Г.Н., Авраменко Т.В., Булгаков В.П., Щипунов Ю.А., Вознесенский С.С., Кожемяко В.Б. // *Биоорганическая химия*. 2018. Т. 44. С. 465–467. [Shkryl Y.N., Semiletova I.V., Nepomnyaschiy A.V., Kovalchuk S.N., Veremeichik G.N., Avramenko T.V., Bulgakov V.P., Shchipunov Y.A., Voznesenskiy S.S., Kozhemyako V.B. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2018. V. 44. P. 469–471.] <https://doi.org/10.1134/S0132342318040188>

Polycondensation of Silicon and Titanium Dioxide Precursors on the Natural and Synthetic Polymeric Matrices

Y. N. Shkryl^{*,#}, A. I. Degtyarenko^{*}, T. Y. Gorpenchenko^{*}, T. V. Avramenko^{*}, and V. P. Bulgakov^{*}

[#]Phone: +7 (423) 231-04-10; e-mail: yn80@mail.ru

^{*}Federal Scientific Centre of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. 100-letia Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022 Russia

In this report we investigated the ability of some natural and synthetic polymers to serve as a catalyst and a template for the polycondensation of silicon and titanium dioxides from their water-soluble precursors – tetrakis(2-hydroxyethyl)orthosilicate (THEOS) and titanium bis(ammonium lactato)dihydroxide (TiBALDH). The catalytic potential of the studied polymers was estimated spectrophotometrically, and the size, shape and elemental composition of the resulting structures were determined by scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive x-ray spectroscopy (EDS). It was shown that albumin and polyethyleneimine can be used to obtain SiO₂ and TiO₂ particles, respectively. Such homopolymers as the poly-D- and poly-L-lysine efficiently catalyze the synthesis of both silicon and titanium nanocomposite materials.

Keywords: silicon dioxide, titanium dioxide, nanocomposite, tetrakis(2-hydroxyethyl)orthosilicate, titanium bis(ammonium lactato)dihydroxide