СОДЕРЖАНИЕ

Том 48, номер 1, 2022

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

Супрамолекулярные системы на основе макроциклических соединений с протеинами. Перспективы применения (обзорная статья)

Н. Ш. Лебедева, О. И. Койфман 3

Гетероциклические аналоги ресвератрола – синтез и физиологическая активность. Часть 2. Аналоги, полученные заменой этиленового фрагмента на гетероциклический (обзорная статья)

А. В. Семенов, Е. В. Семенова, О. И. Балакирева 32

Схема и выводы Ленинджера нуждаются в уточнениях (обзорная статья)

А. В. Малиновский 53

Прямое конъюгирование пенициллинов и цефалоспоринов с белками для рецепторного анализа бета-лактамных антибиотиков

Т. С. Серченя, И. В. Горбачева, О. В. Свиридов 63

Конъюгаты аминопенициллинов с белками: синтез, иммуногенные свойства, связывание с рецептором бета-лактамов и антителами

О. С. Куприенко, Т. С. Серченя, И. И. Вашкевич, И. В. Горбачева, А. И. Зильберман, О. В. Свиридов 75

Синтез, нейротропная активность и молекулярный докинг новых конденсированных производных тиено[2,3-*b*]пиридина

В. В. Дабаева, М. Р. Багдасарян, Р. Г. Пароникян, И. М. Назарян, А. Г. Акопян, Л. С. Унанян, Е. Г. Пароникян, Ш. Ш. Дашян 87

Влияние метил-β-циклодекстрина на взаимодействие фторхинолонов с сывороточным альбумином человека

Л. Р. Якупова, Т. Ю. Копнова, А. А. Скуредина, Е. В. Кудряшова 98

Диагностика рекомбинантной формы вируса гепатита С RF1_2k/1b с использованием микрочипа, функционирующего по принципу “много зондов/один спот”

В. А. Рябинин, И. А. Акимов, А. Н. Синяков, Н. П. Пичко, М. К. Иванов 109

Изменение метаболизма сфингомиелина и церамида в структурах головного и спинного мозга трансгенных мышей линии FUS (FUS(1-359)), моделирующих боковой амиотрофический склероз

М. А. Шупик, У. А. Гутнер, А. А. Устюгов, А. П. Резвых, С. Ю. Фуников, О. А. Малошицкая, С. А. Соколов, А. Т. Лебедев, А. В. Алесенко 115

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2022, том 48, № 1, с. 3–31

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

УДК 547.8+547.96

СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ МАКРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ С ПРОТЕИНАМИ. ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ

© 2022 г. Н. Ш. Лебедева*, #, О. И. Койфман*, **

**Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН, Россия, 153045 Иваново, ул. Академическая, 1*

***Ивановский государственный химико-технологический университет, Россия, 153000 Иваново, Шереметевский просп., 7*

Поступила в редакцию 07.12.2020 г.
После доработки 28.12.2020 г.
Принята к публикации 31.12.2020 г.

Супрамолекулярные комплексы протеинов с макрогетероциклическими соединениями – уникальные структуры, существенно отличающиеся от классических супрамолекул как сложностью организации, так и многофункциональностью. Изучение природных и создание синтетических супрамолекулярных систем позволяет влиять на биохимические процессы и управлять ими, а также открывает новые перспективы практического использования макрогетероцикл-протеиновых супрамолекул. Ежегодно возрастающий интерес к изучению супрамолекулярных систем обусловлен их вариабельностью, разнообразием исходных компонентов, возможностью их химической и биохимической модификации, способностью участвовать в фото- и термоиндуцированных реакциях. Макрогетероциклический компонент супрамолекулярной системы не только влияет на аффинность протеиновой части к другим лигандам, но и может придавать супрамолекуле новые свойства. В обзоре проанализированы и обобщены результаты теоретических и экспериментальных исследований движущих сил самоорганизации молекул, процессов образования супрамолекулярных комплексов. Особое внимание уделено исследованиям супрамолекул протеин–макрогетероцикл, имеющих прикладную направленность для создания искусственных фотосистем, применения в биомедицинских целях в фотодинамической, фототермической терапии, для фотоинактивации бактерий, медицинской диагностики. Обозначены проблемы, сложности в развитии каждого направления и потенциальные пути их решения.

Ключевые слова: супрамолекулярные системы, протеины, макрогетероциклы, самосборка

DOI: 10.31857/S0132342322010079

Введение.....3
Движущие силы самосборки супрамолекулярных структур.....4
Биологические фотосистемы.....6
Искусственные фотосистемы.....8
Супрамолекулярные комплексы протеинов с тетрапиррольными макрогетероциклами в медицине.....13
Фотодинамическая терапия.....14
Фототермическая терапия.....17
Транспортные системы/системы доставки.....18
Антимикробная фотодинамическая терапия..20
Медицинская диагностика.....22
Заключение.....24
Список литературы.....24

ВВЕДЕНИЕ

Супрамолекулярная химия фокусируется на нековалентных специфических взаимодействиях, которые приводят к молекулярному распознаванию и процессам самосборки [1]. Супрамолекулярная химия изначально была построена на принципах биомиметики. Уникальные природные супрамолекулярные системы, как сравнительно простые (гемоглобин, цитохромы, ДНК, липиды и др.), так и сложные многокомпонент-

Сокращения: аФДТ – антимикробная фотодинамическая терапия; ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография; ФДИ – фотодинамическая инактивация; ФДТ – фотодинамическая терапия; ФС – фотосенсибилизатор; ФТТ – фототермическая терапия; Ab – антитело; Hb – гемоглобин; LH1 и LH2 – светособирающие антенные системы 1 и 2; PC – пластоцианин; PQ – пластохинон; PSI и PSII – фотосистемы I и II.

Автор для связи: (тел.: +7 (493) 233-62-72; эл. почта: nsl@isc-ras.ru).

ные (двухслойная клеточная мембрана, капсид вириона, фотосинтетический аппарат растений и бактерий и др.), вдохновляли исследователей на их изучение, а также на разработку и синтез новых многомолекулярных и надмолекулярных архитектур различной сложности и функциональности. Изначально синтетические супрамолекулярные системы были невелики и состояли из относительно простых строительных блоков. Накопленный опыт и знания в области супрамолекулярной химии в настоящее время позволяют создавать впечатляющие супрамолекулярные структуры. Особое место среди них занимают системы на основе макрогетероциклических соединений с протеинами. Именно на их анализе и перспективах применения сфокусирован данный обзор. Свойства самособирающихся систем можно настраивать, манипулируя энергетическими характеристиками составляющих их молекул, поэтому важно понимать, какие движущие силы управляют процессами самосборки и какова их энергетика.

ДВИЖУЩИЕ СИЛЫ САМОСБОРКИ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ СТРУКТУР

Специфические взаимодействия – низкоэнергетические, к ним относятся ван-дер-ваальсовые взаимодействия (ориентационные, дисперсионные, индукционные, <5 кДж/моль), донорно-акцепторные (<200 кДж/моль), π–π-взаимодействия (<50 кДж/моль), катион-π-взаимодействия (5–80 кДж/моль) [2–4], водородные связи (4–120 кДж/моль). В биологических системах они определяют структуру таких биомолекул, как ДНК и белки, и отвечают за процесс молекулярного распознавания. В большинстве случаев нековалентные взаимодействия значительно слабее (на 1–3 порядка), чем ковалентные связи. Их энергия, с одной стороны, достаточна, чтобы удерживать молекулы в составе биосупрамолекулярных структур. С другой стороны, эти системы имеют низкий активационный барьер разрушения [1], что позволяет биосупрамолекулярной структуре перестраиваться, реагировать на определенные внешние сигналы и, тем самым, реализовывать свои биологические функции.

Основные принципы нековалентных взаимодействий были сформулированы более 90 лет назад, например, Полинг дал описание водородных связей в 1930 г. [5]. С тех пор представления о природе водородных связей расширялись и изменялись. Водородные связи зачастую рассматриваются как электростатические взаимодействия между электроотрицательным атомом A и атомом водорода, присоединенным ко второму электроотрицательному атому B [6]. Однако это описание очень схематичное и поверхностное. Оно не объясняет, например, спектральное проявление H-связей в ЯМР-спектрах (химический сдвиг сигналов ^{1}H-ЯМР в слабое поле), в ИК-спектрах (изменение колебательной частоты при растяжении связи H–B), и, самое главное, с точки зрения построения и управления супрамолекулярными структурами, электростатический взгляд на природу H-связей не объясняет их кооперативный эффект. Водородные связи представляют собой сложное взаимодействие между различными энергетическими компонентами (электростатические взаимодействия, взаимодействия с переносом заряда, обменные взаимодействия, дисперсионные взаимодействия, кооперативные эффекты, π-резонансные взаимодействия и вторичные электростатические взаимодействия) (рис. 1), и их природа до сих пор служит предметом постоянных дискуссий. Более подробно с современными взглядами на природу водородных связей можно ознакомиться в обзорах [7, 8].

По мере накопления данных о взаимодействиях между ароматическими соединениями транс-

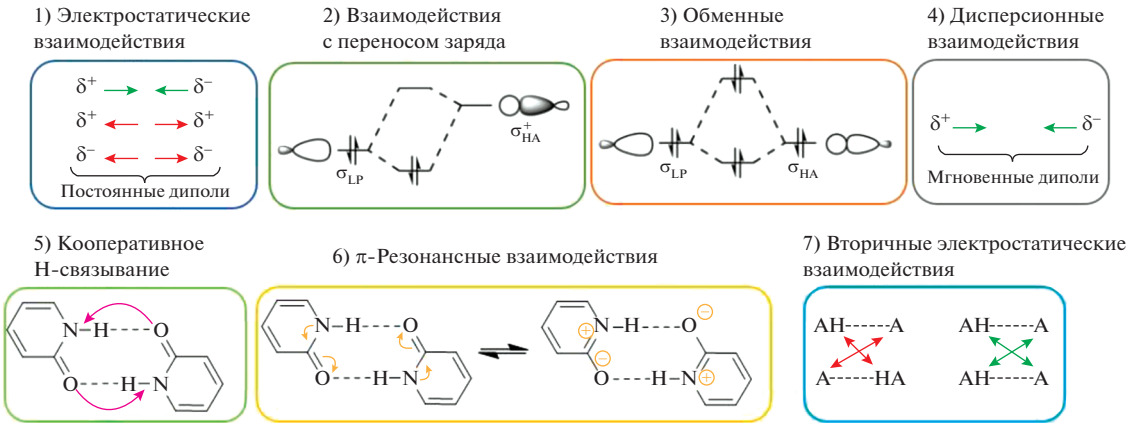


Рис. 1. Схематическое изображение вкладов разных видов взаимодействий в H-связь [9].

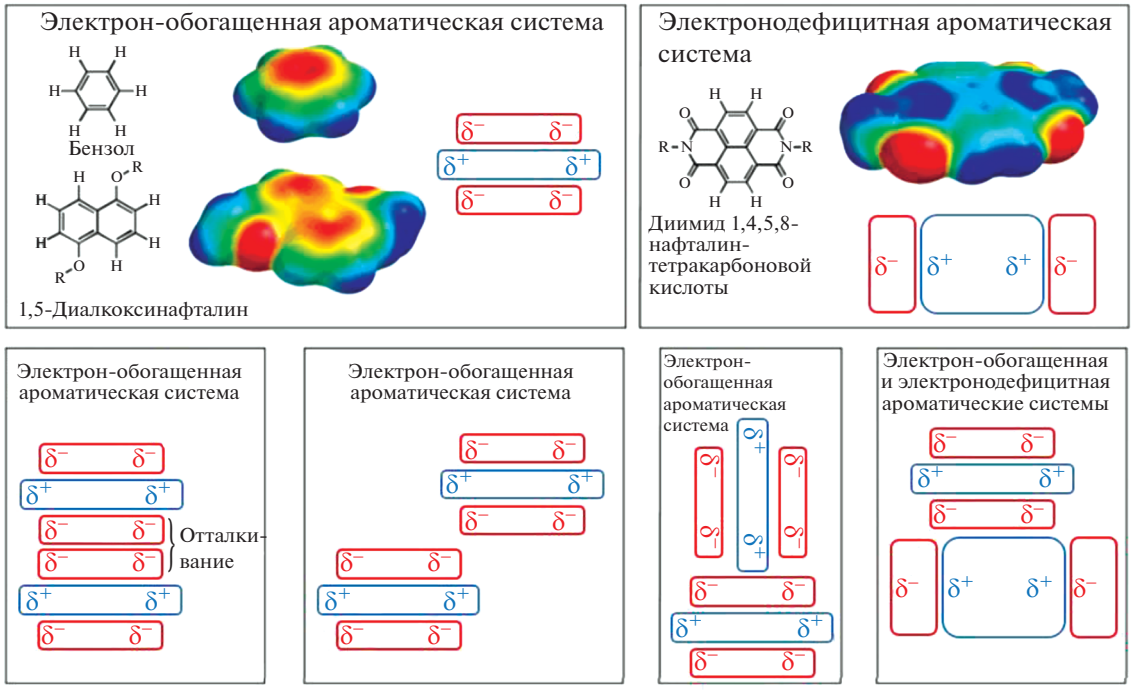


Рис. 2. Схемы расположения ароматических молекул в π–π-комплексах на примере электрон-обогащенных (бензол и 1,5-диалкоксинафталин) и электронодефицитных молекул (1,4,5,8-нафталинтетракарбоксилатдиимид) с акцентом на места электростатического притяжения или отталкивания [12].

формировались и взгляды на природу π–π-взаимодействия, которое изначально трактовалось как взаимодействие донорно-акцепторного типа, при котором ароматическая система одной молекулы рассматривалась в роли донора π-электронной плотности, а ароматическая система другой – в качестве акцептора [10]. В дальнейшем взгляды на природу π–π-комплексов были пересмотрены, и сейчас они расцениваются как результат двух противоположно направленных сил π–σ-стягивания и π–π-отталкивания [11, 12]. Для π–π-взаимодействий существенна роль поляризации π-ароматической системы, при которой создается квадрупольный момент с распределением частичных отрицательных и положительных зарядов, зависящих от наличия и природы периферийных заместителей. Именно распределение электронной плотности, наличие электрон-обогащенных и электронодефицитных мест в ароматических молекулах определяет их взаимное расположение в π–π-комплексе [11–14] (рис. 2).

Таким образом, вводя в ароматические соединения электронодонорные или электроноакцепторные заместители и тем самым изменяя распределение электронной плотности в молекулах, можно построить различно организованные супрамолекулярные комплексы. Данный принцип широко применяется для создания различных архитектур и сборок ароматических соединений [15, 16].

Несмотря на огромный прогресс, достигнутый в последние десятилетия как в теоретическом, так и в экспериментальном изучении нековалентных, специфических связей, мы все еще далеки от однозначного понимания нековалентных комплексов [17]. Наглядная демонстрация данного тезиса – работа Černý et al. [18], в которой описана роль Н-связей и π-стекинговых взаимодействий в стабилизации биополимеров: ДНК, олигопептидов и белков. Авторы приходят к заключению о доминирующей роли дисперсионных взаимодействий в стабилизации перечисленных биоструктур по сравнению с вкладом в их стабилизацию от Н-связей и π–π-взаимодействий.

Другой важный фактор, определяющий устойчивость супрамолекулярных структур, – количество нековалентных взаимодействий. Самый наглядный пример, отражающий суммарный эффект количества нековалентных взаимодействий, – способность гекконов быстро подниматься по гладким стеклянным вертикальным поверхностям. Оказалось, что на лапке геккона почти пятьсот тысяч ороговевших щетинок-волосков, каждый из которых за счет ван-дер-ваальсовых сил обеспечивает сцепление с любой поверхностью [19], что позволяет удерживать вес животного в вертикальном положении. Принцип аддитивности низкоэнергетических взаимодействий также широко применяется при построении супрамолекулярных систем.

Говоря о движущих силах образования супрамолекулярных комплексов, нельзя не отметить роль растворителя, которая в природных и синтетических супрамолекулярных структурах существенно отличается. В биосистемах растворитель – вода, она определяет гидрофобный эффект. Когда неполярное соединение вносится в воду, происходит нарушение сетки водородных связей и перегруппировка молекул воды вокруг неполярных молекул. Присутствие в воде разных гидрофобных соединений приводит к созданию больших полостей для размещения скоплений неполярных молекул, которые стремятся взаимодействовать друг с другом для уменьшения контакта с водой. Таким образом, для минимизации контакта неполярных молекул с водой и минимизации разрушения структуры воды формируются агрегированные структуры [20]. Гидрофобный эффект играет решающую роль в формировании амфифильных мицеллярных агрегатов [2], сворачивании глобулярных белков, функционировании биомембран [21, 22], формировании фосфолипидных бислоев [23]. С точки зрения термодинамики, растворитель может влиять на образование супрамолекулярной системы не только энтропийно. Например, растворитель существенно влияет и на энергию π–π-взаимодействия, причем в полярных растворителях, как правило, устойчивость π–π-комплексов выше, чем в неполярных [12]. Процессы самосборки очень чувствительны к изменениям растворителя из-за различной термодинамической стабильности промежуточных и конечных комплексов, ассоциатов, образующихся в разных средах [24]. В биосупрамолекулярных структурах растворитель не только участвует в образовании супрамолекулярной системы, но и выступает ее частью, обеспечивая стабильность/лабильность системы, управление и воздействие на супрамолекулы, осуществляет транспортную функцию [25, 26]. Напротив, в синтетических супрамолекулярных системах роль растворителя, как правило, сводится к стадии образования, самосборке системы, влиянии на рост и архитектуру супрамолекулярных систем [25], а затем от растворителя стремятся избавиться [25–27].

Другая отличительная особенность синтетических супрамолекулярных систем, существенно отличающих их от большинства биоструктур, заключается в том, что синтетические системы находятся в состоянии равновесия. Поэтому зачастую синтетические системы также называют равновесными сборками, для них характерна термодинамическая стабильность в течение длительного времени. Синтетические супрамолекулярные системы находятся под термодинамическим контролем, в то время как биологические супрамолекулярные системы контролируются кинетически [28]. Действительно, большинство химических процессов в клетке (ферментативный катализ фосфорилирования [29], трансмембранная ионная накачка [30], синтез белка в рибосомах [1] и др.) невозможны без использования свободной энергии реакции гидролиза АТФ. Mattia et al. [1] предлагают различать супрамолекулярные системы, которые находятся в кинетической ловушке, и системы, которые далеки от равновесия и требуют непрерывной подачи энергии для поддержания стационарного состояния. Первые – кинетически запертые сборки/системы, которые могут существовать длительное время, находятся в локальном энергетическом минимуме, и для перехода в глобальный минимум (более энергетически выгодные структуры) требуются высокие энергии активации. Вторые – системы, требующие постоянной подкачки энергии. Если подача энергии прекращается, система разрушается, переходя в термодинамически минимальное состояние. Непрерывное энергетическое преобразование, которому подвергаются эти структуры, позволяет им иметь интересные, а иногда и непредсказуемые, возникающие эмерджентные свойства и функции, такие как однонаправленное движение, возникновение градиента концентрации и др. Поэтому создание подобных систем, контролируемых энергетически извне, очень перспективно и может позволить исследователям приблизиться к природным совершенным биосупрамолекулярным системам.

В биосупрамолекулярных системах основным источником энергии служит АТФ, а в синтетических супрамолекулярных системах, возможно, подобным источником энергии могут выступать макрогетероциклические соединения порфиринового, хлоринового и фталоцианинового классов. Перечисленные макрогетероциклические соединения имеют ароматическую природу. Их особенность заключается в том, что они могут поглощать энергию света в широком спектральном диапазоне, а благодаря длительному времени жизни в возбужденном триплетном состоянии (1–6 нс) способны передавать эту энергию другим молекулам или генерировать фототок [31].

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФОТОСИСТЕМЫ

В природе соединения порфиринового ряда входят в состав фотосинтетического аппарата высших зеленых растений, большинства водорослей и фотосинтезирующих бактерий, обеспечивающего трансформацию солнечной энергии в химическую, синтез большей части органического вещества, а также кислорода. Преобразование световой энергии в полезную химическую энергию выполняется четырьмя многосубъединичными мембранно-белковыми комплексами (рис. 3). Два комплекса – белок-пигментные суперкомплексы, называемые фотосистема I (PSI) и фотосистема II (PSII). Они функционируют как моле-

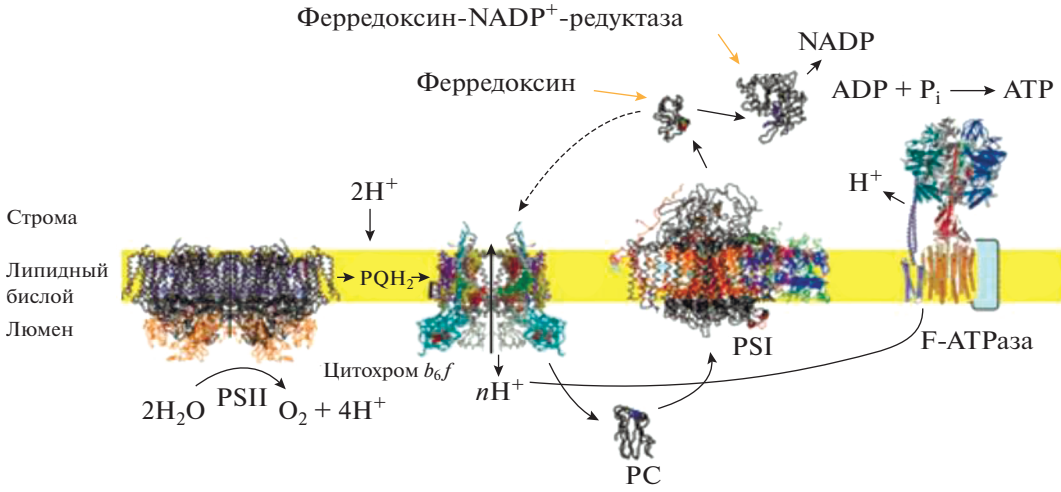


Рис. 3. Схематическое изображение бислоя тилакоидной мембраны со встроенными белковыми комплексами, участвующими в транспорте электронов. Пунктирная стрелка – циклический перенос электрона [35].

кулярные фотовольтаики – испускают электроны при поглощении световой энергии. Каждая фотосистема состоит из основного комплекса и периферической светособирающей антенной системы – I (LHCI) для PSI и II (LHCII) для PSII [32]. PSI и PSII содержат большое количество молекул хлорофилла. Например, в структуре PSI термофильной цианобактерии *Synechococcus elongatus* содержится 96 молекул хлорофилла [33], а в PSI мезофильной цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC6803 – 591 молекула хлорофилла [34]. Именно хлорофиллы с другими пигментами в PSI и PSII поглощают световую энергию и передают ее в центр фотосинтетической реакции, дополнительно вызывая возбуждение хлорофиллов, известных как P680 для PSII и P700 для PSI, чтобы инициировать перемещение протонов через мембрану. Третий комплекс, цитохром b_6f, опосредует транспорт электронов между двумя фотосистемами и в дальнейшем способствует образованию протон-движущей силы (pmf). Четвертый комплекс, АТФаза F-типа (CF_1CF_0-АТФ-синтаза), обеспечивает синтез молекулы АТФ. Дополняют эти комплексы молекула пластохинона (PQ) и небольшой водорастворимый медь-связывающий белок, называемый пластоцианином (PC) [35]. Четыре основных комплекса (фотосистемы I и II, цитохром b_6f и АТФ-синтаза) сохраняются от цианобактерий до высших растений.

Фотосистема II использует световую энергию для каталитического окисления воды [36, 37]. Этот процесс служит основным источником электронов, которые впоследствии переносятся через мембрану на цитохром b_6f [38–41] молекулами пластохинона (PQ), а затем в фотосистему I [33, 42] через просвет тилакоидов с помощью небольшого водорастворимого белка пластоцианина [43]. Электроны впоследствии переносятся из PSI на окислительно-восстановительный белок ферредоксин в строме [44, 45]. Наконец, ферредоксин окисляется ферредоксин-$NADP^+$-редуктазой, которая восстанавливает $NADP^+$ до NADPH [33, 46]. Одновременно протонный градиент, генерируемый через тилакоиды, управляет образованием молекул АТФ с помощью АТФ-синтазы [46, 47]. Все вышеупомянутые компоненты находятся в сплюснутых пузырьках, называемых тилакоидами, которые также обеспечивают среду для передачи энергии. Самая сложная форма тилакоидных мембран обнаружена в хлоропластах высших растений. У них тилакоиды образуют сложные, сильно взаимосвязанные трехмерные ламеллярные сети, отличающиеся дифференциацией на два различных морфологических домена: цилиндрическая стопка, состоящая из множества плотно прижатых слоев, называемых грана, и неупакованные мембранные области, которые соединяют между собой граны, называемые ламелла стромы [35]. PSI расположена в ламелле стромы тилакоида, тогда как PSII – в многослойном гран-домене [48].

Сложная организация фотосинтетического аппарата обеспечивает не только реализацию основных биохимических функций, но и способность тонкой подстройки системы к изменению внешних условий (уровень и интенсивность света, температура и др.). Уровень регуляции определяется взаимодействиями между антенными системами и фотосистемами [34]. В случае растений было показано, что светособирающая антенна PSI, состоящая из четырех тесно связанных антенных хлорофилл-содержащих белков, связывается с реакционным центром с различной стехиометрией, в зависимости от условий освеще-

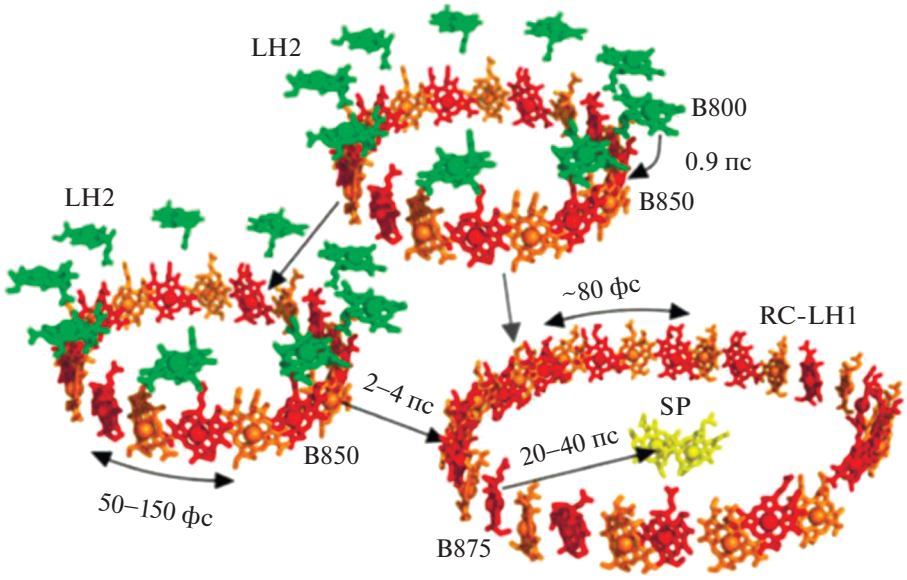


Рис. 4. Схема процессов передачи энергии светового возбуждения от антенных систем LH2 и LH1 к специальной паре реакционного центра бактериального фотосинтеза [51].

ния и других факторов окружающей среды [35], тем самым препятствуя фотоокислению и обеспечивая эффективность свето-акклиматизационных реакций [34]. Кроме того, в составе фотосинтетического аппарата есть фоторецепторы (включая две фотосистемы, действующие как светочувствительные датчики) и преобразователи сигналов, которые задействованы в формировании реакции акклиматизации [49, 50]. Даже поверхностное рассмотрение архитектуры и строения фотосинтетического аппарата свидетельствует о сложности его организации и взаимодействия составных частей. Это не удивительно, ведь фотосинтетический аппарат – уникальное творение, созданное природой за несколько миллиардов лет эволюции.

Биологические системы самосборки хромофоров поражают своей упорядоченностью и гармоничностью (рис. 4). В комплексах хромофор–белок точная ориентация пигментов белковой матрицей обеспечивает эффективную ступенчатую передачу энергии к реакционному центру, где и происходит разделение зарядов.

ИСКУССТВЕННЫЕ ФОТОСИСТЕМЫ

Сложная самоорганизация естественных фотосистем обеспечивает эффективный перенос энергии и электронов. Архитектура этих фотосенсибилизирующих молекул определяет фотофизику накопления и переноса энергии, тушение, сочетание с реакционным центром по скорости и химизму. Безусловно, создаваемые искусственные супрамолекулярные системы хоть и основаны на способности соединений порфиринового и хлоринового рядов к поглощению световой энергии и ее трансформации, но организованы значительно проще. Рассмотрим созданные искусственные аналоги светособирающих антенн. Типичная искусственная фотосинтетическая система должна состоять из антенны, содержащей набор хромофоров, которые эффективно поглощают солнечный свет во всем или максимально широком диапазоне солнечного спектра и передают эту энергию реакционному центру. Реакционный центр – это место, где поглощенная энергия возбуждения обеспечивает эффективный фотоиндуцированный перенос электронов к акцептору электронов для создания состояний с разделенными зарядами. Таким образом, реакционный центр можно рассматривать как фотоэлектрическое устройство нанометрового масштаба. Кроме того, реакционный центр может быть соединен с катализатором окисления воды и катализатором восстановления протонов для превращения воды в водород или синтеза заданного вещества (топлива).

Одна из первых проблем, возникающих при конструировании светособирающих антенн, – организация самоассоциатов хромофорных соединений. Причины поиска именно ассоциатов хромофорных соединений очевидны – ни один хромофор не способен эффективно обеспечивать поглощение и передачу световой энергии в широком спектральном диапазоне. Одна из возможностей преодоления этой проблемы – работа с агрегатами хромофоров, которые благодаря экситонному взаимодействию могут иметь гораздо более широкие диапазоны поглощения [52, 53].

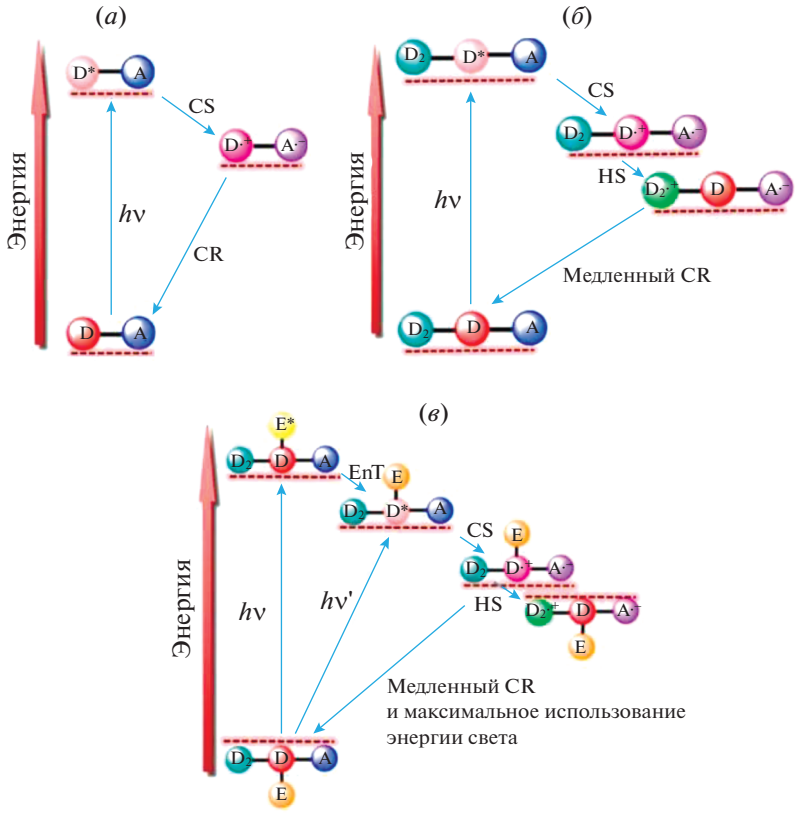


Рис. 5. Принципиальная схема для одноступенчатого (*а*), многоступенчатого переноса электронов (*б*) и переноса энергии в сочетании с процессами переноса электронов (*в*). CS – процесс разделения заряда, CR – процесс рекомбинации заряда [57].

Для достижения конечной цели – создания искусственной светособирающей антенны – используются различные приемы сборки хромофорных соединений, среди которых можно выделить следующие: 1) мультихромофорные массивы, 2) кольцеобразные светособирающие антенны, 3) звездообразные светособирающие антенны, 4) антенны для сбора света в форме ветряных мельниц, 4) полиады, 5) дендрические системы.

В последнее время был достигнут значительный прогресс в возможностях синтеза длинных мультихромофорных стержневидных массивов порфиринов, в которых порфирины ковалентно соединены и образуют олигомерные структуры. Чередующаяся ортогональная конформация между соседними порфириновыми единицами в мезосвязанных массивах порфиринов сводит к минимуму возможность π-электронного сопряжения в массиве, несмотря на чрезвычайно короткое расстояние между порфиринами, которое составляет 8.4 Å. Массивы демонстрируют дипольное экситонное взаимодействие, при этом длина делокализации экситона (когерентная длина) распространяется на ~4–5 [54] соседних порфириновых единицы, что практически совпадает со значением, определенным в кольце B850 в LH2 (рис. 4) [55].

В научной литературе широко представлены различные конструкции ассоциатов хромофоров, как ковалентно связанных, так и образованных за счет специфических нековалентных взаимодействий [56].

Перечисленные выше структурные организации хромофоров не нашли широкого применения, т.к. остались нерешенными проблемы переноса и разделения заряда. Для идеальных фотосинтетических искусственных систем необходимые параметры процесса переноса электрона между донором и акцептором – быстрое разделение и относительно медленная рекомбинация зарядов. Фотоиндуцированный одноступенчатый перенос электрона может быть достигнут путем создания простых донорно-акцепторных (D–A) пар. В качестве донора выступает хромофор, он же действует как первичный донор электронов, который передает электрон акцептору (процесс разделения заряда, CS), как показано на рис. 5*а*. Из-за близости донора и акцептора ион-радикальная пара, образующаяся при фотовозбуждении, быстро рекомбинирует в исходное основное состояние (процесс рекомбинации заряда, CR).

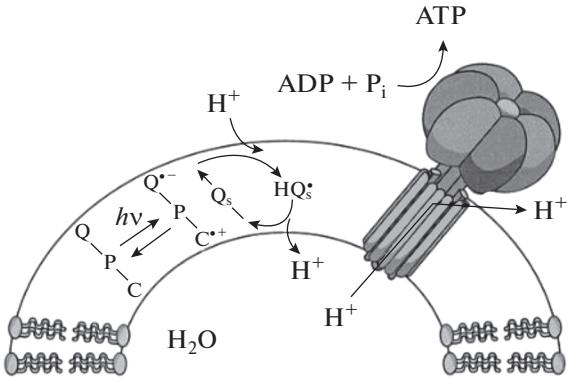


Рис. 6. Схема искусственной фотосинтетической мембраны на основе липосом [70].

Для предотвращения рекомбинации были разработаны многомодульные системы для генерации долгоживущих состояний с разделенными зарядами [58]. Для реализации многоступенчатого переноса электрона требуются по крайней мере три вида молекул: D_2–D–A или D–A–A_2, где D и D_2 – первичные и вторичные доноры электронов, а A и A_2 – первичные и вторичные акцепторы электронов соответственно [59, 60]. Легкое окисление D_2 и легкое восстановление A_2 – основные требования молекулярного дизайна светособирающей антенны. Фотохимические события при возбуждении D в D_2–D–A показаны на рис. 5*б*, конечный результат которых – состояние с разделенным зарядом $D_2^{\bullet+}$–D–$A^{\bullet-}$. На рис. 5*в* приведена принципиальная схема функционирования антенны, работающей в более широком спектральном диапазоне за счет добавления фотосенсибилизатора (E).

Потенциальные доноры (D и D_2) и акцепторы (A и A_2) хорошо известны [61]. Наибольшей популярностью в качестве акцепторов пользуются фуллерены C60/C70, графен и углеродные нанотрубки, т.к. они обладают уникальными электронными характеристиками, обеспечивающими высокую подвижность и локализацию разделенных зарядов [62, 63]. В качестве примера можно привести пентаду [64], состоящую из ферроцена (донор электронов), мезосвязанного тримера порфирина (фотосенсибилизатор) и фуллерена (акцептор электронов). Полученная структура характеризуется чрезвычайно долгоживущим состоянием с разделенными зарядами (0.53 мкс), полученным с высоким квантовым выходом (0.83), что сравнимо с естественной фотосинтетической системой. Недавно были получены супрамолекулярные светособирающие структуры, состоящие из четырех фуллеренов и геометрических структур, построенных из кубических блоков порфиринов с ароматическими спейсерами [65]. Благодаря уникальным особенностям упаковки, которые могут обеспечить быстрое разделение и делокализацию заряда, подобные архитектуры демонстрируют сильные взаимодействия с переносом заряда, сверхдлительное время жизни в состоянии с разделенными зарядами (до 20 нс) и высокую фотопроводимость 3.1×10^{-5} см^2 В$^{-1}$ с$^{-1}$.

При конструировании полиад в качестве акцепторов могут быть использованы и сами хромофоры [66], при этом, как правило, их самосборка осуществляется за счет аксиальной координации периферийных заместителей одного хромофора (порфирина) на металле-комплексообразователе другого хромофора (фталоцианине). Подробно ключевые аспекты фотохимии подобных полиадных искусственных фотосинтетических систем рассмотрены в многочисленных обзорах [67–69].

Созданные диады и триады могут быть внедрены в мембраны и другие биоструктуры, например, Steinberg-Yfrach et al. [70] разработана фотосинтетическая мембрана (рис. 6), состоящая из липосомного бислоя, триады и фермента АТФ-синтазы. Протонный насос приводится в действие векторным фотоиндуцированным переносом электронов в молекулярной триаде каротин–порфирин–нафтохинон (C–P–Q), которая генерирует частицы $C^{\bullet+}$–P–$Q^{\bullet-}$ при возбуждении видимым светом. Внутримолекулярный окислительно-восстановительный потенциал, представленный катион-радикалом каротиноида и анион-радикалом нафтохинона, связан с перемещением протона липофильным хиноном (Qs). Восстановление происходит вблизи внешней границы раздела бислой–вода, когда Qs принимает электрон от анион-радикала нафтохинона с образованием $Qs^{\bullet-}$. После протонирования $Qs^{\bullet-}$ вблизи внешней границы раздела с водой семихинон ($HQ^{\bullet}$) в результате реакций диффузии или самообмена между молекулами Qs доставляет протон и электрон к месту окислительного потенциала ($C^{\bullet+}$–P–Q), расположенному вблизи внутренней поверхности мембраны. Окисление $HQ^{\bullet}$ вблизи внутренней водной границы раздела приводит к выбросу протонов во внутрилипосомный объем. При накоплении достаточного количества протонов запускается образование АТФ из аденозиндифосфата (АДФ) и неорганического фосфата (P_i).

Выше приведены примеры сравнительно простых антенных систем, производительность которых не превышает 5–9%, хотя эффективность неорганических сенсибилизированных красителем солнечных элементов за последние три десятилетия существенно повысилась (с 7.12% в 1991 г. до 12.3% в 2020 г. [71, 72]) и приближается к рентабельному порогу в 15%. Повысить эффективность

искусственных светособирающих систем можно за счет изменения архитектуры, аналогичной организации сотовой системы связи. Подобная иерархия обеспечивает увеличение захвата фотонов. Благодаря наличию антенн в биосистемах почти каждый захваченный фотон приводит к полезному разделению зарядов, т.е. квантовая эффективность близка к единице [73]. Перестроение и переключение подобных антенных систем происходит гораздо быстрее и эффективнее. Кроме того, для расширения диапазона поглощения в искусственных антеннах можно использовать несколько разных хромофоров.

Наибольшее соответствие предъявляемым требованиям демонстрируют дендрические архитектуры. Дендримеры – это четко определенные гиперразветвленные трехмерные макромолекулы с регулярным древовидным набором ответвлений [64, 74]. Для звездообразной и конусовидной серий дендримерных антенн эффективность передачи энергии от возбужденного синглетного состояния периферийных порфиринов к сердцевине, как правило, значительно снижается с увеличением номера поколения, причем в случае конусовидных систем это явление проявляется ярче. С другой стороны, уменьшение числа поколений (генераций) отрицательно сказывается на общей фотохимической картине, т.к. приводит к уменьшению числа хромофоров. Среди разнообразных массивов хромофоров дендритные каркасы представляются наиболее подходящими для трехмерного расположения большего количества молекул хромофоров и их эффективного взаимодействия. Дендритные каркасы действуют как энергетические воронки и обеспечивают векторную передачу энергии [63, 67]. Тем не менее существует одна проблема, связанная с дендримерной архитектурой, заключающаяся в том, что векторная передача энергии в большинстве синтезированных архитектур происходит от периферии к ядру дендримера (рис. 7*а*). Для практического применения захват энергии внутри ядра бесполезен, поскольку доступ других реагентов стерически заблокирован, и кроме нежелательной рекомбинации заряда может происходить только термическая дезактивация. Обратный дендримерный поток энергии, схематично представленный на рис. 7*б*, где энергия передается от центра к периферии и, в конечном итоге, на искусственный реакционный центр, до сих пор не реализован [73].

Возможно, в дальнейшем решение проблемы будет найдено при конструировании конусных структур, в которых ядро будет доступно. Стратегия дендритной сборки довольно перспективна, однако получение таких сложных молекул с приемлемым выходом – очень сложной задача, требующая много времени. Поэтому супрамолекулярная система самосборки стала привлекательной альтернативной стратегией для построения хорошо упорядоченных систем с множеством хромофоров на биологических матрицах.

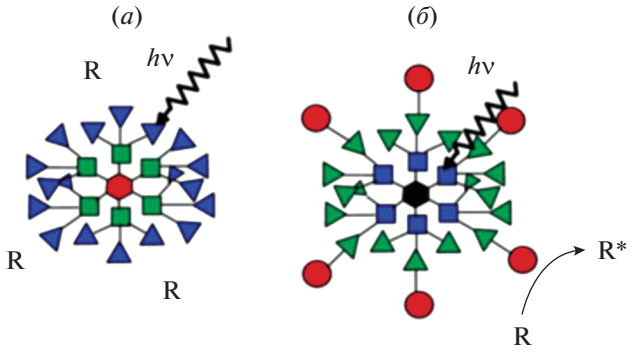


Рис. 7. Дендритные архитектуры: (*а*) – классический дендример, действующий как энергетическая ловушка; (*б*) – архитектура, позволяющая фотосенсибилизировать реагент R [73].

Циклодипептидные и пептидные фрагменты могут быть удобным мотивом для образования супрамолекулярных ансамблей, поскольку они обеспечивают множественные сайты водородных связей с симметрией C_2 [75–78]. Димерные структуры, состоящие из двух порфиринов и дипептида, в зависимости от внешних условий и концентрации, образуют различные архитектуры от волокнообразных до тороидальных структур [76, 79], а также pH управляемых архитектур (рис. 8) [80, 81].

Фотокаталитическая система на основе порфиринов, модифицированных пептидами, намного более эффективна, чем система на основе порфирина без пептидного звена. Это позволило создать на основе хромофоров и пептидов искусственные фотосинтетические системы, позволяющие получать, например, L-глутамат [77], кислород [82], аминофенол [78] и другие вещества.

Исследований фотоаккумулятивных и фотокаталитических систем на основе хромофоров и белков проводится значительно меньше. Во-первых, это обусловлено тем, что иммобилизация массива хромофоров должна осуществляться в строго определенном архитектурном паттерне, а природные белки, как правило, нерегулярны. Во-вторых, существенные сложности возникают при сборке хромофор-содержащих белков [83]. В природе сборка белков осуществляется с помощью шаперонов. Как реализовать это в искусственных условиях – вопрос, не имеющий пока четкого ответа. Кроме того, фотоактивность хромофоров и способность к генерации активных форм кислорода может привести к дефектам в белковой матрице и, соответственно, в полученной конечной структуре. Возможный путь преодоления перечисленных трудностей – использо-

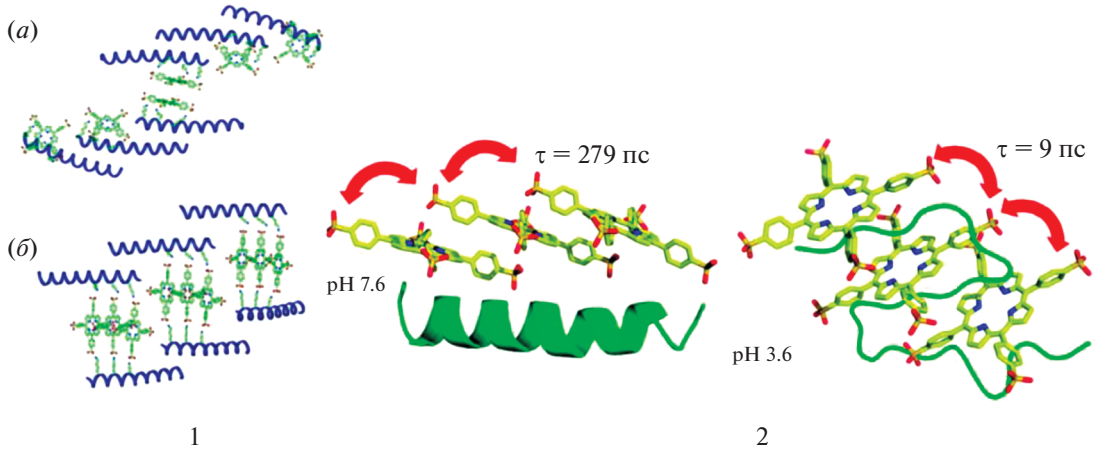


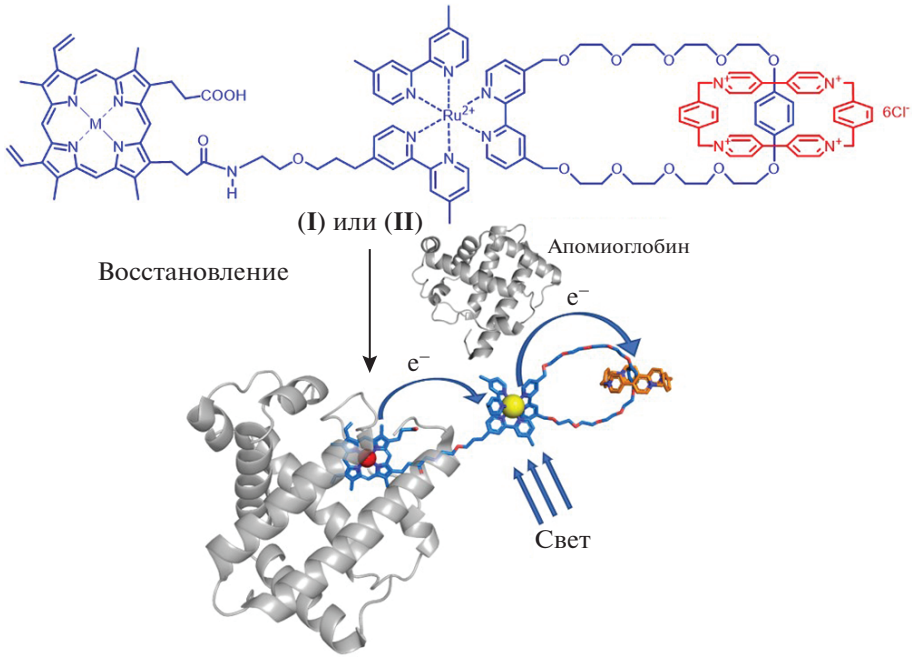
Рис. 8. 1 – Супрамолекулярные порфирин-полипептидные системы: (*а*) – слабое взаимодействие порфирин–порфирин в нейтральных условиях; (*б*) – взаимодействие J-типа при pH 3.5 [80]; 2 – переключение pH порфирин-пептидных ансамблей. В кислых растворах (pH 3.6) пептид имеет неупорядоченную вторичную структуру, связанные с пептидом порфирины образуют J-агрегаты. В нейтральных растворах (pH 7.6) связывание порфирина с пептидом индуцирует формирование α-спиральной вторичной структуры пептида [81].

вание белков с преимущественной β-складчатостью. Особенность белков с преобладанием указанной вторичной структуры состоит в том, что они имеют гидрофобную поверхность и склонны к формированию упорядоченных амилоидоподобных структур. Как недавно было показано [84–86], связывание порфиринов глобулярными α-протеинами приводит к экспонированию гидрофобных участков полипептидной цепи на поверхность глобулы, переходу части разупорядоченных и α-цепей в β-складки и образованию агрегатов различной архитектуры [87, 88]. Доказана иммобилизация массива хромофоров цинк(II)протопорфирина IX на β-листах протеинов [89, 90]. В созданной системе экситоны могут диффундировать вдоль стопок на расстояние >60 нм в оптимальных условиях.

Белковые структуры в естественных светособирающих комплексах играют решающую роль в модуляции уровней энергии отдельных пигментов посредством взаимодействия с остатками белка и соседними пигментами, что, в свою очередь, влияет на путь передачи энергии возбуждения [91]. Поэтому включение синтетической диады в белковую матрицу может быть альтернативным подходом к созданию улучшенной фотохимической системы, что наглядно продемонстрировано в работе Hu et al. [92] на примере искусственных фотосинтетических реакционных центров, сконструированных на поверхности белка (рис. 9). Сравнительный анализ фотофизики диады и диады, помещенной в апомиоглобин, показал, что время жизни в состоянии с разделенными зарядами без белка составляет 1 мкс, а с белком – не менее 2 мс, т.е. многоступенчатый перенос электрона возможен только в случае супрамолекулярной системы, в состав которой включен белок. Подобно естественному фотосинтетическому реакционному центру, включение кофакторов в белковый каркас (апомиоглобин) позволяет пространственно разделить фотогенерированные продукты и тем самым избежать быстрой рекомбинации зарядов.

В связи со сложностями включения хромофоров в природные белки исследователи все чаще обращаются к искусственным белкам [93–95], называемым “макетами” (“maquettes”) [68, 95]. Их достоинства очевидны: они устойчивы, имеют требуемый паттерн, высокую аффинность к хромофорам, что в совокупности обеспечивает эффективную и управляемую самосборку фоточувствительных систем.

Недавние исследования показали, что природные биологические структуры могут служить в качестве шаблонов, управляющих наноразмерной организацией пигментов через химические связи или электростатические взаимодействия. В качестве шаблонов может использоваться ДНК [96, 97], РНК [98, 99] или капсиды вирусов [100]. Например, бактериофаг M13 имеет оболочку – нитевидную структуру длиной ~880 нм и диаметром ~6.5 нм [101], состоящую из ~2700 копий белков α-спиральной оболочки. Оболочка вируса легко подвергается химической модификации благодаря наличию терминальных NH_2-групп и легкодоступных на поверхности остатков лизина для обеспечения последующей конъюгации с тетрапиррольными хромофорами. Расположение центров конъюгации (~5400 на вирус), указанных выше терминальных групп и аминокислотных остатков лизина на поверхности вируса обеспечивает экситонное взаимодействие конъюгированных с ними молекул порфиринов (рис. 10) [101].



$Mb(Fe^{III}OH_2)$-Ru^{2+}-BXV^{4+}, кофактор = (**I**)
Mb(ZnPP)-Ru^{2+}-BXV^{4+}, кофактор = (**II**)

Рис. 9. Схематическое изображение восстановления кофакторов (**I**) и (**II**) апомиоглобином с получением триад на основе миоглобина: $Mb(Fe^{III}OH_2)$-Ru^{2+}-BXV^{4+} и Mb(Zn)-Ru^{2+}-BXV^{4+} [92].

Подводя итог этого раздела, хочется отметить, что создание искусственных антенн представляет интерес не только для развития альтернативной энергетики, искусственного фотосинтеза, но и может найти применение в биомедицинских целях, например, для мультиплексной маркировки, визуализации в клетках прокариот и млекопитающих, включая линии клеток человека [102]. Однако исследования в данном научном направлении находятся в зачаточном состоянии. Больший успех достигнут в направлении исследования свойств конкретных белков с тетрапиррольными хромофорными соединениями и изучении практического применения этих супрамолекулярных систем.

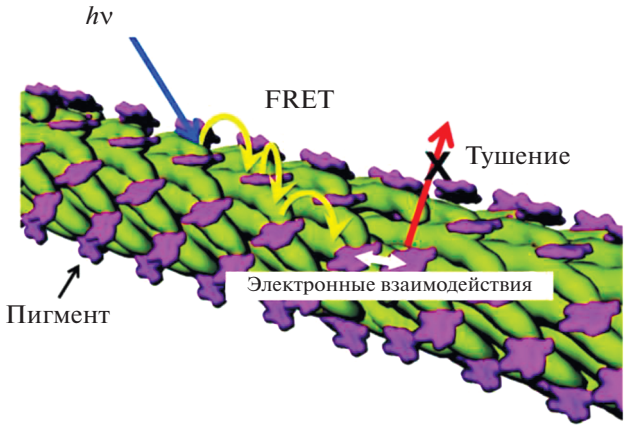


Рис. 10. Самосборка пигмента (Zn(II)дейтеропорфирин IX 2,4-*бис*(этиленгликоль)) на оболочке бактериофага M13 [101].

СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ПРОТЕИНОВ С ТЕТРАПИРРОЛЬНЫМИ МАКРОГЕТЕРОЦИКЛАМИ В МЕДИЦИНЕ

Из всех биомолекул белки, вероятно, наиболее интересны, особенно с молекулярной и структурной точек зрения. Белки участвуют практически во всех биологических процессах, и их супрамолекулярная модуляция (например, с помощью небольших молекул) лежит в основе действия большинства лекарств [103]. Как правило, белки работают согласованно с помощью так называемых белок-белковых взаимодействий. Управление белок-белковыми взаимодействиями открывает широкие перспективы для создания новых видов лекарств. Таким образом, белки могут выступать как в роли биологических мишеней (например, в фотодинамической терапии (ФДТ), фотоинактивации бактерий и вирусов (ФДИ, аФДТ)), использоваться для визуализации с по-

мощью порфиринов, хлоринов, фталоцианинов, а также выступать компонентами лекарственных препаратов. Сывороточные белки крови могут использоваться в качестве транспортных систем, обеспечивающих распределение препарата с помощью кровеносной системы и модулирующих связывание порфиринов с другими белками. В данном разделе обобщены достижения последних лет в перечисленных научных направлениях.

Фотодинамическая терапия

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – хорошо зарекомендовавший себя неоперабельный метод лечения онкологических заболеваний, различных патологий, в том числе некоторых кожных заболеваний (псориаз, папилломавирусные инфекции, кожный лейшманиоз и др. [104]). В основе метода лежит световое воздействие на фотосенсибилизатор (ФС – порфирин, хлорин, фталоцианин и др.). Полученная ФС световая энергия трансформируется в конечном итоге в химические реакции, приводящие к поражению мишени, гибели клетки. К настоящему времени выделяют четыре типа фотоиндуцированных реакций. В реакциях типа I ФС в возбужденном триплетном состоянии реагирует с биомолекулами путем передачи электрона, в результате чего радикалы и ионы-радикалы вступают в реакцию с молекулярным кислородом, вызывая образование активных форм кислорода (OH-радикал, супероксидный радикал). В реакциях типа II происходит прямая передача энергии от ФС в триплетном возбужденном состоянии к кислороду в основном триплетном состоянии с образованием синглетного кислорода, который проявляет высокую цитотоксичность [105]. Фоточувствительные молекулы механизма типа III обычно выступают сенсибилизаторами-носителями антиоксидантов, увеличивающими генерацию синглетного кислорода и снижающими концентрацию природных свободных радикалов в клетках-мишенях [106]. Цитотоксический механизм типа IV связан с ФС, которые не способны взаимодействовать с молекулярной мишенью, но при световом возбуждении происходит их внутримолекулярная трансформация (фотоизомерация), способствующая связыванию светочувствительной молекулы с ее молекулярной мишенью [106]. Подавляющее большинство препаратов для ФДТ – это порфирины, хлорины и фталоцианины, обладающие интенсивным поглощением в области 650–850 нм и окисляющие биосубстраты преимущественно по механизму II. Значительный ряд фотосенсибилизаторов был разработан для ФДТ, но только некоторые из них одобрены для эффективного использования: в статьях [107, 108] приводятся структурные формулы лекарственных соединений, торговые названия препаратов для лечения различных нозологических форм.

Существует огромное количество прекрасных обзоров, посвященных ФДТ, фотохимии, фотофизике ФС, вопросам синтеза новых ФС с улучшенными фотоокислительными свойствами, распределению и накоплению в органеллах клеток, фото- и темновой токсичности ФС [105, 109–114], поэтому в данном разделе акцент будет сделан на нерешенных проблемах ФДТ и возможных подходах к их решению с помощью конъюгатов ФС с белками и пептидами. Функционирование последних основано на принципах супрамолекулярой химии, при этом супрамолекула образуется за счет белок-белковых взаимодействий между конъюгатом и экзогенными белками или белковыми частями рецепторов.

Кислород тканей – один из ключевых компонентов для образования $^1O_2$. Известно, что по мере роста опухоли быстро нарушается кровоснабжение, приводя к гипоксии тканей. Таким образом, успешное развитие методов ФДТ требует решения задач, связанных с созданием кислород-независимых подходов. Интенсивно ведется поиск ФС, способных реализовать фотоокисление по типу I, положительные результаты получены для некоторых катионных порфиринов [115] и фосфор-замещенных порфиринов [116].

Проблему кислород-независимых подходов к ФДТ также пытаются решить с использованием других стратегий. Первая стратегия основана на создании носителей, которые одновременно доставляют в пораженную клетку фотосенсибилизатор и O_2. Как правило, это загруженные наночастицы [8–10], перфторуглероды [117, 118]. Основные недостатки данного подхода – большой единичный объем препарата и связанная с этим низкая проникающая способность. Кроме того, трудно решаемая проблема – высвобождение O_2 в требуемом пораженном участке. Например, перфторуглероды – прекрасные носители O_2, но высвобождение загруженного O_2 начинается сразу после инъекции в кровоток, потому что O_2 высвобождается в основном посредством диффузии, управляемой градиентами концентрации [119, 120]. Вторая стратегия основана на создании конъюгатов фотосенсибилизаторов с каталазой или каталазоподобными материалами. Каталаза – один из важнейших ферментов, который может катализировать разложение внутриклеточной перекиси водорода (H_2O_2) на O_2 и H_2O. Достоверно известно, что внутриклеточный уровень H_2O_2 в опухолях всегда выше. Например, была создана конструкция, включающая каталазу и альгинат-диальдегид, фотосенсибилизатор бенгальский розовый. Полученный конъюгат был загружен в кальцинированнные пористые частицы [121]. Более эффективные конъюгаты сконструированы

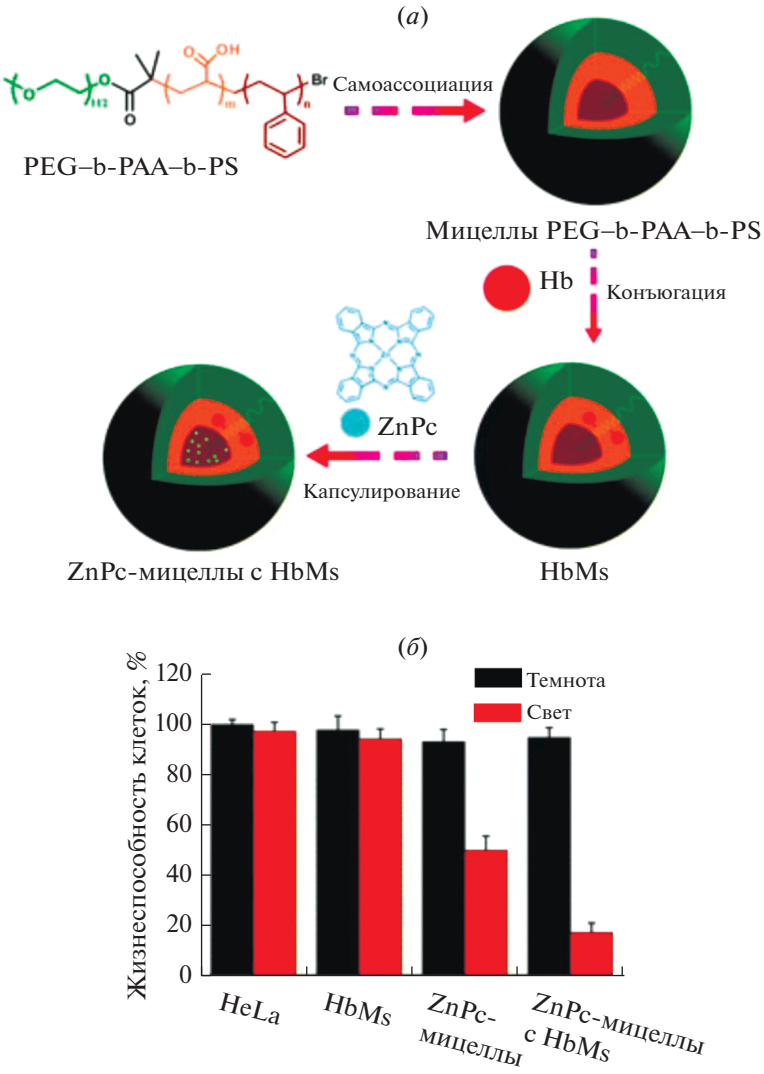


Рис. 11. (*а*) – Синтез ZnPc-мицелл, загруженных в мицеллы гемоглобина (HbMs); (*б*) – сравнение фото- и темновой токсичности клеток HeLa по отношению к HbMs, ZnPc-мицеллам и ZnPc-мицеллам с HbMs [126].

на основе поли-(D,L-молочной-со-гликолевой кислоты) – носителя, в который инкапсулировали каталазу и фотосенсибилизатор (метиленовый синий) [122]. Phua et al. разработали наносистему [123], также содержащую каталазу, в которой каталазу сначала конъюгировали с функционализированной β-циклодекстрином гиалуроновой кислотой с образованием наночастиц, а затем наночастицами загружали модифицированный адамантаном хлорин e6. Основной недостаток данной стратегии – проблема с доставкой загруженного в полимер или наночастицы конъюгата, низкая туморотропность, сложность получения конъюгата.

Альтернативная стратегия основана на создании фотосенсибилизаторов, способных участвовать в окислительных процессах по типу I, т.е. связанных с процессами фотоиндуцированного переноса электрона, генерацией радикальных форм. В данном направлении работает несколько научных групп. Например, под руководством Hamblin было показано, что при использовании в качестве фотосенсибилизатора наночастиц $(TiO_2)_n$, органических красителей (бенгальский розовый, метиленовый синий, порфирин [124, 125]) в присутствии неорганических солей процессы фотоокисления биосубстратов реализуются по механизму I. Иной стратегии, основанной на создании системы ФДТ, способной переносить кислород, придерживались Wang et al. [126]. Ими был получен новый фотосенсибилизатор-носитель с кислородной самокомпенсирующейся способностью. Он был синтезирован путем конъюгирования гемоглобина (Hb) с полимерными мицеллами, образованными триблок-сополимерами поли(эти-

ленгликоля)–блок-поли(акриловой кислоты)–блок-полистирол (PEG–b-PAA–b-PS) (рис. 11).

Фталоцианин цинка (ZnPc) был инкапсулирован в конъюгированные с гемоглобином мицеллы в качестве фотосенсибилизатора. Было подтверждено, что полученные мицеллы генерируют больше синглетного кислорода и вызывают большую фотоцитотоксичность для клеток HeLa *in vitro* по сравнению с мицеллами, нагруженными ZnPc без гемоглобина.

Другая проблема ФДТ – это повышение избирательного накопления фотоактивируемых молекул в опухолевой ткани. Ковалентное присоединение порфиринов и родственных макроциклов к пептидам и белкам может решить эту проблему благодаря их усиленному клеточному захвату, благоприятному субклеточному распределению и способности нацеливания белковой части конъюгатов на рецепторы или ферменты, чрезмерно экспрессируемые данной тканью или клеткой. Таким образом, супрамолекула образуется непосредственно в организме за счет белок-белковых взаимодействий между эндогенным конъюгатом и экзогенными белками.

Например, в работе Yu et al. сообщается о конъюгате фталоцианин–пептид (Tyr-His-Trp-Tyr-Gly-Tyr-Thr-Pro-Gln-Asn-Val-Ile) [127], который нацелен на рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) и продемонстрировал более высокий клеточный захват клетками эпидермоидной карциномы A431 со сверхэкспрессией EGFR по сравнению с клетками аденокарциномы молочной железы человека MCF7 с низкой экспрессией EGFR. Оказалось, что предварительная обработка клеток A431 указанным выше пептидом значительно ингибировала клеточное поглощение конъюгата, а сам конъюгат проявлял исключительную цитотоксичность, активируемую светом, в отношении клеток A431. Эти данные показывают, что вектор – это пептид, который участвует в белок-белковых взаимодействиях с EGFR. Высокую эффективность в лечении базальноклеточного и плоскоклеточного рака, а также предраковых состояний, таких как солнечный кератоз, демонстрирует конъюгат трикатионного 5-(4-карбоксифенил)-10,15,20-трис(4-метилпиридиния)-4-ил)порфирин трииодида с поли-*S*-лизином [128]. Циклический пептид RGD, выступающий лигандом для рецептора интегрина $\alpha_v\beta_3$, был ковалентно конъюгирован с фотосенсибилизатором на основе хлорофилла. Данный конъюгат позволил улучшить визуализацию опухоли и увеличить эффективность ФДТ через 2–4 ч после инъекции, а также продемонстрировал высокую специфичность [129].

Подобных примеров в литературе огромное количество, все это свидетельствует о перспективности подхода и, возможно, скорого внедрения в лечебную практику. В обзорной статье Biscaglia et al. [130] представлены аминокислотные последовательности, обеспечивающие самонаведение на опухолевые клетки, а также пептиды, проникающие в клетки с локализацией в ядре и митохондриях. Потенциально все они могут быть использованы в конъюгатах с ФС. Широко применяется стратегия нацеливания для увеличения сродства ФС к опухолям за счет ковалентной связи порфиринов с аминокислотными конъюгатами. Известно, что порфирины, связанные с аминокислотами, приобретают дополнительные свойства, важные для ФДТ. Среди них водорастворимость [131], способность интеркалировать последовательности ДНК с высокой специфичностью [132–135] и высокое поглощение клетками опухоли [136].

Конъюгаты ФС с антителами (Ab) представляют особый интерес из-за их чрезвычайно высокой селективности и сродства к соответствующим антигенам. Конъюгация ФС с Ab приводит к образованию активных молекул, нацеленных на опухоль и способных связывать антигены или рецепторы, которые сверхэкспрессируются в опухолях. У млекопитающих антитела делятся на пять изотипов (IgA, IgD, IgG, IgE, IgM). На сегодняшний день антитела можно разделить на четыре основные группы: поликлональные, моноклональные, фрагменты антител и нанотела. Наиболее отчетливые различия можно проследить между поли- и моноклональными антителами. Поликлональные антитела относительно недороги, их сравнительно легко получать и хранить, они обладают высокой стабильностью, связываются с несколькими эпитопами и имеют хорошую чувствительность, но они характеризуются разным составом, т.к. выделяются из сыворотки крови иммунизированных животных. Моноклональные антитела более дорогие, обладают высокой специфичностью по отношению к одному эпитопу и чрезвычайно гомогенны [137]. Несколько маркеров опухолевых клеток были исследованы для активного фотодинамического нацеливания, включая рецепторы трансферрина (TR), фолиевой кислоты (FR), фактора роста, рецепторы липопротеинов низкой плотности (LDL), интегрина, инсулина и переносчики глюкозы. Другие потенциальные маркеры опухолевых клеток часто включают гликопротеины, такие как опухолевые маркеры рака легких (например, CEA, CYFRA21-1 и NSE), желудочно-кишечные опухолевые маркеры (например, CEA, CA199, группа CA242 и CA724), маркеры рака молочной железы (CA153), рака яичников (CA125), гепатоцеллюлярной карциномы (AFP), рака простаты (PSA) и хориокарциномы (HCG) [138]. Наиболее распространенные мембранные рецепторы, на которые могут быть нацелены конъюгаты ФС–mAb, описаны в статье Fernandes et al. [139]. Синтетические

подходы к получению конъюгатов антитело–фотосенсибилизатор широко представлены в литературе [137, 140–143].

Терапевтический потенциал конъюгата ФС с антителами зависит от его локализации. Антитела, как правило, не могут проходить сквозь клеточную мембрану, поэтому конъюгаты антитело–ФС построены на антителах, нацеленных в основном на рецепторы, доступные на клеточной мембране. Тем не менее известны случаи интернализации конъюгатов ФС–Ab, обладающих, по сведениям Vrouenraets et al. [144], большей фотодинамической активностью, чем конъюгаты, накапливающиеся снаружи на клеточной мембране. Считается, что чуть ли не единственный механизм интернализации ФС–Ab – это эндоцитоз, опосредованный рецепторами. Например, у клеточных линий рака молочной железы MDA-MB-231 и MCF-7 выявлена сверхэкспрессия рецепторов гонадотропин-рилизинг-гормона. Учитывая это, был получен конъюгат рилизинг-гормона гонадотропина с β-карбоксифталоцианином цинка (ZnPc-COOH), который поглощался клетками посредством эндоцитоза и обладал высокой фототоксичностью в отношении вышеупомянутых клеточных линий [145].

По сравнению с традиционной ФДТ, таргетная фотодинамическая терапия (тФДТ) улучшает соотношение между эффективностью и токсичностью при лечении солидных злокачественных новообразований [137] благодаря высокой специфичности связывания конъюгата ФС–Ab аберрантно экспрессирующими рецепторами-мишенями при сохранении прилегающих нормальных тканей.

Буквально несколько лет назад среди медиков, биологов, биохимиков и медицинских химиков было распространено мнение о том, что оптимальные механизмы клеточной гибели после ФДТ – аутофагия и апоптоз [146]. При этих механизмах клеточной гибели ферменты и клеточные осколки не попадают в межклеточную жидкость и не вызывают воспаление (как в случае некроза) здоровых тканей. В последнее время эти взгляды пересматриваются, т.к. эффективный терапевтический метод должен не только на время искоренить болезнь, но и обеспечить защиту от нее в будущем за счет активации иммунной системы. ФДТ может вызывать острое воспаление и привлекать иммунные клетки [147, 148]. Понимание механизма, способствующего развитию иммунитета, поможет в разработке эффективных агентов для иммунотерапии. В качестве доводов, подтверждающих данный тезис, можно привести следующее: фотоактивация конъюгата ФС–Ab приводит к фотоокислению биосубстратов клеток, вызывает клеточную гибель, что активирует иммунный ответ, который в дальнейшем способствует уничтожению раковой опухоли. Однако эти иммунные клетки (Т-клетки), эффективные для борьбы с онкологическим заболеванием, подавляются другими иммунными регуляторными Т-клетками (Treg). Поэтому в настоящее время перспективны разработки конъюгатов и супрамолекулярных систем, вызывающих иммунный ответ, нацеленный на Treg. По мнению ряда исследователей [139, 149, 150], эти работы могут стать основой для иммунотерапии, помогающей иммунной системе пациентов распознавать и уничтожать раковые клетки.

Следует отметить и другие перспективы использования конъюгатов ФС с белками, пептидами и аминокислотами. В первую очередь, это возможность генерирования различных форм активного кислорода, которые позволяют концентрировать окислительное повреждение в целевой области. Хорошо известно, что аминокислотные остатки в белках имеют разную окислительную способность. Выделяют уязвимые аминокислотные остатки, среди которых Cys, His, Met, Tyr и Trp [151–154]. Время жизни активных форм кислорода, генерируемых ФС, невелико, как и расстояние, на которое они могут удалиться от ФС до перехода кислорода в триплетную форму. Поэтому если в составе конъюгата или супрамолекулы ФС–пептид (белок) будут уязвимые аминокислоты, это может способствовать запуску каскадного окисления, приводящего к повреждению мишени [155–157]. Однако изучение механизмов окисления белка, тем более опосредованного эндогенными аминокислотными остатками конъюгатов, – чрезвычайно сложная задача, но, возможно, в обозримом будущем мы увидим успехи и в данном научном направлении.

Фототермическая терапия

Фототермическая терапия (ФТТ) – один из методов неинвазивного лечения онкологических заболеваний (гипертермия рака), основанный на генерации ФС тепла [158]. Известно, что денатурация белков, нарушение клеточной мембраны и абляция опухолевых тканей происходят при температуре 40–43°C и выше [158]. Селективная ФТТ достигается за счет фотоактивации ФС, накопленных на участках опухоли, поглощенная энергия фотонов преобразуется в тепло, достаточное для индукции клеточной гипертермии. Изначально это научное направление развивалось на основе нанохимии неорганических материалов, включая углеродные нанотрубки, наноструктуры золота, поглощающие в ближнем ИК-диапазоне (наностержни, нанооболочки, наноклетки и полые наносферы) [114, 158]. Однако в последнее время стали появляться сообщения об использовании для ФТТ конъюгатов пептид–фотосенсибилизатор [159]. Основные принципы по-

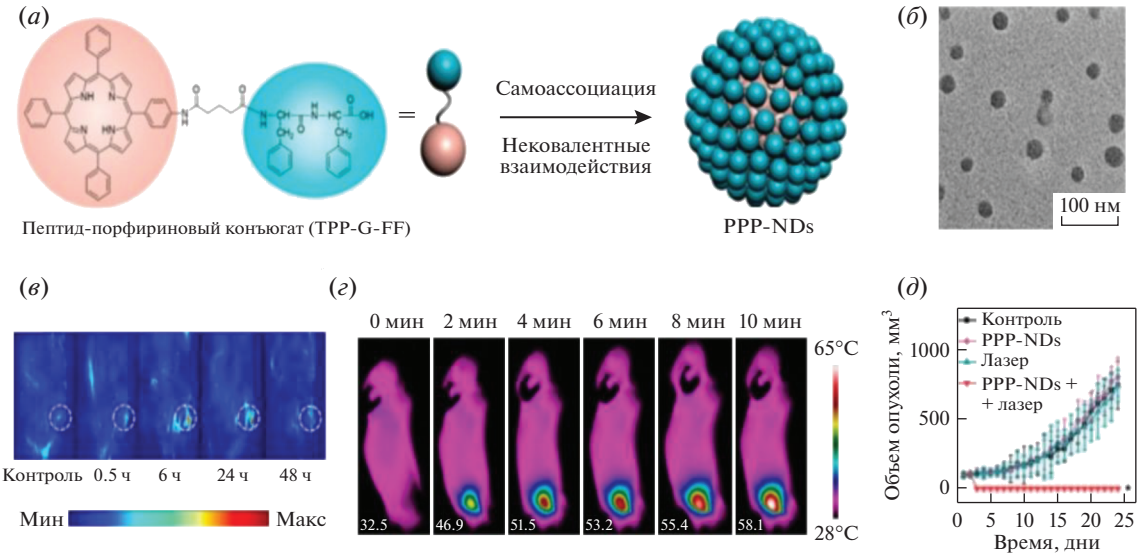


Рис. 12. (*а*) – Получение фототермических наноточек пептид–порфирин (PPP-ND) путем самосборки конъюгата пептид–порфирин (TPP-G-FF); (*б*) – ТЕМ-изображение PPP-ND [161]; (*в*) – фотоакустическое изображение во времени после внутривенной инъекции PPP-ND; (*г*) – ИК-изображения внутривенных PPP-ND, введенных мышам при непрерывном облучении; (*д*) – профили роста опухоли после ФТТ [161].

строения супрамолекулярных систем для ФТТ – высокая загрузка фотосенсибилизатором и подавление флуоресценции для обеспечения диссипации энергии по тепловому пути. Lovell et al. [160] удалось создать наноструктуры (пузырьки), образованные из самоорганизующихся липидных бислоев с порфиринами, которые, по сути, представляли собой фототермический преобразователь. После внутривенной инъекции лабораторным животным супрамолекулярные структуры накапливались в опухолях и позволяли выявлять индуцированную лазерным облучением фототермическую абляцию опухоли. Супрамолекулярное конструирование позволило Zou et al. [161] получить наноточки (рис. 12), состоящие из конъюгата дифенилаланин–пептид–порфирин. Супрамолекулярная агрегация обеспечила полное тушение флуоресценции ФС и ингибирование генерации активных форм кислорода, что привело к термическому рассеиванию поглощенной световой энергии с высокой эффективностью преобразования (54.2%). После лазерного облучения средняя температура в течение 10 мин на участках опухоли увеличилась до 58.1°C, что привело к некрозу опухоли.

Еще более сложная супрамолекулярная система предложена Li et al. [162]. Она состоит из фталоцианинов, содержащих на периферии гидрофильные триэтиленгликольные остатки. В водных средах происходит самоагрегация с образованием наночастиц, устойчивых в водных средах, однако в присутствии целевых белков происходит частичная дезагрегация, а мономеризованные фталоцианины становятся способными к флуоресценции. Авторы утверждают, что полученные супрамолекулярные структуры обладают ФТТ-эффектом, а управляемый белком триггер флуоресценции обеспечивает высокую эффективность для визуализации опухолевых клеток с высокими отношениями сигнал/фон, а также смену терапии с ФТТ на ФДТ. Безусловно, направление ФТТ будет в дальнейшем развиваться, т.к. демонстрирует потенциальную возможность кислород-независимой терапии солидных опухолей.

Транспортные системы/ системы доставки

Ограниченная растворимость фотосенсибилизаторов в воде и склонность к агрегации часто ухудшают их фотофизические свойства, что приводит к снижению биодоступности соединений, поэтому для фотосенсибилизаторов порфиринового, хлоринового и фталоцианинового рядов, независимо от степени гидрофобности, необходима транспортная система [163]. Транспортная система позволяет не только повысить биодоступность и снизить токсичность ФС, но и обеспечивает дополнительные преимущества, такие как усиление мембранной абсорбции, молекулярная стабилизация и улучшение водорастворимости, а также доступность лекарств в биологических системах [164]. Субклеточная локализация ФС в митохондриях, лизосомах, эндоплазматическом ретикулуме и плазматической мембране (различных органеллах) играет решающую роль в задействованном механизме гибели клеток (апоптотическая, некротическая и связанная с ауто-

фагией гибель клеток) [165]. Фактически конъюгация ФС с этими нетоксичными молекулами показала улучшение их амфифильности, биосовместимости и доступности на поверхности мембран раковых клеток [128, 166].

ФДТ требует использовать наномолярные и микромолярные количества ФС, транспортные системы (пептиды и белки) могут обеспечить перенос таких количеств ФС [167]. Более 20 лет интенсивные усилия направлены на развитие таргетной фотодинамической терапии. За этот период были достигнуты очевидные успехи, но многие проблемы остались не решены, особенно в части доставки ФС с помощью пептидов и белков.

Хотя пептиды можно считать отличными векторами для ФС [168], присутствие нескольких положительно заряженных аминокислот в их последовательности может вызывать сильные неспецифические взаимодействия, что делает их неприменимыми для многих приложений *in vivo*. Чтобы избежать преждевременного захвата конъюгата, ФС связывают с “активируемыми” пептидами [169]. Конъюгированный пептид можно нейтрализовать другой противоположно заряженной пептидной последовательностью за счет полиэлектролитных взаимодействий или за счет противоположно заряженного пептида, связанного через специфический протеолитически расщепляемый линкер [170]. После накопления конъюгата в опухоли противоположно заряженный сегмент может быть избирательно отщеплен матриксными металлопротеиназами, присутствующими во внеклеточном матриксе опухоли, в результате конъюгат высвобождается. Исследования *in vivo* на животной модели показали достаточную стабильность активируемого конъюгата в кровотоке и его интенсивное накопление в опухоли, что позволяло визуализировать раковые клетки [171]. Более того, повторные обработки конъюгатом при освещении уменьшали размер и вес солидной опухоли с низкой системной токсичностью для животного [169].

Предлагаются и более сложные подходы к эффективной доставке ФС с нацеливанием в митохондрии пораженных клеток [172]. Например, в работе Tong et al. [172] синтезирован “умный наноноситель”, состоящий из трех функциональных пептидных единиц: 1) гептапептид со специфической способностью связываться с рецептором трансферрина, сверхэкспрессируемый в высокопролиферативных линиях раковых клеток; 2) последовательность, расщепляемая катепсином B (GFLG); 3) последовательность пептида, нацеленного на митохондрии (CGKRK), несущего на *N*-конце остаток адамантана. Через этот остаток пептид был нековалентно связан с β-циклодекстрином, функционализированным с помощью ФС хлорина e6 (рис. 13). Транспорт ФС в митохондрии пораженных клеток [172] происходит в три стадии: 1) внутриклеточное накопление комплекса, опосредованное рецептором, в клетках, сверхэкспрессирующих рецептор трансферрина; 2) ферментативное расщепление последовательности GFLG катепсином B после интернализации, приводящее к получению другой последовательности, направленной в митохондрии; 3) накопление ФС в митохондриях. Протекание каждой стадии в клетках легко контролировалось с помощью флуоресцентной микроскопии, а при световом облучении была обнаружена дозозависимая фотодинамическая цитотоксичность.

В статье Li et al. [173] описан подход инженерии плазматической мембраны для доставки ФС с использованием контактных клеток (“троянский конь”) путем закрепления функционализированных конъюгатов на клеточных носителях. Конъюгаты, фиксирующие мембрану, состоят из положительно заряженной тетрааргининовой пептидной последовательности, встраиваемого в мембрану фрагмента на основе пальмитиновой кислоты, а также лизинового линкера, модифицированого камптотецином, протопорфирином IX. Таким образом, порфирин был прикреплен к клетке-носителю с помощью последовательности, богатой аргинином, заканчивающейся остатком пальмитиновой кислоты для встраивания в мембрану. Туморотропные свойства клеток-носителей позволяли накапливать порфирин на участке опухоли, а при освещении только опухолевые клетки, находящиеся в тесном контакте с клетками-носителями, разрушались с помощью ФТД.

Как уже отмечалось выше, при конъюгировании ФС с пептидами и белками сохраняется проблема интернализации ФС. Эндоцитозное поглощение работает не всегда, поэтому проблема проникновения ФС в клетку до сих пор не решена. Но попытки заставить клетку интернализировать конъюгат интенсивно предпринимаются. Заметное улучшение доступности ФС в субклеточных компартментах ожидается от технологии фотохимической интернализации [174–176].

Принципиально иная стратегия транспортной системы для ФС заключается в использовании глобулярных эндогенных белков. При введении в кровоток большинство препаратов связываются с различными белками сыворотки, включая альбумин и липопротеины высокой и низкой плотности, за счет нековалентных взаимодействий. Считается, что транспортировка ФС этими носителями может улучшить его внутриклеточное накопление через рецептор-опосредованный эндоцитоз [177]. Альбумин представляет собой самый распространенный сывороточный белок в крови человека, его концентрация на порядок превышает общую концентрацию всех белков.

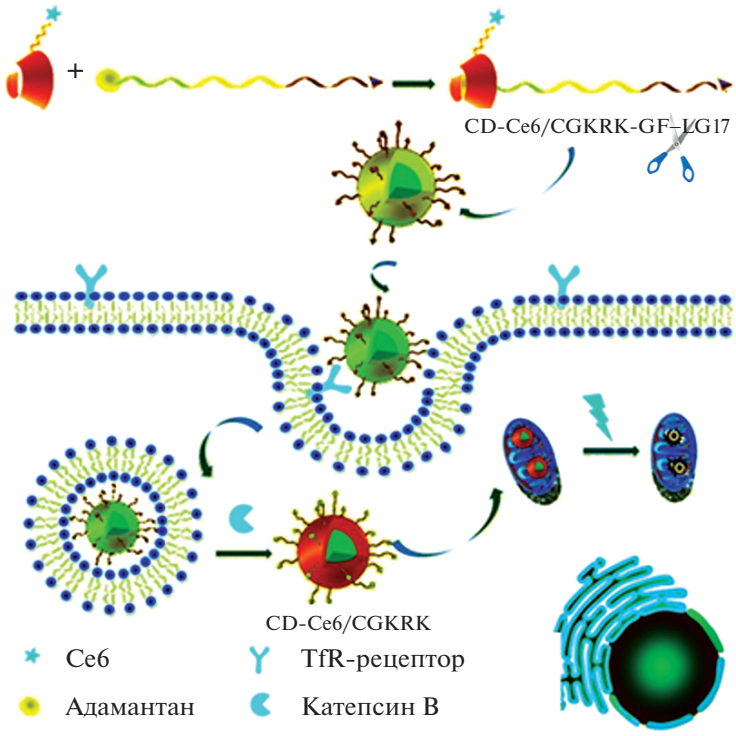


Рис. 13. Схематическое изображение супрамолекулярных наноносителей ФС с двойным нацеливанием [172].

Увеличение метаболизма и пролиферация раковых клеток вызывают сильный и быстрый обмен сывороточного альбумина в опухолях. Биохимическое основание нацеливания ФС на опухолевые клетки альбуминами – способность модифицированных альбуминов и липопротеинов низкой плотности связываться со скавенджер-рецепторами, сверхэкспрессированными на макрофагах. Эти скавенджер-рецепторы способны связывать широкий спектр различных соединений, включая альбумин, и переносить их в клеточные компартменты. Известно, что изначально макрофаги M1 (активированные макрофаги) [178] препятствуют развитию опухолевых клеток, а макрофаги M2 за счет иммунноредактирования, наоборот, способствуют их развитию [179]. Содержание макрофагов может составлять до 50% от массы клеток при некоторых видах рака [180]. Кроме того, использование альбумина в качестве транспортной системы оправдано повышенной проницаемостью и удержанием макромолекул в опухолевых тканях (эффект EPR) [181, 182].

Альбумин способен связывать ФС порфиринового [157], фталоцианинового [183] и хлоринового рядов, используя различные сайты связывания, а также область между доменами [184]. Локализация ФС в альбуминовой глобуле зависит от природы макрогетероцикла, его периферийных заместителей. Простое решение по выделению ФС в опухолевых клетках из альбуминовой транспортной системы продемонстрировано на примере комплексов бычьего сывороточного альбумина с Fe(III)-протопорфирином [185]. При изменении pH среды происходит выгрузка ФС, а т.к. pH у опухолевых клеток кислый [186], возможно, этот механизм будет работать и *in vivo*. Некоторые исследования были предприняты для ковалентного связывания различных фотосенсибилизаторов с измененным альбумином для нацеливания на опухолевые клетки с опосредованным участием скавенджер-рецепторов [187].

Следует отметить, что использование альбумина в качестве транспортных белков для ФС не всегда возможно. Как было показано недавно [88], некоторые тетрапиррольные ФС при связывании альбуминовой глобулой инициируют агрегацию белка, что не только обесценивает транспортные свойства сывороточного белка крови, но и может привести к негативным для здоровья последствиям (нарушению осмотического давления, интоксикации, отекам, гипоальбуминемии).

Антимикробная фотодинамическая терапия

Помимо онкологических другие заболевания, такие как бактериальные, грибковые и вирусные инфекции, которые характеризуются общей не-

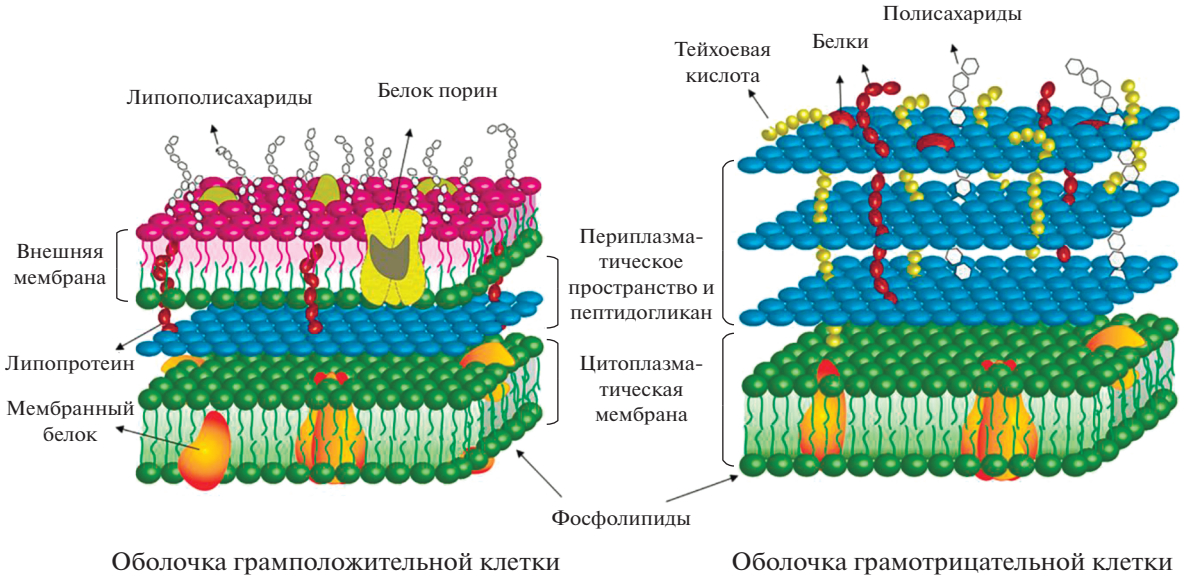


Рис. 14. Схематическое изображение клеточной оболочки грамотрицательных и грамположительных бактерий [196, 197].

контролируемой пролиферацией клеток и наличием нежелательных клеток микроорганизмов, можно лечить с помощью фотодинамической терапии. В этом случае метод называется антимикробной фотодинамической терапией (аФДТ) или фотодинамической инактивацией (ФДИ) [188–190]. В последние годы наблюдается рост числа исследований *in vitro* и *in vivo*, показывающих положительные результаты в отношении аФДТ, применяемой в стоматологии: в периодонтологии, эндодонтии и при инфекциях слизистых оболочек [191]. Нами недавно был опубликован обзор по фотоинактивации вирусов [192], поэтому в данном обзоре в основном будут затронуты вопросы аФДТ. Как показали исследования последних лет, индивидуальные ФС менее эффективны, чем их конъюгаты с белками [193]. Из глобулярных белков в качестве конъюгатов с ФС для аФДТ рассматриваются апомиоглобин, β-лактоглобулин, сывороточные белки крови и др. Перечисленные носители имеют общие характерные черты: водорастворимость и наноразмерность, что обеспечивает биодоступность соединения. Кроме того, указанные белки наделены гидрофобными сайтами связывания, по своей природе биосовместимы и легко выделяются в больших количествах.

По составу клеточной стенки бактерии делятся на две группы: грамположительные (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* и др.) и грамотрицательные (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia* и др.) [194, 195]. Строение клеточной стенки играет определяющую роль в чувствительности бактерий к ФС (рис. 14), которая существенно ниже у грамотрицательных бактерий.

Высокая восприимчивость видов грамположительных бактерий к ФС по сравнению с грамотрицательными бактериями объясняется присутствием относительно пористого слоя пептидогликана и липотейхоевой кислоты в их клеточной стенке, что позволяет молекулам ФС диффундировать к целевым сайтам внутри клетки. Напротив, клеточная стенка грамотрицательных бактерий содержит отрицательно заряженный липополисахарид, который препятствует проникновению нейтральных или анионных порфиринов из внешней среды в бактериальную клетку. Именно поэтому подавляющее большинство исследований изначально было связано с изучением катионных ФС, но даже их эффективность существенно повышается за счет конъюгации с пептидами и белками [188]. Это было обнаружено, например, для конъюгатов полипептидов и белков с различными по природе ФС [198–200]. Считается, что лучшая эффективность аФДТ с использованием конъюгатов ФС с белками и пептидами основана на дезорганизующем действии белков или пептидов на клеточную стенку бактерий, что увеличивает ее проницаемость, или на электростатическом взаимодействии, например, катионного пептида конъюгата с отрицательно заряженным липополисахаридом грамотрицательных бактерий [201–204].

В научной литературе представлена масса решений повышения селективности и эффективности аФДТ, среди них – синтез конъюгатов ФС с нацеленными биологически активными соединениями, как, например, недавно полученный конъюгат катионного порфирина с липопепти-

дом полимиксина. Полимиксины известны как вещества, повышающие проницаемость мембраны грамотрицательных бактерий. Конъюгат действительно показал широкий спектр антибактериальной активности при световом облучении и высокую эффективность. Известны примеры конъюгатов ФС с моноклональными антителами или бактериофагами, что позволяет избирательно связываться со специфическими структурами микроорганизма – мишенями. Наиболее доступные и достоверно установленные внеклеточные и внутриклеточные мишени, а также общий обзор возможных целевых локусов бактерий представлены в статьях Liu et al. [196] и Alves et al. [205]. Возможно, в дальнейшем потребуются более сложные нацеливающие конструкции, позволяющие ФС воздействовать на геном патогена, т.к. остальные целевые мишени (липиды, белки патогена) требуют большей дозы ФС для нарушения мембраны или окисления белка [206–208]. Но уже сейчас очень много положительных результатов в борьбе с болезнетворными бактериями, в том числе склонными к образованию биопленок, которые способствуют хронизации и рецидиву инфекций, а также возникновению устойчивости патогенов к антибиотикам [209–212].

Множественная лекарственная устойчивость патогенных бактерий стала серьезной угрозой для здоровья населения. ВОЗ предупреждает, что приближается "постантибиотическая" эра. Уже существуют грамположительные и грамотрицательные супербактерии, такие как *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и виды *Enterobacter*, так называемые патогены ESKAPE, способные противостоять антибиотикам почти всех типов/классов. Поэтому поиск новых подходов к борьбе с бактериями с множественной лекарственной устойчивостью становится все более важным. В этом контексте антибактериальная фотодинамическая терапия – самый многообещающий подход к лечению инфекций, вызываемых бактериями с множественной устойчивостью к антибиотикам.

Медицинская диагностика

Известно, что многие тетрапиррольные макрогетероциклические соединения демонстрируют усиленное флуоресцентное излучение в красной или ближней ИК-области, поэтому порфирины, хлорины и другие родственные соединения могут найти применение в качестве контрастных агентов ближнего ИК-диапазона при флуоресцентной визуализации [213, 214], что позволяет создать интегративную систему диагностики и терапии (тераностики), которая представляет собой новый подход к лечению рака. Сочетание такой техники с ФДТ позволяет проводить более ориентированное и эффективное лечение, помимо предоставления информации о распределении фотосенсибилизатора и гибели клеток [215–217]. Очень перспективны для визуализации хлорины и бактериохлорины, подходящие для практического применения, т.к. эти соединения показывают узкие полосы поглощения и излучения в красной или ближней ИК-области с хорошим стоксовым сдвигом (>85 нм) [218–223]. Наряду с высокими квантовыми выходами, высокая туморотропность ФС не менее значима для диагностики. Многие водорастворимые ФС могут селективно накапливаться в опухолевых тканях и вводиться внутривенно [224], но селективность их накопления существенно повышается при использовании конъюгатов ФС с липопротеинами низкой плотности, моноклональными антителами и другими белками. Например, хлорин e6 в составе конъюгата с моноклональными антителами OC125 накапливается в 3–4 раза эффективнее, чем свободный хлорин e6 [225]. Еще большую актуальность приобретает проблема использования транспортной системы, которая возникает в случае гидрофобных ФС. В клетках рака молочной железы наблюдается сверхэкспрессия рецепторов HER2. В работе Agadjanian et al. [226] сообщалось о визуализации *in vivo* и терапевтической эффективности коррола, нековалентно связанного с модифицированным герегулином белком (Her Ga), направленным на рецепторы HER2. Этот конъюгат не проявлял токсичности для сердца или других органов. Фотовозбуждение того же конъюгата привело к усилению цитотоксичности, приводящей к апоптозу [226].

Визуализация – необходимый инструмент, поскольку он позволяет проводить наблюдение и анализировать течение заболевания, отслеживать изменения, происходящие с опухолью, а также проверять адекватность лечения. Недавно была создана мультимодельная наноплатформа на основе порфирин-липопротеинов, предназначенная для позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), флуоресцентной визуализации и ФДТ. Данная система, как сообщается в работе Muhanna et al. [227], демонстрирует большой потенциал для повышения точности определения стадии рака полости рта и, возможно, его лечения. С использованием клинически релевантной модели карциномы полости рта кролика VX-2 была обнаружена не только первичная опухоль, но также метастазы опухоли к региональным лимфатическим узлам с помощью предоперационной визуализации (позитронно-эмиссионной томографии) и интраоперационной флуоресцентной визуализации (рис. 15).

В последние годы количество исследований биомаркеров для ранней диагностики заболеваний постоянно растет [65]. Создание зондов для визуализации биомаркеров в живых тканях –

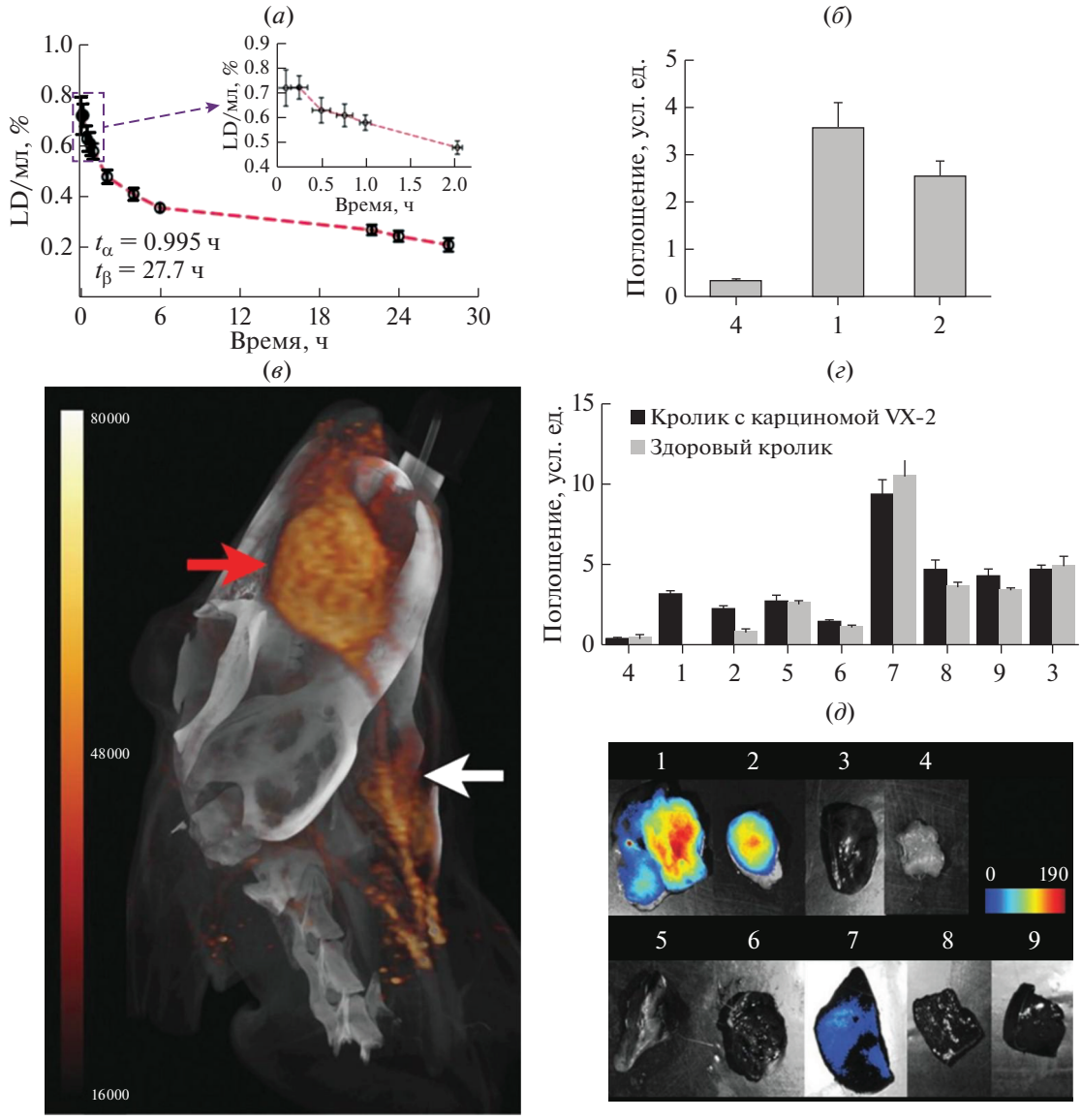


Рис. 15. Обнаружение основной опухоли (карциномы VX-2) и ее метастаза в лимфатическом узле кролика: (*а*) – фармакокинетический профиль наночастиц у кроликов с VX-2 ($n = 4$); (*б*) – распределение ^{64}Cu-меченных порфирин-липопротеиновых наночастиц (^{64}Cu-PLP) в мышцах (4), опухолях (1) и лимфатических узлах (2) количественно определено с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ). Поглощение PLP опухолью и лимфатическими узлами было значительно выше, чем поглощение мышцами ($n = 4$, $p < 0.05$); (*в*) – 3D-изображение шеи кролика через 24 ч после инъекции ^{64}Cu-PLP, полученное методом ПЭТ (красная стрелка – опухоль, белая стрелка – лимфатический узел); (*г*) – распределение ^{64}Cu-PLP в основных органах здоровых кроликов и кроликов с карциномой VX-2, измеренное с помощью γ-счетчика: 1 – опухоль, 2 – лимфатический узел, 3 – слюнная железа, 4 – мышцы, 5 – легкое, 6 – сердце, 7 – печень, 8 – селезенка, 9 – почка; (*д*) – *ex vivo* флуоресценция опухоли, лимфатического узла и других основных органов кроликов с карциномой VX-2 после ПЭТ [227].

сложная задача [138]. Например, количественные и качественные изменения коллагена I типа, основного компонента внеклеточного матрикса кожи и других жизненно важных органов, часто связаны с патофизиологией этих органов. Коллагелин-специфический пептид [65], связывающий коллаген, был ковалентно связан с тетрафенилпорфирином в качестве флуоресцентного молекулярного зонда для диагностической визуализации раннего фиброза печени. Хроническое заболевание печени характеризуется накоплением белков внеклеточного матрикса, особенно коллагена, который разрушает архитектуру печени, образуя фиброзный рубец. В работе Chilakamarthi et al. [228] показано, что конъюгат тетрафенилпорфирина с коллагелином специфически свя-

зывается с коллагеном, а коллагелин без тетрафенилпорфирина плохо связывается с коллагеном. В условиях *ex vivo* и *in vivo* зонд может дифференцировать фиброз печени, что делает его перспективным для использования при лечении хронических заболеваний печени.

Сравнительно новый метод визуализации – фотоакустическая визуализация. Данный метод отличается большей проникающей способностью и высоким пространственным разрешением [229, 230]. В основе метода лежит поглощение света молекулами, создающее термически индуцированный скачок давления, который производит ультразвуковые волны, подлежащие детектированию. Рассмотренные выше ФС для ФТТ обладают всеми необходимыми свойствами для фотоакустической визуализации и в ряде работ демонстрируют отличную работоспособность [231–234].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Супрамолекулярные системы на основе макроциклических соединений с протеинами находят широкое применение в различных областях науки и техники. Уникальные фотохимические и фотофизические свойства супрамолекулярных систем позволяют применять их при создании светотрансформирующих (светособирающих) систем, искусственного фотосинтеза, в медицине для диагностики и лечения широкого ряда заболеваний, включая онкологию и бактериальные инфекции. Супрамолекулярный подход позволяет не только улучшить уже созданные молекулярные устройства или используемые лекарственные формы, но и демонстрирует развитие новых направлений, например, фототермическую терапию или создание супрамолекулярных систем, участвующих в фотопроцессах по типам I, III и IV, что, возможно, решит проблему кислородной зависимости ФДТ. Искусственная система сбора световой энергии на основе супрамолекул ФС с белками, вероятно, позволит достигнуть столь необходимого пространственно-разделенного переноса экситонов. Еще предстоит решить огромное количество вопросов, но, по мнению авторов, область исследований супрамолекулярных систем обещает стремительно развиваться в ближайшие годы.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-13-50125.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mattia E., Otto S.* // Nat. Nanotechnol. 2015. V. 10. P. 111–119. https://doi.org/10.1038/nnano.2014.337
2. *Lombardo D., Kiselev M.A., Magazù S., Calandra P.* // Adv. Phys. 2015. V. 2015. https://doi.org/10.1155/2015/151683
3. *Li Q., Han C., Horton S.R., Fuentes-Cabrera M., Sumpter B.G., Lu W., Bernholc J., Maksymovych P., Pan M.* // ACS Nano. 2012. V. 6. P. 566–572. https://doi.org/10.1021/nn203952e
4. *Northrop B.H., Zheng Y.-R., Chi K.-W., Stang P.J.* // Acc. Chem. Res. 2009. V. 42. P. 1554–1563. https://doi.org/10.1021/ar900077c
5. *Pauling L.* // J. Am. Chem. Soc. 1931. V. 53. P. 1367–1400. https://doi.org/10.1021/ja01355a027
6. *McNaught A.D., Wilkinson A.* // Compendium of Chemical Terminology. Oxford: Blackwell Science, 1997.
7. *van der Lubbe S.C., Fonseca Guerra C.* // Chemistry – an Asian Journal. 2019. V. 14. P. 2760–2769. https://doi.org/10.1002/asia.201900717
8. *Phipps M.J., Fox T., Tautermann C.S., Skylaris C.-K.* // Chem. Soc. Rev. 2015. V. 44. P. 3177–3211. https://doi.org/10.1039/C4CS00375F
9. *Van Der Lubbe S.C., Zaccaria F., Sun X., Guerra C.F.* // J. Am. Chem. Soc. 2019. V. 141. P. 4878–4885. https://doi.org/10.1021/jacs.8b13358
10. *Petersen J.* // Phys. Rev. D. 1977. V. 15. P. 574
11. *Hunter C.A., Sanders J.K.* // J. Am. Chem. Soc. 1990. V. 112. P. 5525–5534. https://doi.org/10.1021/ja00170a016
12. *Martinez C.R., Iverson B.L.* // Chemical Science. 2012. V. 3. P. 2191–2201. https://doi.org/10.1039/C2SC20045G
13. *Wheeler S.E.* // J. Am. Chem. Soc. 2011. V. 133. P. 10262–10274. https://doi.org/10.1021/ja202932e
14. *Ninković D.B., Blagojević Filipović J.P., Hall M.B., Brothers E.N., Zarić S.D.* // ACS Cent. Sci. 2020. V. 6. P. 420–425. https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00005
15. *Lanigan N., Assoud A., Zhang W., Wang X.* // Chem. Eur. J. 2019. V. 25. P. 12221–12227. https://doi.org/10.1002/chem.201903138
16. *Percec V., Glodde M., Bera T., Miura Y., Shiyanovskaya I., Singer K., Balagurusamy V., Heiney P., Schnell I.,*

Rapp A. // Nature. 2002. V. 419. P. 384–387. https://doi.org/10.1038/nature01072

17. *Hobza P., Zahradník R., Müller-Dethlefs K.* // Collect. Czech. Chem. Commun. 2006. V. 71. P. 443–531. https://doi.org/10.1135/cccc20060443
18. *Černý J., Hobza P.* // PCCP. 2007. V. 9. P. 5291–5303. https://doi.org/10.1039/B704781A
19. *Autumn K., Liang Y.A., Hsieh S.T., Zesch W., Chan W.P., Kenny T.W., Fearing R., Full R.J.* // Nature. 2000. V. 405. P. 681–685. https://doi.org/10.1038/35015073
20. *van der Vegt N.F., Nayar D.* // J. Phys. Chem. B. 2017. V. 121. P. 9986–9998. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.7b06453
21. *Fenimore P.W., Frauenfelder H., Magazu S., McMahon B.H., Mezei F., Migliardo F., Young R.D., Stroe I.* // Chem. Phys. 2013. V. 424. P. 2–6. https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2013.06.023
22. *Meyer E.A., Castellano R.K., Diederich F.* // Angew. Chem. Int. Ed. 2003. V. 42. P. 1210–1250. https://doi.org/10.1002/anie.200390319
23. *Steed J.W., Atwood J.L.* // Supramolecular Chemistry. John Wiley & Sons, 2013.
24. *Kuehl C.J., Huang S.D., Stang P.J.* // J. Am. Chem. Soc. 2001. V. 123. P. 9634–9641. https://doi.org/10.1021/ja0114355
25. *Li C.-P., Du M.* // Chem. Commun. 2011. V. 47. P. 5958–5972. https://doi.org/10.1039/C1CC10935A
26. *Lebedeva N. SH., Mal'kova E.A., V'yurgun A.I.* // Rev. J. Chem. 2012. V. 2. P. 20–50. https://doi.org/10.1134/S2079978011040029
27. *Safont-Sempere M.M., Fernández G., Würthner F.* // Chem. Rev. 2011. V. 111. P. 5784–5814. https://doi.org/10.1021/cr100357h
28. *Pascal R., Pross A., Sutherland J.D.* // Open Biology. 2013. V. 3. P. 130156. https://doi.org/10.1098/rsob.130156
29. *Zhao Y., She N., Ma Y., Wang C., Cao Z.* // ACS Catal. 2018. V. 8. P. 4143–4159. https://doi.org/10.1021/acscatal.8b00006
30. *Zhang Z., Li P., Kong X.-Y., Xie G., Qian Y., Wang Z., Tian Y., Wen L., Jiang L.* // J. Am. Chem. Soc. 2018. V. 140. P. 1083–1090. https://doi.org/10.1021/jacs.7b11472
31. *Stromberg J.R., Marton A., Kee H.L., Kirmaier C., Diers J.R., Muthiah C., Taniguchi M., Lindsey J.S., Bocian D.F., Meyer G.J.* // J. Phys. Chem. C. 2007. V. 111. P. 15464–15478. https://doi.org/10.1021/jp0749928
32. *Pan X., Cao P., Su X., Liu Z., Li M.* // Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 2020. V. 1861. P. 148038. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2019.06.010
33. *Gao J., Wang H., Yuan Q., Feng Y.* // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. P. 357. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00357
34. *Toporik H., Li J., Williams D., Chiu P.-L., Mazor Y.* // Nat. Struct. Mol. Biol. 2019. V. 26. P. 443–449. https://doi.org/10.1038/s41594-019-0228-8
35. *Nevo R., Charuvi D., Tsabari O., Reich Z.* // Plant J. 2012. V. 70. P. 157–176. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04876.x
36. *Ferreira K.N., Iverson T.M., Maghlaoui K., Barber J., Iwata S.* // Science. 2004. V. 303. P. 1831–1838. https://doi.org/10.1126/science.1093087
37. *Lubitz W., Chrysina M., Cox N.* // Photosynth. Res. 2019. P. 1–21. https://doi.org/10.1007/s11120-019-00648-3
38. *Cramer W.A., Hasan S.S.* // In: Cytochrome Complexes: Evolution, Structures, Energy Transduction, and Signaling, vol. 41 / Eds. Cramer W., Kallas T. Dordrecht: Springer, 2016. P. 177–207. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7481-9_9
39. *Cramer W.A.* // Photosynth. Res. 2019. V. 139. P. 53–65. https://doi.org/10.1007/s11120-018-0585-x
40. *Malone L.A., Qian P., Mayneord G.E., Hitchcock A., Farmer D.A., Thompson R.F., Swainsbury D.J., Ranson N.A., Hunter C.N., Johnson M.P.* // Nature. 2019. V. 575. P. 535–539. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1746-6
41. *Dumas L., Chazaux M., Peltier G., Johnson X., Alric J.* // Photosynth. Res. 2016. V. 129. P. 307–320. https://doi.org/10.1007/s11120-016-0298-y
42. *Mazor Y., Borovikova A., Caspy I., Nelson N.* // Nat. Plants. 2017. V. 3. P. 1–9. https://doi.org/10.1038/nplants.2017.14
43. *Höhner R., Pribil M., Herbstová M., Lopez L.S., Kunz H.-H., Li M., Wood M., Svoboda V., Puthiyaveetil S., Leister D.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2020. V. 117. P. 15354–15362. https://doi.org/10.1073/pnas.2005832117
44. *Fukuyama K.* // Photosynth. Res. 2004. V. 81. P. 289–301. https://doi.org/10.1023/B:PRES.0000036882.19322.0a
45. *Cashman D.J., Zhu T., Simmerman R.F., Scott C., Bruce B.D., Baudry J.* // J. Mol. Recognit. 2014. V. 27. P. 597–608. https://doi.org/10.1002/jmr.2384
46. *Guo H., Suzuki T., Rubinstein J.L.* // Elife. 2019. V. 8. P. e43128. https://doi.org/10.7554/eLife.43128.001
47. *Hahn A., Vonck J., Mills D.J., Meier T., Kühlbrandt W.* // Science. 2018. V. 360. P. eaat4318. https://doi.org/10.1126/science.aat4318
48. *Dekker J.P., Boekema E.J.* // Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 2005. V. 1706. P. 12–39. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2004.09.009
49. *Anderson J.M., Chow W.S., Park Y.-I.* // Photosynth. Res. 1995. V. 46. P. 129–139. https://doi.org/10.1007/BF00020423
50. *Pascal A.A., Liu Z., Broess K., van Oort B., van Amerongen H., Wang C., Horton P., Robert B., Chang W., Ruban A.* // Nature. 2005. V. 436. P. 134–137. https://doi.org/10.1038/nature03795
51. *Squire R., March N., Rubio A., Ingles J., Cunningham W.* // arXiv preprint arXiv:1608.06913. 2016. https://arxiv.org/abs/1608.06913

52. *Frischmann P.D., Mahata K., Würthner F.* // Chem. Soc. Rev. 2013. V. 42. P. 1847–1870. https://doi.org/10.1039/C2CS35223K
53. *Lebedeva N.S., Gubarev Y.A., Koifman O.I.* // Mendeleev Commun. 2015. V. 25. P. 307–309. https://doi.org/10.1016/j.mencom.2015.07.027
54. *Aratani N., Osuka A., Kim Y.H., Jeong D.H., Kim D.* // Angew. Chem. Int. Ed. 2000. V. 39. P. 1458–1462. https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(20000417)-39:8<1458::AID-ANIE1458>3.0.CO;2-E
55. *Kim Y.H., Jeong D.H., Kim D., Jeoung S.C., Cho H.S., Kim S.K., Aratani N., Osuka A.* // J. Am. Chem. Soc. 2001. V. 123. P. 76–86. https://doi.org/10.1021/ja0009976
56. *Takahashi R., Kobuke Y.* // J. Am. Chem. Soc. 2003. V. 125. P. 2372–2373. https://doi.org/10.1021/ja028325y
57. *D'Souza F.* // Coord. Chem. Rev. 2016. V. 322. P. 104–141. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.05.012
58. *Natali M., Scandola F.* // In: Applied Photochemistry. Lecture Notes in Chemistry, vol. 92 / Eds. Bergamini G., Silvi S. Springer, Cham, 2016. P. 1–66. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31671-0_1
59. *Lee S.H., Matula A.J., Hu G., Troiano J.L., Karpovich C.J., Crabtree R.H., Batista V.S., Brudvig G.W.* // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2019. V. 11. P. 8000–8008. https://doi.org/10.1021/acsami.8b20996
60. *Wróbel D., Graja A.* // Coord. Chem. Rev. 2011. V. 255. P. 2555–2577. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.12.026
61. *Shukla J., Singh V.P., Mukhopadhyay P.* // ChemistryOpen. 2020. V. 9. P. 304–324. https://doi.org/10.1002/open.201900339
62. *Yu X., Wang B., Kim Y., Park J., Ghosh S., Dhara B., Mukhopadhyay R.D., Koo J., Kim I., Kim S.* // J. Am. Chem. Soc. 2020. V. 142. P. 12596–12601. https://doi.org/10.1021/jacs.0c05339
63. *Panda M.K., Ladomenou K., Coutsolelos A.G.* // Coord. Chem. Rev. 2012. V. 256. P. 2601–2627. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.04.041
64. *Imahori H.* // J. Phys. Chem. B. 2004. V. 108. P. 6130–6143. https://doi.org/10.1021/jp038036b
65. *Muzard J., Sarda-Mantel L., Loyau S., Meulemans A., Louedec L., Bantsimba-Malanda C., Hervatin F., Marchal-Somme J., Michel J.B., Le Guludec D.* // PLoS One. 2009. V. 4. P. e5585. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005585
66. *Lourenço L.M., Hausmann A., Schubert C., Neves M.G., Cavaleiro J.A., Torres T., Guldi D.M., Tomé J.P.* // ChemPlusChem. 2015. V. 80. P. 832. https://doi.org/10.1002/cplu.201500005
67. *El-Khouly M.E., El-Mohsnawy E., Fukuzumi S.* // J. Photochem. Photobiol. C. 2017. V. 31. P. 36–83. https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2017.02.001
68. *Otsuki J.* // J. Mater. Chem. 2018. V. 6. P. 6710–6753. https://doi.org/10.1039/C7TA11274B
69. *Beletskaya I., Tyurin V.S., Tsivadze A.Y., Guilard R., Stern C.* // Chem. Rev. 2009. V. 109. P. 1659–1713. https://doi.org/10.1021/cr800247a
70. *Steinberg-Yfrach G., Rigaud J.-L., Durantini E.N., Moore A.L., Gust D., Moore T.A.* // Nature. 1998. V. 392. P. 479–482. https://doi.org/10.1038/33116
71. *O'Regan B., Grätzel M.* // Nature. 1991. V. 353. P. 737–740. https://doi.org/10.1038/353737a0
72. *Zeng K., Tong Z., Ma L., Zhu W.-H., Wu W., Xie Y.* // Energy & Environmental Science. 2020. https://doi.org/10.1039/C9EE04200H
73. *Balaban T.S.* // Acc. Chem. Res. 2005. V. 38. P. 612–623. https://doi.org/10.1021/ar040211z
74. *Choi M.S., Yamazaki T., Yamazaki I., Aida T.* // Angew. Chem. Int. Ed. 2004. V. 43. P. 150–158. https://doi.org/10.1002/anie.200301665
75. *Jang W.-D., Aida T.* // Macromolecules. 2003. V. 36. P. 8461–8469. https://doi.org/10.1021/ma034221b
76. *Kim D., Heo J., Ham S., Yoo H., Lee C.-H., Yoon H., Ryu D., Kim D., Jang W.-D.* // Chem. Commun. 2011. V. 47. P. 2405–2407. https://doi.org/10.1039/C0CC04654J
77. *Kim S., Kim J.H., Lee J.S., Park C.B.* // Small. 2015. V. 11. P. 3623–3640. https://doi.org/10.1002/smll.201500169
78. *Zou Q., Zhang L., Yan X., Wang A., Ma G., Li J., Möhwald H., Mann S.* // Angew. Chem. 2014. V. 126. P. 2398–2402. https://doi.org/10.1002/ange.201308792
79. *Tao K., Xue B., Frere S., Slutsky I., Cao Y., Wang W., Gazit E.* // Chem. Mater. 2017. V. 29. P. 4454–4460. https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.7b00966
80. *Pepe-Mooney B.J., Kokona B., Fairman R.* // Biomacromolecules. 2011. V. 12. P. 4196–4203. https://doi.org/10.1021/bm201354m
81. *Kuciauskas D., Kiskis J., Caputo G.A., Gulbinas V.* // J. Phys. Chem. B. 2010. V. 114. P. 16029–16035. https://doi.org/10.1021/jp108685n
82. *Kim J.H., Nam D.H., Lee Y.W., Nam Y.S., Park C.B.* // Small. 2014. V. 10. P. 1272–1277. https://doi.org/10.1002/smll.201302627
83. *Zhao L., Zou H., Zhang H., Sun H., Wang T., Pan T., Li X., Bai Y., Qiao S., Luo Q.* // ACS Nano. 2017. V. 11. P. 938–945. https://doi.org/10.1021/acsnano.6b07527
84. *Lebedeva N.S., Gubarev Y.A., Vyugin A.I., Koifman O.I.* // J. Lumin. 2015. V. 166. P. 71–76. https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2015.04.041
85. *Lebedeva N.S., Yurina E.S., Guseinov S.S., Gubarev Y.A., Syrbu S.A.* // Dyes and Pigments. 2019. V. 162. P. 266–271. https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.10.034
86. *Lebedeva N.S., Gubarev Y.A., Koifman O.I.* // J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. 2017. V. 88. P. 191–198. https://doi.org/10.1007/s10847-017-0718-4
87. *Lebedeva N.S., Yurina E.S., Gubarev Y.A., Syrbu S.A., Koifman O.I.* // J. Porphyrins Phthalocyanines. 2020. V. 25. P. 145–152. https://doi.org/10.1142/S1088424621500061

88. *Lebedeva N.S., Yurina E.S., Gubarev Y.A., Koifman O.I.* // J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. 2019. P. 1–8. https://doi.org/10.1007/s10847-019-00947-1
89. *Fry H.C., Garcia J.M., Medina M.J., Ricoy U.M., Gosztola D.J., Nikiforov M.P., Palmer L.C., Stupp S.I.* // J. Am. Chem. Soc. 2012. V. 134. P. 14646–14649. https://doi.org/10.1021/ja304674d
90. *Solomon L.A., Sykes M.E., Wu Y.A., Schaller R.D., Wiederrecht G.P., Fry H.C.* // ACS Nano. 2017. V. 11. P. 9112–9118. https://doi.org/10.1021/acsnano.7b03867
91. *Raszewski G., Saenger W., Renger T.* // Biophys. J. 2005. V. 88. P. 986–998. https://doi.org/10.1529/biophysj.104.050294
92. *Hu Y.-Z., Tsukiji S., Shinkai S., Oishi S., Hamachi I.* // J. Am. Chem. Soc. 2000. V. 122. P. 241–253. https://doi.org/10.1021/ja991406i
93. *Anderson J.R., Armstrong C.T., Kodali G., Lichtenstein B.R., Watkins D.W., Mancini J.A., Boyle A.L., Farid T.A., Crump M.P., Moser C.C.* // Chemical Science. 2014. V. 5. P. 507–514. https://doi.org/10.1039/C3SC52019F
94. *Cohen-Ofri I., van Gastel M., Grzyb J., Brandis A., Pinkas I., Lubitz W., Noy D.* // J. Am. Chem. Soc. 2011. V. 133. P. 9526–9535. https://doi.org/10.1021/ja202054m
95. *Kodali G., Mancini J.A., Solomon L.A., Episova T.V., Roach N., Hobbs C.J., Wagner P., Mass O.A., Aravindu K., Barnsley J.E.* // Chemical Science. 2017. V. 8. P. 316–324. https://doi.org/10.1039/C6SC02417C
96. *Woller J.G., Hannestad J.K., Albinsson B.* // J. Am. Chem. Soc. 2013. V. 135. P. 2759–2768. https://doi.org/10.1021/ja311828v
97. *Lebedeva N.S., Yurina E.S., Gubarev Y.A., Syrbu S.A.* // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2018. V. 199. P. 235–241. https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.03.066
98. *Vilona D., Di Lorenzo R., Carraro M., Licini G., Trainotti L., Bonchio M.* // Journal of Materials Chemistry B. 2015. V. 3. P. 6718–6730. https://doi.org/10.1039/C5TB00924C
99. *Aljabri M.D., Jadhav R.W., Al Kobaisi M., Jones L.A., Bhosale S.V., Bhosale S.V.* // ACS Omega. 2019. V. 4. P. 11408–11413. https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00909
100. *Endo M., Fujitsuka M., Majima T.* // Chem. Eur. J. 2007. V. 13. P. 8660–8666. https://doi.org/10.1002/chem.200700895
101. *Nam Y.S., Shin T., Park H., Magyar A.P., Choi K., Fantner G., Nelson K.A., Belcher A.M.* // J. Am. Chem. Soc. 2010. V. 132. P. 1462–1463. https://doi.org/10.1021/ja908812b
102. *Hou Y.-N., Ding W.-L., Jiang S.-P., Miao D., Tan Z.-Z., Hu J.-L., Scheer H., Zhao K.-H.* // Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res. 2019. V. 1866. P. 277–284. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.11.008
103. *Uhlenheuer D.A., Petkau K., Brunsveld L.* // Chem. Soc. Rev. 2010. V. 39. P. 2817–2826. https://doi.org/10.1039/B820283B
104. *De Annunzio S.R., Costa N.C.S., Mezzina R.D., Graminha M.A., Fontana C.R.* // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 3861. https://doi.org/10.3390/ijms20163861
105. *Abrahamse H., Hamblin M.R.* // Biochem. J. 2016. V. 473. P. 347–364. https://doi.org/10.1042/BJ20150942
106. *Scherer K.M., Bisby R.H., Botchway S.W., Parker A.W.* // Anti-Cancer Agents Med. Chem. 2017. V. 17. P. 171–189. https://doi.org/10.2174/1871520616666160513131723
107. *Ormond A.B., Freeman H.S.* // Materials. 2013. V. 6. P. 817–840. https://doi.org/10.3390/ma6030817
108. *de Oliveira K.T., Momo P.B., de Assis F.F., Ferreira M.A.B., Brocksom T.J.* // Current Organic Synthesis. 2014. V. 11. P. 42–58. https://doi.org/10.2174/15701794113106660085
109. *Zhang J., Jiang C., Longo J.P.F., Azevedo R.B., Zhang H., Muehlmann L.A.* // Acta Pharmaceutica Sinica B. 2018. V. 8. P. 137–146. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.09.003
110. *Chilakamarthi U., Giribabu L.* // The Chemical Record. 2017. V. 17. P. 775–802. https://doi.org/10.1002/tcr.201600121
111. *Tian J., Huang B., Nawaz M.H., Zhang W.* // Coord. Chem. Rev. 2020. V. 420. P. 213410. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213410
112. *Rak J., Pouckova P., Benes J., Vetvicka D.* // Anticancer Res. 2019. V. 39. P. 3323–3339. https://doi.org/10.21873/anticanres.13475
113. *Iqbal Z., Chen J., Chen Z., Huang M.* // Curr. Drug Metab. 2015. V. 16. P. 816–832. https://doi.org/10.2174/1389200217666151120165404
114. *Rizwan M., Rasheed T., Raza A., Bilal M., Yahya R., Yar M., Iqbal H.M.* // J. Drug Deliv. Sci. Technol. 2019. V. 51. P. 70–82. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.02.014
115. *Lebedeva N.S., Yurina E.S., Gubarev Y.A., Lyubimtsev A.V., Syrbu S.A.* // J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 2018. V. 353. P. 299–305. https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2017.11.037
116. *Hirakawa K.* // Photodynamic Therapy – from Basic Science to Clinical Research. IntechOpen, 2020. https://doi.org/10.5772/intechopen.77705
117. *Day R.A., Estabrook D.A., Logan J.K., Sletten E.M.* // Chem. Commun. 2017. V. 53. P. 13043–13046. https://doi.org/10.1039/C7CC07038A
118. *Hu D., Zhong L., Wang M., Li H., Qu Y., Liu Q., Han R., Yuan L., Shi K., Peng J.* // Adv. Funct. Mater. 2019. V. 29. P. 1806199. https://doi.org/10.1002/adfm.201806199
119. *Riess J.G.* // Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology. 2005. V. 33. P. 47–63. https://doi.org/10.1081/BIO-200046659
120. *Song X., Feng L., Liang C., Yang K., Liu Z.* // Nano Lett. 2016. V. 16. P. 6145–6153. https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b02365
121. *Zhao J., Fei J., Du C., Cui W., Ma H., Li J.* // Chem. Commun. 2013. V. 49. P. 10733–10735. https://doi.org/10.1039/C3CC46969G

122. *Chen H., Tian J., He W., Guo Z.* // J. Am. Chem. Soc. 2015. V. 137. P. 1539–1547. https://doi.org/10.1021/ja511420n
123. *Phua S.Z.F., Yang G., Lim W.Q., Verma A., Chen H., Thanabalu T., Zhao Y.* // ACS Nano. 2019. V. 13. P. 4742–4751. https://doi.org/10.1021/acsnano.9b01087
124. *Hamblin M.R.* // Expert Review of Anti-Infective Therapy. 2017. V. 15. P. 1059–1069. https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1397512
125. *Wen X., Zhang X., Szewczyk G., El-Hussein A., Huang Y.-Y., Sarna T., Hamblin M.R.* // Antimicrob. Agents Chemother. 2017. V. 61. P. e00467-17. https://doi.org/10.1128/AAC.00467-17
126. *Wang S., Yuan F., Chen K., Chen G., Tu K., Wang H., Wang L.-Q.* // Biomacromolecules. 2015. V. 16. P. 2693–2700. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00571
127. *Yu L., Wang Q., Wong R.C.-H., Zhao S., Ng D.K., Lo P.-C.* // Dyes and Pigments. 2019. V. 163. P. 197–203. https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.11.055
128. *Gomes A.T., Neves M.G., Cavaleiro J.A.* // Anais da Academia Brasileira de Ciências. 2018. V. 90. P. 993–1026. https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170811
129. *Srivatsan A., Ethirajan M., Pandey S.K., Dubey S., Zheng X., Liu T.-H., Shibata M., Missert J., Morgan J., Pandey R.K.* // Mol. Pharm. 2011. V. 8. P. 1186–1197. https://doi.org/10.1021/mp200018y
130. *Biscaglia F., Gobbo M.* // Peptide Science. 2018. V. 110. P. e24038. https://doi.org/10.1002/pep2.24038
131. *Schneider R., Tirand L., Frochot C., Vanderesse R., Thomas N., Gravier J., Guillemin F., Barberi-Heyob M.* // Anti-Cancer Agents Med. Chem. 2006. V. 6. P. 469–488. https://doi.org/10.2174/187152006778226503
132. *Biron E., Voyer N.* // Chem. Commun. 2005. P. 4652–4654. https://doi.org/10.1039/B508380J
133. *Urbanska K., Pawlicki M.* // J. Org. Chem. 2020. V. 85. P. 8196–8202. https://doi.org/10.1021/acs.joc.0c00335
134. *Pathak P., Yao W., Hook K.D., Vik R., Winnerdy F.R., Brown J.Q., Gibb B.C., Pursell Z.F., Phan A.T., Jayawickramarajah J.* // J. Am. Chem. Soc. 2019. V. 141. P. 12582–12591. https://doi.org/10.1021/jacs.9b03250
135. *Biron E., Voyer N.* // Org. Biomol. Chem. 2008. V. 6. P. 2507–2515. https://doi.org/10.1039/b803281e
136. *Bourre L., Giuntini F., Eggleston I.M., Wilson M., MacRobert A.J.* // Mol. Cancer Ther. 2008. V. 7. P. 1720–1729. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0092
137. *Sandland J., Boyle R.W.* // Bioconj. Chem. 2019. V. 30. P. 975–993. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00055
138. *Lin L., Xiong L., Wen Y., Lei S., Deng X., Liu Z., Chen W., Miao X.* // J. Biomed. Nanotechnol. 2015. V. 11. P. 531–554. https://doi.org/10.1166/jbn.2015.2090
139. *Fernandes S.R., Fernandes R., Sarmento B., Pereira P.M., Tomé J.P.* // Org. Biomol. Chem. 2019. V. 17. P. 2579–2593. https://doi.org/10.1039/C8OB02902D
140. *Hudson R., Carcenac M., Smith K., Madden L., Clarke O., Pelegrin A., Greenman J., Boyle R.* // Br. J. Cancer. 2005. V. 92. P. 1442–1449. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602517
141. *Shi Q., Tao Z., Yang H., Fan Q., Wei D., Wan L., Lu X.* // Drug Deliv. 2017. V. 24. P. 1818–1830. https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1407011
142. *Sato K., Watanabe R., Hanaoka H., Harada T., Nakajima T., Kim I., Paik C.H., Choyke P.L., Kobayashi H.* // Mol. Oncol. 2014. V. 8. P. 620–632. https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.01.006
143. *Sato K., Nagaya T., Choyke P.L., Kobayashi H.* // Theranostics. 2015. V. 5. P. 698. https://doi.org/10.7150/thno.11559
144. *Vrouenraets M.B., Visser G.W., Loup C., Meunier B., Stigter M., Oppelaar H., Stewart F.A., Snow G.B., van Dongen G.A.* // Int. J. Cancer. 2000. V. 88. P. 108–114. https://doi.org/10.1002/1097-0215(20001001)88:1<108::AID-IJC17>3.0.CO;2-H
145. *Xu P., Chen J., Chen Z., Zhou S., Hu P., Chen X., Huang M.* // PLoS One. 2012. V. 7. P. e37051. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037051
146. *Tesniere A., Panaretakis T., Kepp O., Apetoh L., Ghiringhelli F., Zitvogel L., Kroemer G.* // Cell Death & Differentiation. 2008. V. 15. P. 3–12. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402269
147. *Kepp O., Tesniere A., Schlemmer F., Michaud M., Senovilla L., Zitvogel L., Kroemer G.* // Apoptosis. 2009. V. 14. P. 364–375. https://doi.org/10.1007/s10495-008-0303-9
148. *Castano A.P., Mroz P., Wu M.X., Hamblin M.R.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. P. 5495–5500. https://doi.org/10.1073/pnas.0709256105
149. *Habermeyer B., Guilard R.* // Photochem. Photobiol. Sci. 2018. V. 17. P. 1675–1690. https://doi.org/10.1039/c8pp00222c
150. *Duan W., Smith K., Savoie H., Greenman J., Boyle R.W.* // Org. Biomol. Chem. 2005. V. 3. P. 2384–2386. https://doi.org/10.1039/B504334D
151. *Klotz L.-O., Kröncke K.-D., Sies H.* // Photochem. Photobiol. Sci. 2003. V. 2. P. 88–94. https://doi.org/10.1039/B210750C
152. *Liu M., Zhang Z., Cheetham J., Ren D., Zhou Z.S.* // Anal. Chem. 2014. V. 86. P. 4940–4948. https://doi.org/10.1021/ac500334k
153. *Giménez R.E., Vargová V., Rey V., Turbay M.B.E., Abatedaga I., Vieyra F.E.M., Zanini V.I.P., Ortiz J.H.M., Katz N.E., Ostatná V.* // Free Radical Biol. Med. 2016. V. 94. P. 99–109. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.014
154. *Gracanin M., Hawkins C.L., Pattison D.I., Davies M.J.* // Free Radical Biol. Med. 2009. V. 47. P. 92–102. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.04.015
155. *Silvester J.A., Timmins G.S., Davies M.J.* // Free Radical Biol. Med. 1998. V. 24. P. 754–766. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(97)00327-4

156. *Kollar J., Machacek M., Halaskova M., Lenco J., Kucera R., Demuth J., Rohlickova M., Hasonova K., Miletin M., Novakova V.* // J. Med. Chem. 2020. V. 63. P. 7616–7632. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00481

157. *Sannikova N.E., Timofeev I.O., Chubarov A.S., Lebedeva N.S., Semeikin A.S., Kirilyuk I.A., Tsentalovich Y.P., Fedin M.V., Bagryanskaya E.G., Krumkacheva O.A.* // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 2020. V. 211. P. 112008. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.112008

158. *Jiang B.-P., Hu L.-F., Shen X.-C., Ji S.-C., Shi Z., Liu C.-J., Zhang L., Liang H.* // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2014. V. 6. P. 18008–18017. https://doi.org/10.1021/am504860c

159. *Li S., Zou Q., Xing R., Govindaraju T., Fakhrullin R., Yan X.* // Theranostics. 2019. V. 9. P. 3249. https://doi.org/10.7150/thno.31814

160. *Lovell J.F., Jin C.S., Huynh E., Jin H., Kim C., Rubinstein J.L., Chan W.C., Cao W., Wang L.V., Zheng G.* // Nature Materials. 2011. V. 10. P. 324–332. https://doi.org/10.1038/nmat2986

161. *Zou Q., Abbas M., Zhao L., Li S., Shen G., Yan X.* // J. Am. Chem. Soc. 2017. V. 139. P. 1921–1927. https://doi.org/10.1021/jacs.6b11382

162. *Li X., Kim C.-Y., Lee S., Lee D., Chung H.-M., Kim G., Heo S.-H., Kim C., Hong K.-S., Yoon J.* // J. Am. Chem. Soc. 2017. V. 139. P. 10880–10886. https://doi.org/10.1021/jacs.7b05916

163. *Zhou Y., Liang X., Dai Z.* // Nanoscale. 2016. V. 8. P. 12394–12405. https://doi.org/10.1039/C5NR07849K

164. *Peng L., Liu S., Feng A., Yuan J.* // Mol. Pharm. 2017. V. 14. P. 2475–2486. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00160

165. *Mazzaglia A., Angelini N., Darcy R., Donohue R., Lombardo D., Micali N., Sciortino M.T., Villari V., Scolaro L.M.* // Chem. Eur. J. 2003. V. 9. P. 5762–5769. https://doi.org/10.1002/chem.200304861

166. *Sortino S., Mazzaglia A., Scolaro L.M., Merlo F.M., Valveri V., Sciortino M.T.* // Biomaterials. 2006. V. 27. P. 4256–4265. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.03.035

167. *Bryden F., Savoie H., Rosca E.V., Boyle R.W.* // Dalton Trans. 2015. V. 44. P. 4925–4932. https://doi.org/10.1039/C4DT02949F

168. *Eggleston I.M., Yaghini E., Dondi R., Tewari K., Edler K.J., Loizidou M., MacRobert A.J.* // ECS Meeting Abstracts, 2020. https://iopscience.iop.org/article/10.1149/MA2020-0112947mtgabs/meta

169. *Li S.-Y., Cheng H., Qiu W.-X., Liu L.-H., Chen S., Hu Y., Xie B.-R., Li B., Zhang X.-Z.* // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2015. V. 7. P. 28319–28329. https://doi.org/10.1021/acsami.5b08637

170. *Jiang T., Olson E.S., Nguyen Q.T., Roy M., Jennings P.A., Tsien R.Y.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 17867–17872. https://doi.org/10.1073/pnas.0408191101

171. *Peltek O.O., Muslimov A.R., Zyuzin M.V., Timin A.S.* // J. Nanobiotechnology. 2019. V. 17. P. 90. https://doi.org/10.1186/s12951-019-0524-9

172. *Tong H., Du J., Li H., Jin Q., Wang Y., Ji J.* // Chem. Commun. 2016. V. 52. P. 11935–11938. https://doi.org/10.1039/C6CC06439F

173. *Li S.Y., Qiu W.X., Cheng H., Gao F., Cao F.Y., Zhang X.Z.* // Adv. Funct. Mater. 2017. V. 27. P. 1604916. https://doi.org/10.1002/adfm.201604916

174. *Zhu K., Liu G., Hu J., Liu S.* // Biomacromolecules. 2017. V. 18. P. 2571–2582. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00693

175. *Xu X., Li Y., Liang Q., Song Z., Li F., He H., Wang J., Zhu L., Lin Z., Yin L.* // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2018. V. 10. P. 256–266. https://doi.org/10.1021/acsami.7b15896

176. *Han K., Lei Q., Wang S.B., Hu J.J., Qiu W.X., Zhu J.Y., Yin W.N., Luo X., Zhang X.Z.* // Adv. Funct. Mater. 2015. V. 25. P. 2961–2971. https://doi.org/10.1002/adfm.201500590

177. *Sharman W.M., van Lier J.E., Allen C.M.* // Adv. Drug Del. Rev. 2004. V. 56. P. 53–76. https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.015

178. *Ma J., Liu L., Che G., Yu N., Dai F., You Z.* // BMC Cancer. 2010. V. 10. P. 112. https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-112

179. *Hanahan D., Weinberg R.A.* // Cell. 2011. V. 144. P. 646–674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013

180. *Colegio O.R., Chu N.-Q., Szabo A.L., Chu T., Rhebergen A.M., Jairam V., Cyrus N., Brokowski C.E., Eisenbarth S.C., Phillips G.M.* // Nature. 2014. V. 513. P. 559–563. https://doi.org/10.1038/nature13490

181. *Kratz F.* // J. Controlled Release. 2008. V. 132. P. 171–183. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.05.010

182. *Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y., Hori K.* // J. Controlled Release. 2000. V. 65. P. 271–284. https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00248-5

183. *Li X., Jeong K., Lee Y., Guo T., Lee D., Park J., Kwon N., Na J.-H., Hong S.K., Cha S.-S.* // Theranostics. 2019. V. 9. P. 6412. https://doi.org/10.7150/thno.35210

184. *Lebedeva N., Popova T., Kozbial M., Wszelaka-Rylik M., Gubarev Y., Gierycz P.* // J. Porphyrins Phthalocyanines. 2011. V. 15. P. 223–229. https://doi.org/10.1142/S1088424611003185

185. *Lebedeva N.S., Yurina E.S., Gubarev Y.A., Koifman O.I.* // Mendeleev Commun. 2017. V. 27. P. 47–49. https://doi.org/10.1016/j.mencom.2017.01.014

186. *Sadeghi M., Ordway B., Rafiei I., Borad P., Fang B., Koomen J.L., Zhang C., Yoder S., Johnson J., Damaghi M.* // Front. Oncol. 2020. V. 10. P. 304. https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00304

187. *Pereira P.M., Carvalho J.J., Silva S., Cavaleiro J.A., Schneider R.J., Fernandes R., Tomé J.P.* // Org. Biomol. Chem. 2014. V. 12. P. 1804–1811. https://doi.org/10.1039/C3OB42082E

188. *Dai T., Huang Y.-Y., Hamblin M.R.* // Photodiagn. Photodyn. Ther. 2009. V. 6. P. 170–188. https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2009.10.008

189. *Hamblin M.R., Hasan T.* // Photochem. Photobiol. Sci. 2004. V. 3. P. 436–450. https://doi.org/10.1039/B311900A

190. *Huang L., Dai T., Hamblin M.R.* // In: Photodynamic Therapy. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol. 635 / Eds. Gomer C. Humana Press, Totowa, NJ, 2010. P. 155–173. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-697-9_12

191. *Carrera E., Dias H., Corbi S., Marcantonio R., Bernardi A., Bagnato V., Hamblin M., Rastelli A.N.S.* // Laser Physics. 2016. V. 26. P. 123001. https://doi.org/10.1088/1054-660X/26/12/123001

192. *Lebedeva N., Gubarev Y., Koifman M., Koifman O.* // Molecules. 2020. V. 25. P. 4368. https://doi.org/10.3390/molecules25194368

193. *Hally C., Delcanale P., Nonell S., Viappiani C., Abbruzzetti S.* // Transl. Biophotonics. 2020. V. 2. P. e201900031. https://doi.org/10.1002/tbio.201900031

194. *Hugenholtz P.* // Genome Biology. 2002. V. 3. P. reviews0003.1. https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-2-reviews0003

195. *Khan H.A., Ahmad A., Mehboob R.* // Asian Pac. J. Trop. Biomed. 2015. V. 5. P. 509–514. https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.001

196. *Liu Y., Qin R., Zaat S.A., Breukink E., Heger M.* // Transl. Res. 2015. V. 1. P. 140. https://doi.org/10.18053/jctres.201503.002

197. *Banfi S., Caruso E., Buccafurni L., Battini V., Zazzaron S., Barbieri P., Orlandi V.* // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 2006. V. 85. P. 28–38. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2006.04.003

198. *Tomé J.P., Neves M.G., Tomé A.C., Cavaleiro J.A., Soncin M., Magaraggia M., Ferro S., Jori G.* // J. Med. Chem. 2004. V. 47. P. 6649–6652. https://doi.org/10.1021/jm040802v

199. *Zhao Y., Ying J.-W., Sun Q., Ke M.-R., Zheng B.-Y., Huang J.-D.* // Dyes and Pigments. 2020. V. 172. P. 107834. https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107834

200. *Reinhardt A., Neundorf I.* // Int. J. Mol. Sci. 2016. V. 17. P. 701. https://doi.org/10.3390/ijms17050701

201. *Malik Z., Ladan H., Nitzan Y.* // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1992. V. 14. P. 262–266. https://doi.org/10.1016/1011-1344(92)85104-3

202. *Rovaldi C., Pievsky A., Sole N., Friden P., Rothstein D., Spacciapoli P.* // Antimicrob. Agents Chemother. 2000. V. 44. P. 3364–3367. https://doi.org/10.1128/AAC.44.12.3364-3367.2000

203. *Hamblin M.R., O'Donnell D.A., Murthy N., Rajagopalan K., Michaud N., Sherwood M.E., Hasan T.* // J. Antimicrob. Chemother. 2002. V. 49. P. 941–951. https://doi.org/10.1093/jac/dkf053

204. *Beyene B.B., Wassie G.A.* // BMC Chemistry. 2020. V. 14. P. 1–8. https://doi.org/10.1186/s13065-020-00701-6

205. *Alves E., Faustino M.A., Neves M.G., Cunha A., Tome J., Almeida A.* // Future Med. Chem. 2014. V. 6. P. 141–164. https://doi.org/10.4155/fmc.13.211

206. *Pereira M., Faustino M., Tomé J., Neves M., Tome A., Cavaleiro J., Cunha A., Almeida A.* // Photochem. Photobiol. Sci. 2014. V. 13. P. 680–690. https://doi.org/10.1039/c3pp50408e

207. *Laganowsky A., Reading E., Allison T.M., Ulmschneider M.B., Degiacomi M.T., Baldwin A.J., Robinson C.V.* // Nature. 2014. V. 510. P. 172–175. https://doi.org/10.1038/nature13419

208. *Dosselli R., Millioni R., Puricelli L., Tessari P., Arrigoni G., Franchin C., Segalla A., Teardo E., Reddi E.* // Journal of Proteomics. 2012. V. 77. P. 329–343. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.09.007

209. *Liu X., Chang Q., Ferrer-Espada R., Leanse L.G., Goh X.S., Wang X., Gelfand J.A., Dai T.* // Photochem. Photobiol. 2020. V. 96. P. 611–617. https://doi.org/10.1111/php.13241

210. *Gonçalves P.J., Bezzerra F.C., Teles A.V., Menezes L.B., Alves K.M., Alonso L., Alonso A., Andrade M.A., Borissevitch I.E., Souza G.R.* // J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 2020. V. 391. P. 112375. https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2020.112375

211. *Rossi G.G., Guterres K.B., da Silveira C.H., Moreira K.S., Burgo T.A.L., Iglesias B.A., de Campos M.M.A.* // Microb. Pathog. 2020. V. 148. P. 104455. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104455

212. *Guterres K.B., Rossi G.G., Moreira K.S., Burgo T.A.L., Iglesias B.A.* // BioMetals. 2020. V. 33. P. 269–282. https://doi.org/10.1007/s10534-020-00251-3

213. *Luo S., Zhang E., Su Y., Cheng T., Shi C.* // Biomaterials. 2011. V. 32. P. 7127–7138. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.06.024

214. *Lee D.-E., Koo H., Sun I.-C., Ryu J.H., Kim K., Kwon I.C.* // Chem. Soc. Rev. 2012. V. 41. P. 2656–2672. https://doi.org/10.1039/C2CS15261D

215. *Kondo M., Mitsui T., Ito S., Kondo Y., Ishigure S., Dewa T., Yamashita K., Nakamura J., Oura R., Nango M.* // J. Colloid Interface Sci. 2007. V. 310. P. 686–689. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.02.029

216. *Rahimi R., Tehrani A.A., Fard M.A., Sadegh B.M.M., Khavasi H.R.* // Catal. Commun. 2009. V. 11. P. 232–235. https://doi.org/10.1016/j.catcom.2009.09.022

217. *Teiten M.-H., Even P., Burgos P., Frochot C., Aubert S., Carré M.-C., Bolotine L., Merlin J.-L., Guillemin F., Viriot M.-L.* // Comptes Rendus Biologies. 2002. V. 325. P. 487–493. https://doi.org/10.1016/S1631-0691(02)01446-4

218. *Kee H.L., Nothdurft R., Muthiah C., Diers J.R., Fan D., Ptaszek M., Bocian D.F., Lindsey J.S., Culver J.P., Holten D.* // Photochem. Photobiol. 2008. V. 84. P. 1061–1072. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00409.x

219. *Kee H.L., Diers J.R., Ptaszek M., Muthiah C., Fan D., Lindsey J.S., Bocian D.F., Holten D.* // Photochem. Photobiol. 2009. V. 85. P. 909–920. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00532.x

220. *Lee S.J., Koo H., Jeong H., Huh M.S., Choi Y., Jeong S.Y., Byun Y., Choi K., Kim K., Kwon I.C.* // J. Controlled Release. 2011. V. 152. P. 21–29. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.03.027

221. *Otvagin V.F., Kuzmina N.S., Krylova L.V., Volovetsky A.B., Nyuchev A.V., Gavryushin A.E., Meshkov I.N., Gorbunova Y.G., Romanenko Y.V., Koifman O.I.* // J. Med. Chem. 2019. V. 62. P. 11182–11193. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01294

222. *Otvagin V.F., Nyuchev A.V., Kuzmina N.S., Grishin I.D., Gavryushin A.E., Romanenko Y.V., Koifman O.I., Belykh D.V., Peskova N.N., Shilyagina N.Y.* // Eur. J. Med. Chem. 2018. V. 144. P. 740–750. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.062

223. *Kuzmina N.S., Otvagin V.F., Krylova L.V., Nyuchev A.V., Romanenko Y.V., Koifman O.I., Balalaeva I.V., Fedorov A.Y.* // Mendeleev Commun. 2020. V. 30. P. 159–161. https://doi.org/10.1016/j.mencom.2020.03.009

224. *Machinskaya E.A., Ivanova-Radkevich V.I.* // Biomedical Photonics. 2013. V. 2. P. 28–32. https://www.pdt-journal.com/jour/article/view/24

225. *Соболев А., Розенкранц А., Гилязова Д.* // Биофизика. 2004. Т. 49. С. 351–379.

226. *Agadjanian H., Ma J., Rentsendorj A., Valluripalli V., Hwang J.Y., Mahammed A., Farkas D.L., Gray H.B., Gross Z., Medina-Kauwe L.K.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 6105–6110. https://doi.org/10.1073/pnas.0901531106

227. *Muhanna N., Cui L., Chan H., Burgess L., Jin C.S., MacDonald T.D., Huynh E., Wang F., Chen J., Irish J.C.* // Clin. Cancer. Res. 2016. V. 22. P. 961–970. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1235

228. *Chilakamarthi U., Kandhadi J., Gunda S., Thatipalli A.R., Jerald M.K., Lingamallu G., Reddy R.C., Chaudhuri A., Pande G.* // Exp. Cell Res. 2014. V. 327. P. 91–101. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.05.005

229. *Wang L.V., Hu S.* // Science. 2012. V. 335. P. 1458–1462. https://doi.org/10.1126/science.1216210

230. *Pu K., Shuhendler A.J., Jokerst J.V., Mei J., Gambhir S.S., Bao Z., Rao J.* // Nat. Nanotechnol. 2014. V. 9. P. 233–239. https://doi.org/10.1038/nnano.2013.302

231. *Merkes J.M., Zhu L., Bahukhandi S.B., Rueping M., Kiessling F., Banala S.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 3082. https://doi.org/10.3390/ijms21093082

232. *Hester S.C., Kuriakose M., Nguyen C.D., Mallidi S.* // Photochem. Photobiol. 2020. V. 96. P. 260–279. https://doi.org/10.1111/php.13217

233. *Liu Y., Bhattarai P., Dai Z., Chen X.* // Chem. Soc. Rev. 2019. V. 48. P. 2053–2108. https://doi.org/10.1039/C8CS00618K

234. *Wang S., Lin J., Wang T., Chen X., Huang P.* // Theranostics. 2016. V. 6. P. 2394. https://doi.org/10.7150/thno.16715

Supramolecular Systems Based on Macrocyclic Compounds with Proteins. Application Prospects

N. Sh. Lebedeva*, # and O. I. Koifman*, **

#Phone: +7 (493) 233-62-72; e-mail: nsl@isc-ras.ru

**Istitute of Chemistry of Solutions named after G.A. Krestov, Russian Academy of Sciences, ul. Academicheskaya 1, Ivanovo, 153045 Russia*

***Ivanovo State University of Chemical Technology, Sheremetevsky prosp. 7, Ivanovo, 153000 Russia*

Supramolecular complexes of proteins with macroheterocyclic compounds are unique structures that differ significantly from classical supramolecules in both complexity of organization and multifunctionality. The study of natural and the creation of synthetic supramolecular systems makes it possible to control biochemical processes, and also opens up new prospects for the practical use of macroheterocycle – protein supramolecules. The annually increasing interest in the study of supramolecular systems is due to their variability, a variety of initial components, the possibility of their chemical and biochemical modification, and the ability to participate in photo- and thermo-induced reactions. Macroheterocyclic components of supramolecular systems not only affect the affinity of the protein moiety for binding other ligands, but can impart new properties to supramolecules. The review analyzes and summarizes the results of theoretical and experimental studies of the driving forces of self-organization of molecules and the formation of supramolecular complexes. Particular attention is paid to studies of protein-macroheterocycle supramolecules, which have an applied orientation, for the creation of artificial photosystems, for use in biomedical purposes in photodynamic, photothermal therapy, for photoinactivation of bacteria, and medical diagnostics. Problems, difficulties in the development of each direction and potential ways of their solution are indicated.

Keywords: supramolecular systems, proteins, macroheterocycles, self-assembly

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2022, том 48, № 1, с. 32–52

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

УДК 547.56:615.012.1

ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ РЕСВЕРАТРОЛА – СИНТЕЗ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ. ЧАСТЬ 2. АНАЛОГИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ЗАМЕНОЙ ЭТИЛЕНОВОГО ФРАГМЕНТА НА ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИЙ

© 2022 г. А. В. Семенов*, #, Е. В. Семенова*, О. И. Балакирева*

**Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва, Россия, 430005 Саранск, ул. Большевистская, 68*

Поступила в редакцию 20.02.2021 г.
После доработки 11.03.2021 г.
Принята к публикации 16.03.2021 г.

В продолжение рассмотрения синтетических аналогов одного из наиболее изученных природных полифенолов – ресвератрола – вторая часть обзора посвящена структурам, полученным благодаря трансформации этиленового фрагмента, соединяющего бензольные кольца в остове природного прототипа. Основное внимание уделено методам синтеза и выявленным физиологическим эффектам структур, в которых кратная связь трансформирована в гетероциклический фрагмент. Модификация такого рода направлена на снижение конформационной подвижности молекулы и способствует жесткой фиксации структуры в той или иной активной конфигурации.

Ключевые слова: ресвератрол, гетероциклические аналоги, конформационные ограничения, антиоксиданты, противоопухолевая активность, противовоспалительная активность, активаторы хинонококсидоредуктазы 1, ингибиторы ароматазы

DOI: 10.31857/S0132342322010110

Введение.....32

Замена этиленового мостика в ресвератроле гетероциклическим фрагментом.....33

Аналоги транс-ресвератрола на основе 1,3-диарилзамещенных пятичленных гетероциклов.....33

Аналоги транс-ресвератрола на основе конденсированных гетероциклических систем.....38

Аналоги цис-ресвератрола на основе 1,2-диарилгетероциклических систем.....40

Заключение.....44

Список литературы.....51

ВВЕДЕНИЕ

Как отмечалось в первой части обзора [1], ресвератрол благодаря широкому спектру физиологических эффектов (антиоксидантных, антивозрастных, противовоспалительных, противораковых, антидиабетических, кардиозащитных и нейропротекторных), потенциально полезных при профилактике и лечении многих социально значимых заболеваний, стал одним из наиболее изученных природных полифенолов. Однако многообещающие результаты, полученные в исследованиях *in vitro* и в ряде доклинических испытаний на животных, в случае клинических исследований на людях не нашли однозначного подтверждения [2]. Отчасти это объясняется тремя

Сокращения: ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; MTT – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид; ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход; Akt – серин/треонин-протеинкиназа; DABCO – 1,4-диазабицикло[2.2.2]октан; dba – дибензилиденацетон; DCC – дициклогексилкарбодиимид; DMA – *N*,*N*-диметилацетамид; DMAP – 4-диметиламинопиридин; dppf – 1,1'-*бис*(дифенилфосфино)ферроцен; DPPH – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил; EC_{50} – полумаксимальная эффективная концентрация; EGF – эпидермальный фактор роста; E_{max} – максимальный сосудорасширяющий эффект; ER – рецептор эстрогена; ESP – электростатический молекулярный потенциал; GPx – глутатионпероксидазы; IC_{50} – полумаксимальная ингибирующая концентрация; IL-6 – интерлейкин 6; LiTMP – 2,2,6,6-тетраметилпиперидид лития; LPS – липополисахарид; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа; MOM – метоксиметил; NBS – *N*-бромсукцинимид; NF – ядерный фактор транскрипции; PARP – поли(ADP-рибоза)-полимераза; pIC_{50} – отрицательный десятичный логарифм величины IC_{50}; PS-DIEA – диизопропиламинометилполистирол; QR1 – хинонредуктаза 1; ROS (Reactive oxygen species) – активные формы кислорода; SRB – сульфат-восстанавливающие бактерии; TBAF – тетрабутиламмонийфторид; TMEDA – тетраметилэтилендиамин.

Автор для связи: (тел.: +7 (987) 691-05-38; эл. почта: salexan@mail.ru).

ключевыми факторами, негативно влияющими на биологическую активность ресвератрола: во-первых, имея $pK_a = 8.99$ и $\log P = 3.4$, он обладает высокой гидрофобностью (растворимость в воде ~30 мг/л); во-вторых, при пероральном введении ресвератрол подвергается быстрому метаболизму по II фазе, преимущественно формируя неактивные ресвератрол-3-*O*-глюкуронид, ресвератрол-4-*O*-глюкуронид и ресвератрол 3-*O*-сульфат [3]; в-третьих, молекула достаточно легко подвергается *цис-транс*-изомеризации [4], в том числе при действии солнечного света [5], и окислительной трансформации, которая происходит под воздействием повышенной температуры и других факторов окружающей среды [6]. Для решения этих проблем могут быть использованы два подхода: создание новых терапевтических систем (мицеллярные растворы, циклодекстрины, липосомы и т.д.) [3] или модификация структуры ресвератрола, при этом одна из стратегий – получение пролекарств, например, путем метилирования гидроксильных групп. Так, диметилированный аналог ресвератрола – птеростибен – не только обладает повышенной пероральной биодоступностью, но и способен преодолевать гематоэнцефалический барьер и модулировать функции центральной нервной системы [7, 8]. Другой вариант предполагает использование ресвератрола в качестве платформы для создания синтетических аналогов не только с целью преодоления вышеуказанных недостатков, но и увеличения фармакологической активности по отношению к прототипу.

Первая часть обзора [1] была посвящена направлению трансформации, связанному с заменой арильных фрагментов в нативной структуре гетероциклическими. Во второй части обсуждены модификации, связанные с алкеновым фрагментом, соединяющим бензольные кольца в остове ресвератрола. При этом мы сконцентрировали внимание лишь на замене этиленового мостика гетероциклическими фрагментами, не включив в рассмотрение иные варианты трансформации, в частности создание аза- и диазааналогов, достаточно полно обсужденное в обзоре Lizard et al. [9].

ЗАМЕНА ЭТИЛЕНОВОГО МОСТИКА В РЕСВЕРАТРОЛЕ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИМ ФРАГМЕНТОМ

Замена алкенового фрагмента на гетероциклические системы – одна из стратегий, используемых в создании аналогов ресвератрола. Основная идея такого подхода – блокирование характерной для ресвератрола возможности *цис-транс*-изомеризации, т.е. жесткая фиксация остова в той или иной активной конфигурации, а также устранение некоторых нежелательных путей его метаболической трансформации на основе окислительных превращений с участием двойной связи. Важный критерий выбора таких систем – возможность сохранения сопряжения между арильными фрагментами, наличие которого необходимо для обеспечения антиоксидантных свойств у получаемых производных.

Один из вариантов сохранения геометрии двух фенильных колец относительно неизменной и близкой к таковой для *транс*-стильбенового скелета – формирование структур, в которых фенильные кольца находятся в положениях 1 и 3 ароматических пятичленных гетероциклов (рис. 1). Другой вариант – арилированные производные конденсированных гетероциклических систем, таких как хинолин, бензофуран, бензотиазол и др. Для фиксации *цис*-ресвератрольной структуры подходят любые 1,2-диарилзамещенные гетероциклы.

Аналоги транс-ресвератрола на основе 1,3-диарилзамещенных пятичленных гетероциклов

В качестве пятичленных гетероциклических линкеров в литературе представлены имидазольные, триазольные, тиазольные и тиадиазольные

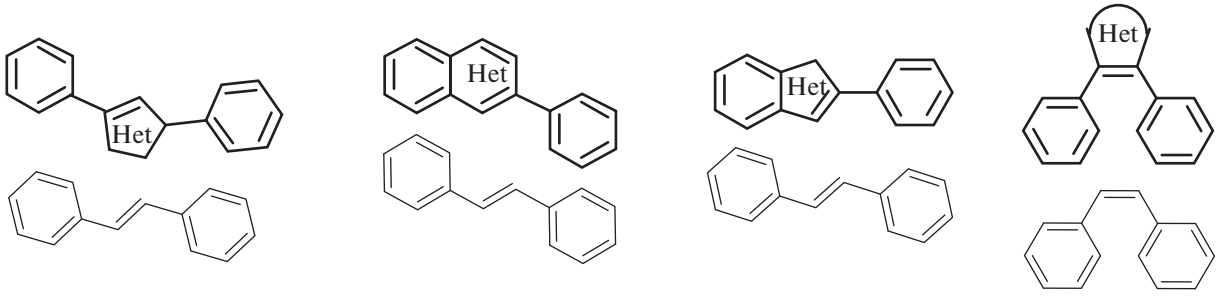
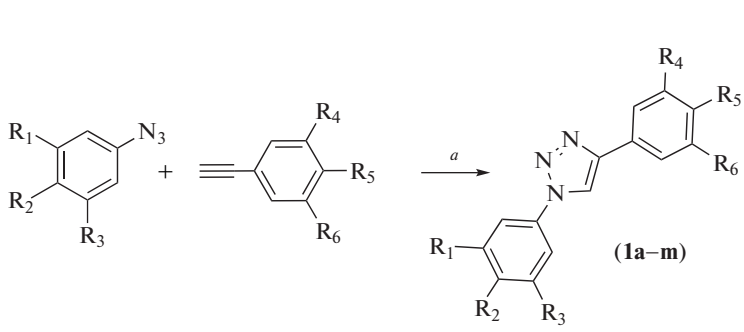


Рис. 1. Суперпозиция стильбенового фрагмента с геометрически подобными гетероциклическими остовами.

фрагменты, подходы к синтезу которых могут быть весьма разнообразными.

Один из простых и эффективных способов создания триазольных систем – катализируемая медью реакция [3+2]циклоприсоединения между алкинами и азидами. Этот процесс, относящийся к клик-реакциям, был использован для параллельного комбинаторного синтеза гетероциклических аналогов ресвератрола (**1a**–**m**) (схема 1) [10].



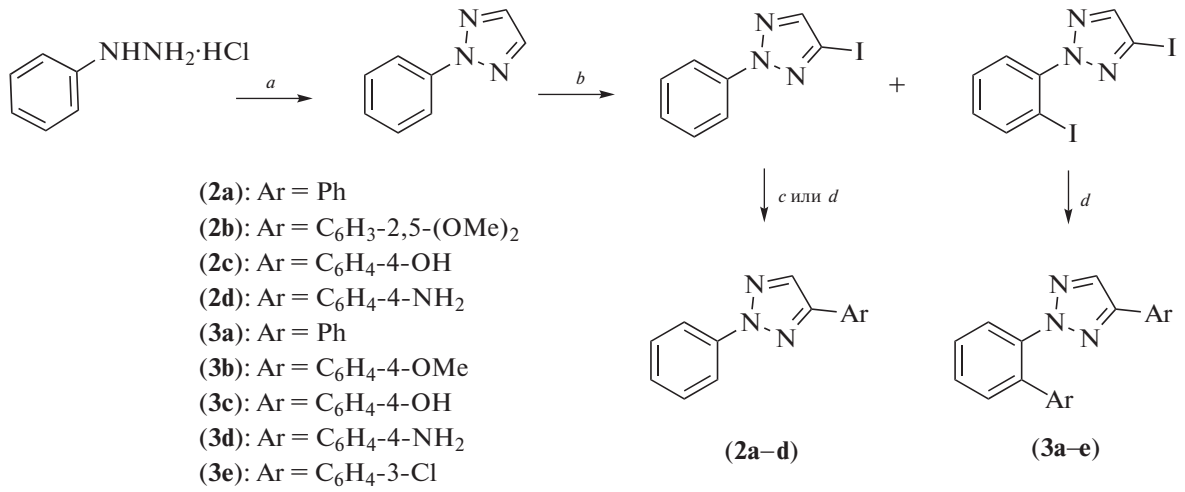
(**1a**–**m**)

(**1a**): $R_1 = R_3 = R_5 = OH$, $R_2 = R_4 = R_6 = H$
(**1b**): $R_1 = R_3 = R_5 = H$, $R_2 = R_4 = R_6 = OH$
(**1c**): $R_1 = R_3 = R_5 = OMe$, $R_2 = R_4 = R_6 = H$
(**1d**): $R_1 = R_3 = R_5 = H$, $R_2 = R_4 = R_6 = OMe$
(**1e**): $R_1 = R_3 = OH$, $R_2 = R_4 = R_6 = H$, $R_5 = OMe$
(**1f**): $R_1 = R_3 = R_6 = H$, $R_2 = OCF_3$, $R_5 = NH_2$
(**1g**): $R_1 = R_3 = R_6 = H$, $R_2 = NH_2$, $R_5 = OMe$
(**1h**): $R_1 = R_2 = R_5 = OMe$, $R_2 = R_6 = H$, $R_4 = OH$
(**1i**): $R_1 = R_3 = R_4 = R_6 = H$, $R_2 = OMe$, $R_5 = NH_2$
(**1j**): $R_1 = OH$, $R_2 = R_5 = OMe$, $R_3 = R_4 = R_6 = H$
(**1k**): $R_1 = R_3 = R_6 = H$, $R_2 = OPh$, $R_5 = OMe$
(**1l**): $R_1 = R_3 = R_6 = H$, $R_2 = R_4 = R_5 = OMe$
(**1m**): $R_1 = R_3 = R_4 = R_6 = H$, $R_2 = R_5 = OMe$

Схема 1. Синтез соединений (**1**). Реагенты и условия реакций: *a* – $CuSO_4$, аскорбат натрия, H_2O, *t*-BuOH.

Предварительный скрининг цитотоксического/антипролиферативного действия полученной библиотеки соединений на клеточных линиях нейробластомы (SH-SY5Y), рака молочной железы (MDA-MB-231), базофильного лейкоза (RBL 2H3) и карциномы поджелудочной железы человека (FG2) показал, что метоксилированные производные (**1c**–**e**) были более эффективны, чем ресвератрол.

Альтернативный подход к синтезу триазольных аналогов основан на введении предварительно полученных 4-иод-2-фенил-1,2,3-триазола и 4-иод-2-(2-иодфенил)-1,2,3-триазола в реакции сочетания Сузуки (схема 2) [11]. При оценке биологической активности полученные соединения показали многообещающий антипролиферативный эффект в отношении клеточной линии рака молочной железы (MDA-MB-231). При этом диарильные производные (**3**) в целом обладали более высокой активностью по сравнению с моноарильными соединениями (**2**). Максимальный эффект наблюдался для производного (**3d**), у которого значение $IC_{50} = 17.5 \pm 0.7$ мкМ оказалось в 7.5 раз меньше, чем у ресвератрола.



(**2a**): Ar = Ph
(**2b**): Ar = C_6H_3-2,5-$(OMe)_2$
(**2c**): Ar = C_6H_4-4-OH
(**2d**): Ar = C_6H_4-4-NH_2
(**3a**): Ar = Ph
(**3b**): Ar = C_6H_4-4-OMe
(**3c**): Ar = C_6H_4-4-OH
(**3d**): Ar = C_6H_4-4-NH_2
(**3e**): Ar = C_6H_4-3-Cl

(**2a**–**d**) (**3a**–**e**)

Схема 2. Синтез соединений (**2**) и (**3**). Реагенты и условия реакций: *a* – NaOH, $(CHO)_2$, $Cu(OTf)_2$, t; *b* – 1. $ZnCl_2$·TMEDA, LiTMP, THF, комн. темп., 2 ч; 2. I_2, комн. темп., 2 ч; *c* – $ArB(OH)_2$, $Pd(dba)_2$, PPh_3, CsF, диоксан, кипячение; *d* – $ArB(OH)_2$, $PdCl_2$, PPh_3, Na_2CO_3, H_2O, EtOH, DME, кипячение.

Альтернатива триазольному фрагменту – 1,4-, 2,4- и 2,5-диарилимидазолы, в которых две арильные группы связаны с гетероциклическим ядром в положениях 1,3. Одним из вариантов синтеза таких производных стало последовательное арилирование простых, коммерчески доступных предшественников имидазола в условиях палладий-катализируемых реакций кросс-сочетания (схема 3) [12, 13]. Противоопухолевая активность полученной библиотеки аналогов была оценена *in vitro* на панели линий опухолевых клеток человека NCI-60. По результатам скрининга максимальную активность по отношению ко всем исследованным опухолевым линиям продемонстрировал аналог (**4f**), оказавшийся более эффективным, чем его природный прототип. Примечательно, что его региоизомер (**4e**) не показал столь же высокой эффективности.

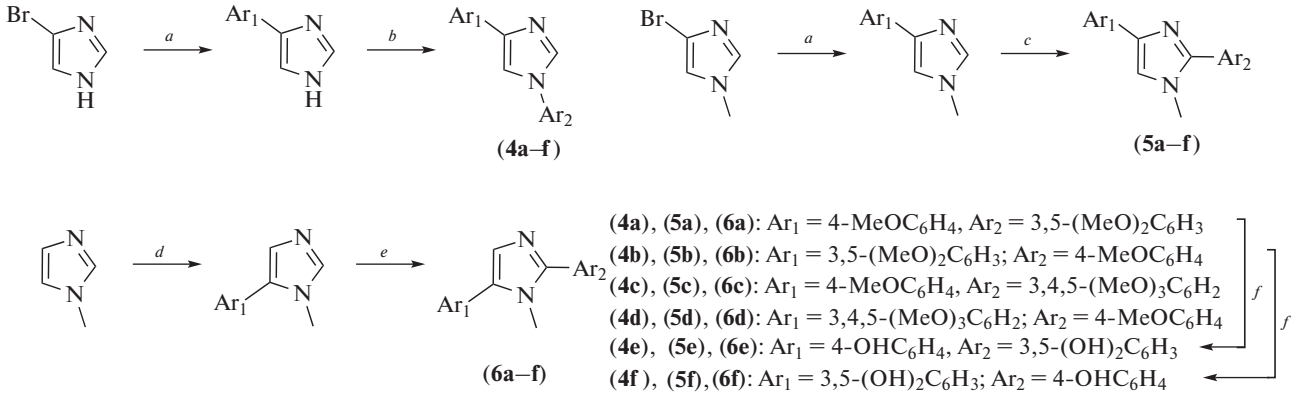
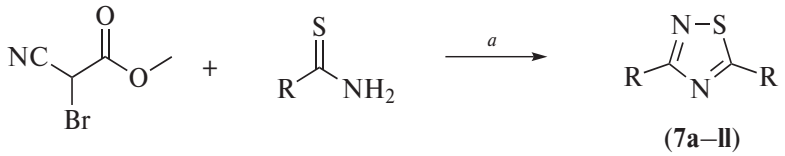


Схема 3. Синтез соединений (**4**–**6**). Реагенты и условия реакций: *a* – $Ar_1B(OH)_2$, $PdCl_2$(dppf), $BnEt_3NCl$, CsF, толуол, H_2O, 110°C; *b* – Ar_2Br, $(CuOTf)_2$·PhMe, 1,10-фенантролин, dba, Cs_2CO_3, ксилол, 110°C; *c* – Ar_2Br, $Pd(OAc)_2$, CuI, DMA, 160°C; *d* – Ar_1Br, $Pd(OAc)_2$, *n*-Bu_4NOAc, DMA, 110°C; *e* – Ar_2Br, CuI, 110°C; *f* – BBr_3, CH_2Cl_2, –60°C, MeOH.

Далее в более детальном скрининговом исследовании [13] было показано, что синтетические аналоги (**4**) и (**6**) проявляют более выраженные антипролиферативные свойства по сравнению с ресвератролом в отношении клеточной линии рака яичников. Было обнаружено, что они также значительно ингибируют передачу сигналов Akt и MAPK и уменьшают миграцию клеток, индуцированную IL-6 и EGF. Наконец, на раковых клетках, полученных из асцитической жидкости, было показано, что исследуемые соединения способны снижать экспрессию маркеров эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). В качестве лучшего кандидата для дальнейших испытаний позиционируется производное (**4a**).

Ряд работ посвящен замене этиленового мостика в остове ресвератрола на 1,3-тиазольный или 1,2,4-тиадиазольный гетероцикл с целью создания потенциальных химиопрофилактических агентов – ингибиторов ароматазы и NF-κB, а также индукторов хинонредуктазы 1 (QR1). Ароматаза – известная мишень для химиопрофилактики рака молочной железы, а хинонредуктаза 1 (QR1) относится к классу так называемых цитопротективных ферментов. Она проявляет свою противоопухолевую активность в основном за счет ингибирования продукции внутриклеточных семихиноновых радикалов и образования α-токоферолгидрохинона, который действует как ловушка свободных радикалов.

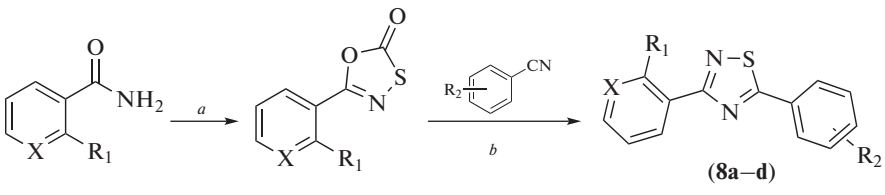
Для получения симметричных 1,2,4-тиадиазольных аналогов ресвератрола предложено использовать реакцию метилбромцианоацетата с широким набором тиоамидов в абсолютном метаноле при комнатной температуре (схема 4) [14]. Было установлено, что по сравнению с ресвератролом пиридин-содержащие аналоги (**7b**) и (**7c**) обладают в 30–125 раз более высокой ингибирующей активностью в отношении ароматазы (IC_{50} = = 0.2 и 0.8 мкМ соответственно) и большей селективностью. *Орто*-галогензамещенные производные (**7h**), (**7j**) и (**7o**) проявили свойства высокоселективных индукторов QR1, а *мета*-метильное и метоксильное производные (**7s**) и (**7ii**) показали активность по отношению к NF-κB – несколько большую, чем *транс*-ресвератрол.



(**7a**): R = Ph
(**7b**): R = 3-Py
(**7c**): R = 4-Py
(**7d**): R = 4-ClC_6H_4
(**7e**): R = 4-FC_6H_4
(**7f**): R = 4-BrC_6H_4
(**7g**): R = 4-$CH_3C_6H_4$
(**7h**): R = 2-BrC_6H_4
(**7i**): R = 4-$CF_3C_6H_4$
(**7j**): R = 2-ClC_6H_4
(**7k**): R = 4-*t*-BuC_6H_4
(**7l**): R = 4-IC_6H_4
(**7m**): R = 3-IC_6H_4
(**7n**): R = 3-FC_6H_4
(**7o**): R = 2-FC_6H_4
(**7p**): R = 3-BrC_6H_4
(**7q**): R = 2,3-$Cl_2C_6H_3$
(**7r**): R = 4-Cl-*o*-Tol
(**7s**): R = 3-$CH_3C_6H_4$
(**7t**): R = 2-$CF_3C_6H_4$
(**7u**): R = 2,5-$Cl_2C_6H_3$
(**7v**): R = 3,4-$Cl_2C_6H_3$
(**7w**): R = 3-Cl-*o*-Tol
(**7x**): R = 2-нафтил
(**7y**): R = 4-*n*-BuC_6H_4
(**7z**): R = 5-Cl-*o*-Tol
(**7aa**): R = 4-Br-*o*-Tol
(**7bb**): R = 2-IC_6H_4
(**7cc**): R = 2-Br-*p*-Tol
(**7dd**): R = 2,4-$Cl_2C_6H_3$
(**7ee**): R = 4-$NO_2C_6H_4$
(**7ff**): R = 4-$NH_2C_6H_4$ (*b*)
(**7gg**): R = 4-NCC_6H_4
(**7hh**): R = 3-NCC_6H_4
(**7ii**): R = 3-$MeOC_6H_4$
(**7jj**): R = 3-HOC_6H_4 (*c*)
(**7kk**): R = 4-$MeOC_6H_4$
(**7ll**): R = 4-HOC_6H_4 (*c*)

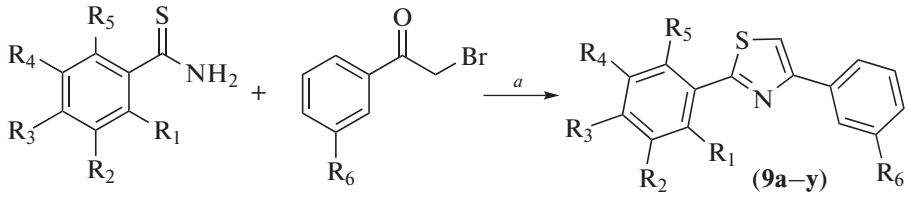
Схема 4. Синтез соединений (**7**). Реагенты и условия реакций: *a* – метанол, 23°C, 1 мин; *b* – H_2/Pd, метанол, 23°C, 24 ч; *c* – HBr, ледяная уксусная кислота, кипячение 8 ч.

В отличие от эквивалентно замещенных производных, синтез несимметричных 1,2,4-тиадиазолов – более сложная задача. В исследованиях [15, 16] с этой целью был использован двухстадийный процесс, включающий взаимодействие бензамидов с (хлоркарбонил)сульфенилхлоридом с последующим нагреванием промежуточных продуктов с бензонитрилами в декалине (схема 5). Авторы отмечают несовершенство данной схемы, выражающееся в низких выходах и сложности очистки целевых продуктов. По этой причине и с учетом того, что тиадиазольный атом азота в положении 2, по-видимому, не играет никакой роли во взаимодействии с фрагментами активного сайта связывания биомишеней, более перспективными представляются аналоги с 2,4-диарил-1,3-тиазоловым скелетом. Для их получения предлагается использовать реакцию арилтиоамидов с α-бромацетофенонами в сухом ДМФА [15–17] (схема 6).

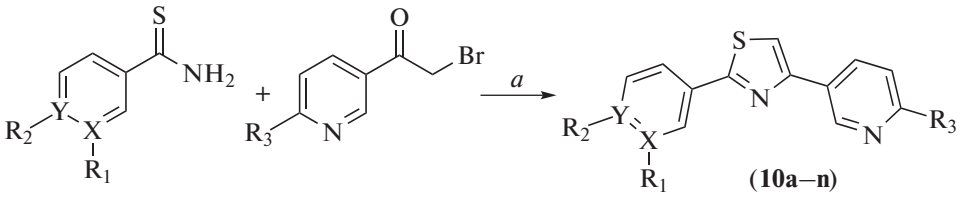


(**8a**): X = C; R_1 = H; R_2 = 2-F
(**8b**): X = C; R_1 = F; R_2 = H
(**8c**): X = N; R_1 = H; R_2 = 3-Br
(**8d**): X = N; R_1 = H; R_2 = 3-OMe

Схема 5. Синтез соединений (**8**). Реагенты и условия реакций: *a* – (хлорокарбонил)сульфенилхлорид, толуол, кипячение, 24 ч; *b* – декалин, 200°C, 20 мин.



(**9a**): $R_1 = CF_4$; $R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = H$
(**9b**): $R_1 = R_2 = F$; $R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = H$
(**9c**): $R_1 = R_2 = Cl$; $R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = H$
(**9d**): $R_2 = Br$; $R_1 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = H$
(**9e**): $R_2 = OMe$; $R_1 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = H$
(**9f**): $R_1 = CH_3$; $R_2 = Cl$; $R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = H$
(**9g**): $R_2 = R_5 = Cl$; $R_1 = R_3 = R_4 = R_6 = H$
(**9h**): $R_1 = R_4 = Cl$; $R_2 = R_3 = R_5 = R_6 = H$
(**9i**): $R_1 = R_5 = Cl$; $R_2 = R_3 = R_4 = R_6 = H$
(**9j**): $R_1 = CH_3$; $R_3 = Cl$; $R_2 = R_4 = R_5 = R_6 = H$
(**9k**): $R_1 = CH_3$; $R_3 = Br$; $R_2 = R_4 = R_5 = R_6 = H$
(**9l**): $R_1 = Br$; $R_3 = CH_3$; $R_2 = R_4 = R_5 = R_6 = H$
(**9m**): $R_3 = n$-Bu; $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = R_6 = H$
(**9n**): $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = H$; $R_6 = OMe$
(**9o**): $R_2 = R_6 = OMe$; $R_1 = R_3 = R_4 = R_5 = H$
(**9p**): $R_1 = CH_3$; $R_2 = Cl$; $R_3 = R_4 = R_5 = H$; $R_6 = OMe$
(**9q**): $R_1 = R_2 = Cl$; $R_3 = R_4 = R_5 = H$, $R_6 = OMe$
(**9r**): $R_1 = R_2 = F$; $R_3 = R_4 = R_5 = H$, $R_6 = OMe$
(**9s**): $R_1 = CH_3$; $R_3 = Br$; $R_2 = R_4 = R_5 = H$; $R_6 = OMe$
(**9t**): $R_1 = Br$; $R_3 = CH_3$; $R_2 = R_4 = R_5 = H$; $R_6 = OMe$
(**9u**): $R_1 = CH_3$; $R_4 = Cl$; $R_2 = R_3 = R_5 = H$; $R_6 = OMe$
(**9v**): $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = H$; $R_3 = n$-Bu; $R_6 = OMe$
(**9w**): $R_1 = R_3 = R_4 = R_5 = H$; $R_2 = Br$; $R_6 = OMe$
(**9x**): $R_1 = F$; $R_3 = R_4 = R_5 = H$; $R_2 = R_6 = OMe$
(**9y**): $R_1 = R_3 = R_4 = H$; $R_5 = F$; $R_2 = R_6 = OMe$



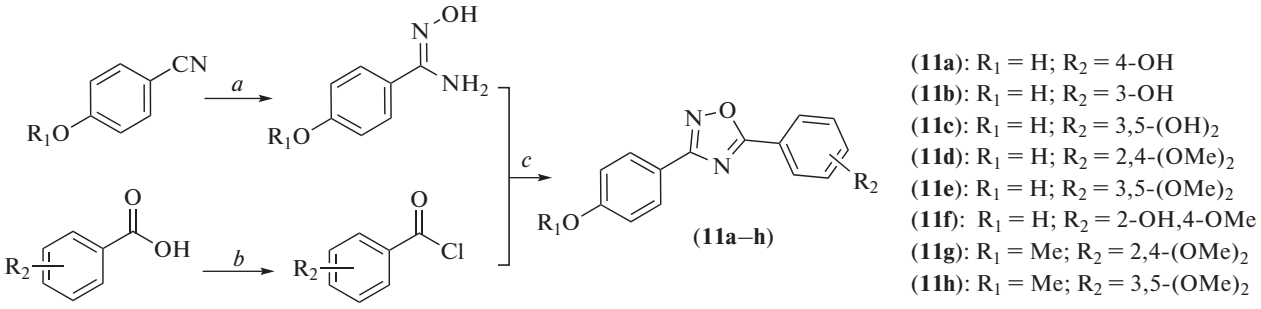
(**10a**): $R_1 = R_2 = R_3 = H$; X = Y = C
(**10b**): $R_1 = R_3 = H$; $R_2 = F$; X = Y = C
(**10c**): $R_1 = R_3 = H$; $R_2 = Cl$; X = Y = C
(**10d**): $R_1 = R_3 = H$; $R_2 = Br$; X = Y = C
(**10e**): $R_1 = R_3 = H$; $R_2 = OMe$; X = Y = C
(**10f**): $R_1 = R_3 = H$; $R_2 = OH$; X = Y = C
(**10g**): $R_1 = R_2 = R_3 = H$; X = C; Y = N
(**10h**): $R_1 = Cl$; $R_2 = R_3 = H$; X = C; Y = N
(**10i**): $R_1 = OMe$; $R_2 = R_3 = H$; X = C; Y = N
(**10j**): $R_1 = R_2 = H$; $R_3 = Br$; X = C; Y = N
(**10k**): $R_1 = R_2 = H$; $R_3 = OMe$; X = C; Y = N
(**10l**): $R_1 = R_2 = H$; $R_3 = OEt$; X = C; Y = N
(**10m**): $R_1 = R_2 = H$; $R_3 = Br$; X = N; Y = C
(**10n**): $R_1 = R_2 = H$; $R_3 = OMe$; X = N; Y = C

Схема 6. Синтез соединений (**9**) и (**10**). Реагенты и условия реакций: *a* – DMF, Cs_2CO_3, кипячение, 3–8 ч; *b* – 1. HBr, уксусная кислота, кипячение; 2. K_2CO_3, 24 ч; *c* – NaOMe, MeOH или EtOH, 120°C, 24 ч.

Используемая схема оказалась высокоэффективной и позволила синтезировать большую библиотеку производных. При их последующем скрининге были выявлены высокоэффективные индукторы QR1 – соединения (**9o**), (**9n**) и (**9e**) (CD = 0.087, 0.117 и 0.143 мкМ соответственно, для сравнения у ресвератрола CD = 21 мкМ). Кроме того, производное (**10g**) ингибировало активность ароматазы в наномолярном диапазоне концентраций (IC_{50} = 4 нМ) и в дополнение к этому обладало умеренным ингибирующим действием по отношению к NF-κB. Метоксипроизводное (**10i**) также оказалось высокоселективным ингибитором ароматазы, активным в наномолярном диапазоне (IC_{50} = 23 нМ).

Поиск эффективных антиоксидантов и ингибиторов NF-κB проводился также в ряду 1,2,4-оксадиазольных аналогов (схема 7) [18]. Некоторые соединения показали значительную ингибирующую активность в отношении продукции

NF-κB и/или ROS. Соединение (**11a**), включающее две *пара*-гидроксифенильные группы, связанные с 1,2,4-оксадиазольным кольцом, было наиболее активным. Его способность ингибировать NF-κB и снижать уровень ROS превосходила таковые у ресвератрола. Кроме того, авторами были установлены механизмы, лежащие в основе ингибирования активности NF-κB соединением (**11a**). Наконец, в отличие от ресвератрола, соединение (**11a**) значительно уменьшало вызванное липополисахаридом высвобождение провоспалительных цитокинов, что указывало на его выраженный противовоспалительный потенциал.



(**11a**): R_1 = H; R_2 = 4-OH
(**11b**): R_1 = H; R_2 = 3-OH
(**11c**): R_1 = H; R_2 = 3,5-$(OH)_2$
(**11d**): R_1 = H; R_2 = 2,4-$(OMe)_2$
(**11e**): R_1 = H; R_2 = 3,5-$(OMe)_2$
(**11f**): R_1 = H; R_2 = 2-OH,4-OMe
(**11g**): R_1 = Me; R_2 = 2,4-$(OMe)_2$
(**11h**): R_1 = Me; R_2 = 3,5-$(OMe)_2$

Схема 7. Синтез соединений (**11**). Реагенты и условия реакций: *a* – $NH_2OH{\cdot}HCl$, KOH, EtOH, кипячение 18 ч; *b* – $SOCl_2$, DMF, CH_2Cl_2, комн. темп., 1 ч; *c* – Py, кипячение 5 ч.

Аналоги транс-ресвератрола на основе конденсированных гетероциклических систем

Решения задачи жесткой фиксации *транс*-ресвератрольного скелета при сохранении максимального соответствия геометрических параметров природному прототипу можно достичь формированием конденсированных гетероциклических систем типа хинолина, бензофурана, бензотиазола и др. Пути синтеза ряда таких аналогов представлены на схеме 8 [19]. У полученных соединений оценивали антипролиферативный и сосудорасширяющий эффекты – два типичные свойства, проявляемые ресвератролом. Наиболее выраженный антипролиферативный эффект продемонстрировал хинолиновый аналог (**13c**) (IC_{50} = 17.4 мМ). По влиянию на сосуды наиболее высокие уровни активности (pIC_{50} = 4.92) и эффективности (E_{max} = = 88.2%) были выявлены у бензотиазола (**14e**). Конформационный анализ этих соединений показал, что антипролиферативная активность в отношении раковых клеток рака молочной железы человека (MDA-MB-231) может коррелировать с общим стерическим профилем наиболее активных соединений и, в частности, с пространственным расположением трех фенольных групп. Кроме того, сосудорасширяющие свойства показали хорошую корреляцию с электронными свойствами, оцененными на основе молекулярного электростатического потенциала (ESP).

У ряда производных 2-арилбензо[*b*]фурана, синтезированных по схеме 9, была изучена нейропротекторная и противовоспалительная активность *in vitro* и на экспериментальной модели у животных [20]. Проведенный анализ соотношения структура–активность показал, что нейропротекторное и противовоспалительное действие связано с присутствием акрилатной группы в 2-арилбензо[*b*]фуране. Согласно полученным результатам, в качестве хит-соединений для разработки средств профилактики и лечения болезни Альцгеймера были выбраны соединения (**16h**) и (**16i**), которые в этом исследовании продемонстрировали выраженную нейропротекторную и противовоспалительную активность в отношении нейроглии.

Tanini et al. [21] разработали эффективный способ прямого селенирования ресвератрола, позволивший синтезировать новый класс производных, имеющих не описанный ранее скелет 2-фенилбензоселенофена и обладающих потенциально более высокой антиоксидантной активностью. В дальнейшем этот подход был реализо-

ван и для ряда аналогов ресвератрола (схема 10) [22]. Квантово-химические расчеты энергии диссоциации связей O–H в полученных производных показали, что введение атома Se приводит к значительному ее уменьшению. В результате все бензоселенофеновые производные (**17**) и (**18**) оказались более эффективными, чем ресвератрол, в тестах DPPH, при этом активность соединения (**17a**) была сопоставима с активностью Тролокса – водорастворимого аналога витамина E. Соединения (**17a–c**) также оказались более эффективными ингибиторами, чем ресвератрол, в кинетических экспериментах автоокисления стирола. Для производных (**17a**) и (**18a–c**) была оценена GPx-подобная активность, которая была максимальной в случае соединения (**18b**). Соединения (**17a–c**) не проявляли цитотоксичности при концентрациях 5 мкМ на клеточных линиях кератиноцитов человека (HaCaT) и эпителиальных клетках кишечника (CaCo-2).

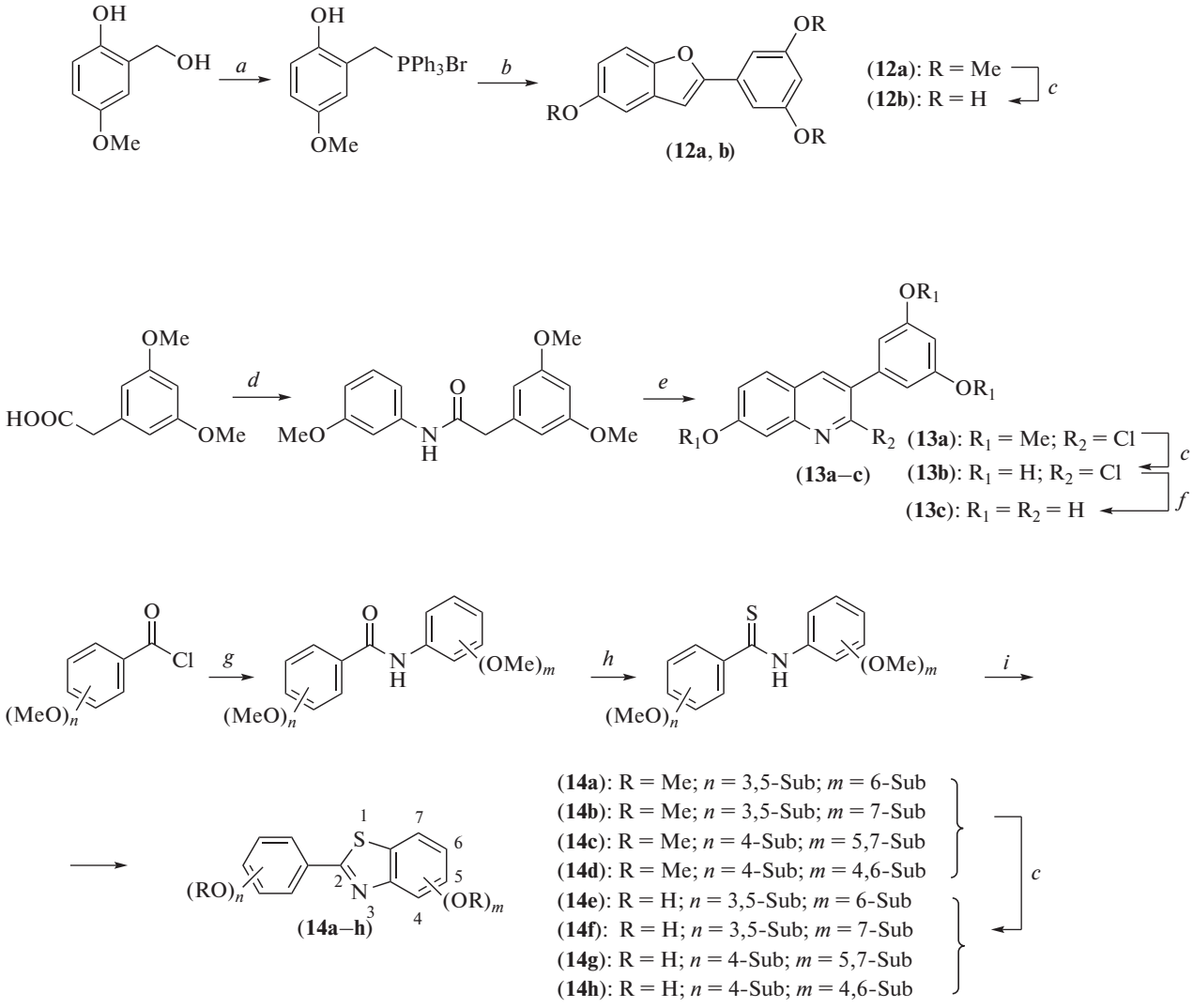
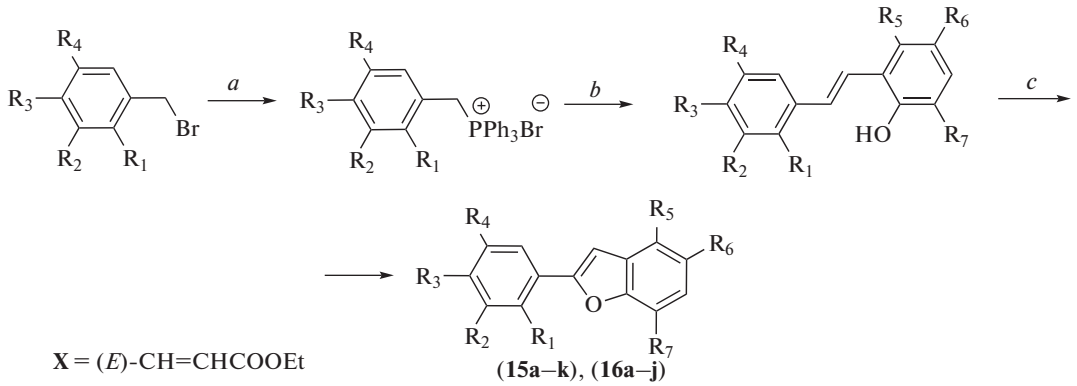


Схема 8. Синтез соединений (**12–14**). Реагенты и условия реакций: *a* – $PPh_3 \cdot HBr$, CH_3CN, кипячение, 1 ч; *b* – 1. 3,5-диметоксибензойная кислота, DCC, DMAP, CH_2Cl_2; 2. Et_3N, диоксин, кипячение; *c* – BBr_3, CH_2Cl_2, –78°C; *d* – 1. $SOCl_2$, CH_2Cl_2, 60°C, 4 ч; 2. *м*-анизидин, CH_2Cl_2, DMAP, PS-DIEA, комн. темп.; *e* – $POCl_3$, DMF, 75°C, 1.5 ч; *f* – H_2 (1 атм.), Pd–C, Et_3N, EtOH, 24 ч; *g* – соответствующий метоксианилин, CH_2Cl_2, DMAP, PS-DIEA, комн. темп.; *h* – реагент Лавессона, 130°C, 3 ч; *i* – 1. $K_3[Fe(CN)_6]$, NaOH 30%, EtOH, 85°C, 30 мин; 2. комн. темп.



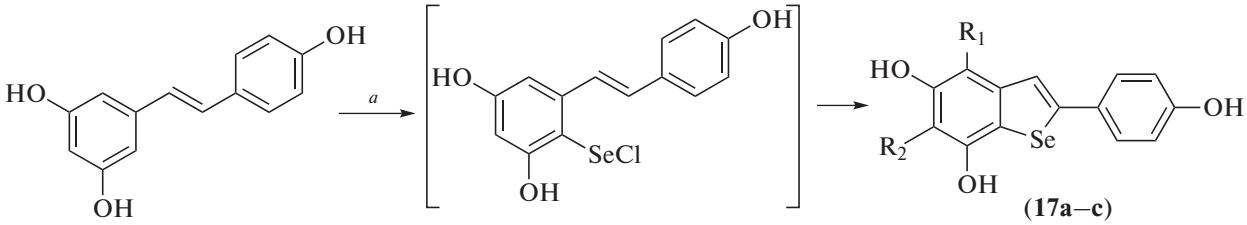
X = (*E*)-CH=CHCOOEt

(**15a**–**k**), (**16a**–**j**)

(**15a**): $R_1 = R_2 = R_5 = H$; $R_3 = R_4 = R_7 = OMe$; $R_6 = Br$
(**15b**): $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = H$; $R_3 = R_7 = OMe$; $R_6 = Br$
(**15c**): $R_1 = R_4 = R_6 = H$; $R_2 = R_3 = R_7 = OMe$; $R_5 = Br$
(**15d**): $R_1 = Br$; $R_2 = R_3 = R_4 = OMe$; $R_5 = R_6 = R_7 = H$
(**15e**): $R_1 = R_5 = H$; $R_2 = R_3 = R_4 = R_7 = OMe$; $R_6 = Br$
(**15f**): $R_1 = Br$; $R_2 = R_5 = R_6 = R_7 = H$; $R_3 = R_4 = OMe$
(**15g**): $R_1 = Br$; $R_2 = R_5 = R_6 = H$; $R_3 = R_4 = R_7 = OMe$
(**15h**): $R_1 = R_5 = H$; $R_2 = R_3 = R_4 = R_7 = OMe$; $R_6 = $ **X**
(**15i**): $R_1 =$ **X**; $R_2 = R_5 = R_6 = R_7 = H$; $R_3 = R_4 = OMe$
(**15j**): $R_1 =$ **X**; $R_2 = R_5 = R_6 = H$; $R_3 = R_4 = R_7 = OMe$
(**15k**): $R_1 = R_2 = R_6 = H$; $R_3 + R_4 = –OCH_2O–$; $R_5 = Br$; $R_7 = OMe$

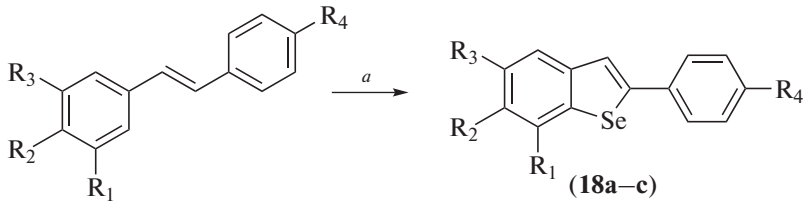
(**16a**): $R_1 = R_2 = R_5 = H$; $R_3 = R_4 = R_7 = OH$; $R_6 = Br$
(**16b**): $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = H$; $R_3 = R_7 = OH$; $R_6 = Br$
(**16c**): $R_1 = R_4 = R_6 = H$; $R_2 = R_3 = R_7 = OH$; $R_5 = Br$
(**16d**): $R_1 = Br$; $R_2 = R_3 = R_4 = OH$; $R_5 = R_6 = R_7 = H$
(**16e**): $R_1 = R_5 = H$; $R_2 = R_3 = R_4 = R_7 = OH$; $R_6 = Br$
(**16f**): $R_1 = Br$; $R_2 = R_5 = R_6 = R_7 = H$; $R_3 = R_4 = OH$
(**16g**): $R_1 = Br$; $R_2 = R_5 = R_6 = H$; $R_3 = R_4 = R_7 = OH$
(**16h**): $R_1 = R_5 = H$; $R_2 = R_3 = R_4 = R_7 = OH$; $R_6 = $ **X**
(**16i**): $R_1 =$ **X**; $R_2 = R_5 = R_6 = R_7 = H$; $R_3 = R_4 = OH$
(**16j**): $R_1 =$ **X**; $R_2 = R_5 = R_6 = H$; $R_3 = R_4 = R_7 = OH$

Схема 9. Синтез соединений (**15**) и (**16**). Реагенты и условия реакций: *a* – PPh_3, PhMe; *b* – соответствующие замещенные салициловые альдегиды, *t*-BuOLi, THF; *c* – I_2, K_2CO_3, THF; *d* – $Pd(OAc)_2$, этилакрилат, PPh_3, Et_3N, DMF; *e* – BBr_3, CH_2Cl_2.



(**17a**–**c**)

(**17a**): $R_1 = R_2 = H$
(**17b**): $R_1 = Cl$, $R_2 = H$
(**17c**): $R_1 = R_2 = Cl$



(**18a**–**c**)

(**18a**): $R_1 = OMe$; $R_2 = OH$; $R_3 = R_4 = H$
(**18b**): $R_1 = R_3 = OH$; $R_2 = R_4 = H$
(**18c**): $R_1 = R_3 = OMe$; $R_2 = R_4 = H$

Схема 10. Синтез соединений (**17**) и (**18**). Реагенты и условия реакций:
a – 1. Se, SO_2Cl_2, THF; 2. DMF, комн. темп.

Аналоги цис-ресвератрола на основе 1,2-диарилгетероциклических систем

Хотя в большинстве исследований показана большая активность *транс*-ресвератрола, изучение *цис*-изомера и его аналогов [23] представляет интерес, прежде всего, с целью поиска структур, проявляющих противоопухолевую активность по аналогии с обсуждавшимся в первой части обзора природным антимитотическим агентом – комбретастатином А-4. Исследования взаимосвязи структура–активность показали, что наличие 3,4,5-триметоксизамещенного кольца в молекуле комбретастатина А-4 и *цис*-конфигурация кратной связи имеют решающее значение для оптимальной цитотоксической активности, а изомеризация до биологически менее активной *транс*-формы представляет собой существенную проблему для применения ком-

бретастатинов в качестве лекарственных средств. Таким образом, во многих исследованиях по получению синтетических аналогов комбретастатина А-4 ключевой задачей стала фиксация метиленового мостика *цис*-типа между двумя фенильными кольцами. В частности, были получены аналоги комбретастатина А-4, в которых алкенильный фрагмент был заменен изоксазолиновым, изоксазольным или пиридиновым фрагментами (схемы 11 и 12) [24].

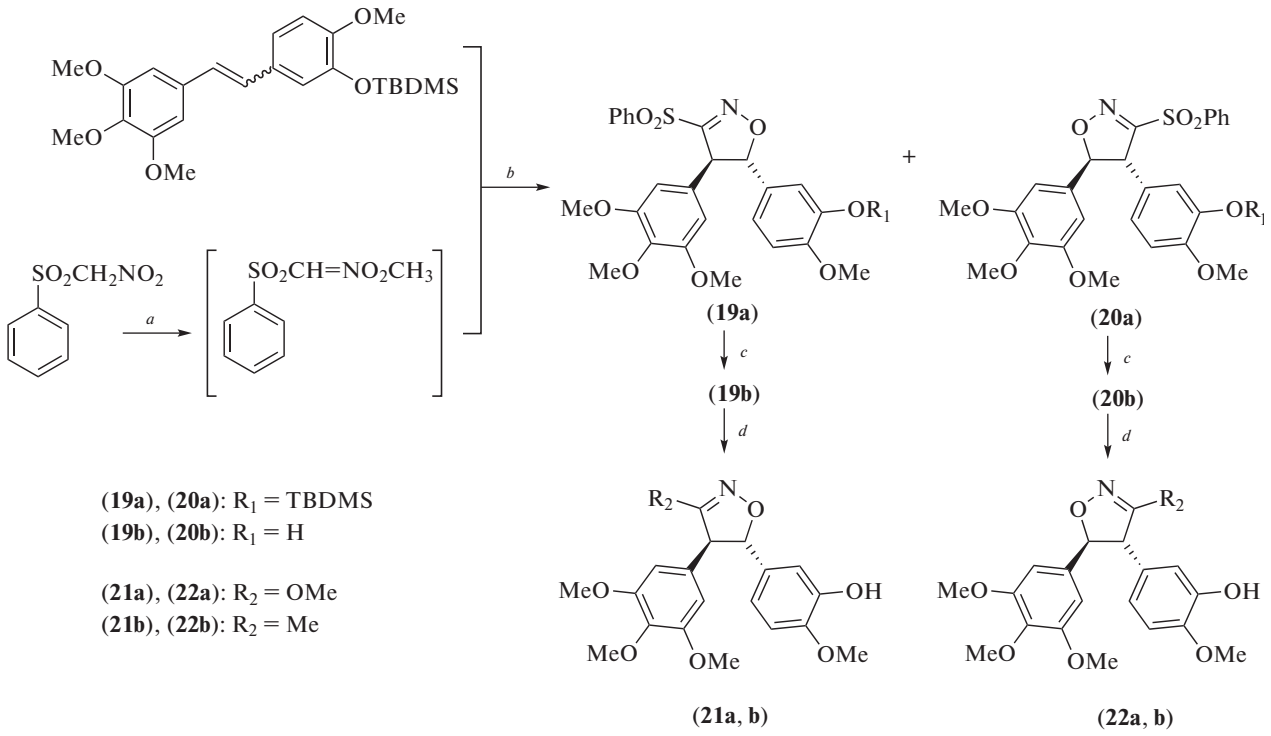


Схема 11. Синтез соединений (**19**–**22**). Реагенты и условия реакций: *a* – диазометан, Et_2O; *b* – CH_2Cl_2, *n*-TsOH, кипячение; *c* – TBAF, CH_2Cl_2; *d* – Na, CH_3OH или MeLi, THF.

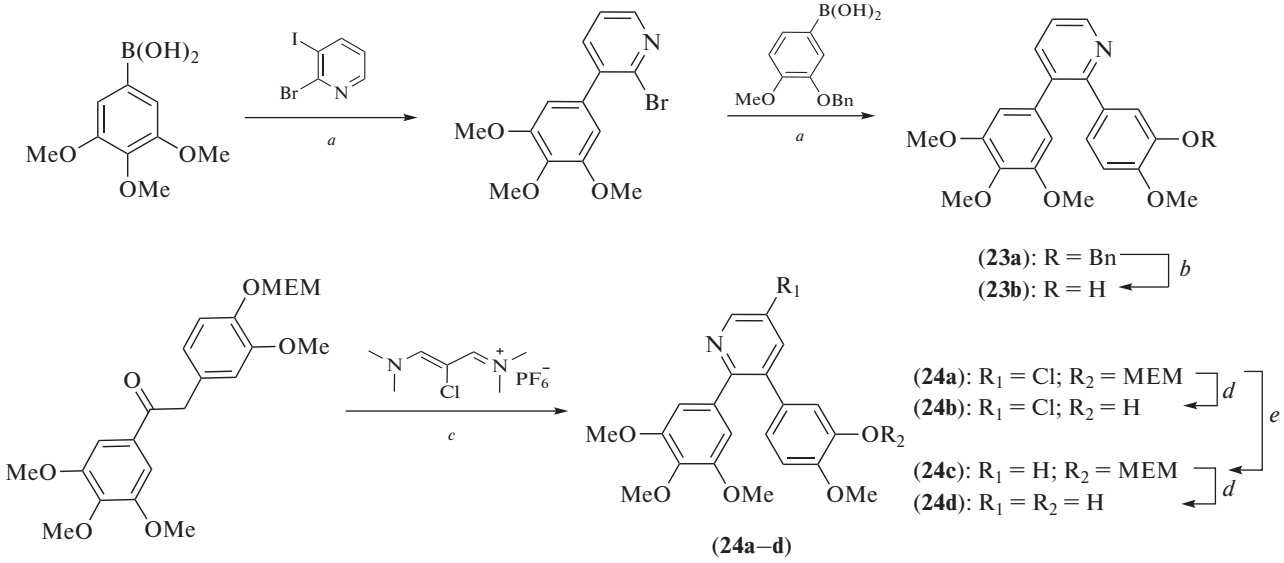


Схема 12. Синтез соединений (**23**) и (**24**). Реагенты и условия реакций: *a* – $Pd(Ph_3P)_4$, Na_2CO_3 (водн.), толуол/EtOH; *b* – H_2, Pd/C, EtOH; *c* – *t*-BuOK, DABCO, NH_4OAc, THF, 6 ч, кипячение; *d* – TFA, CH_2Cl_2, 5 ч, комн. темп.; *e* – H_2, 10% $Pd/CaCO_3$, 1 н. NaOH/EtOH 1 : 1, комн. темп.

У новых соединений оценивали способность оказывать влияние на сборку тубулина, а также цитотоксическую и проапоптотическую активность. Соединения (**19b**), (**21a**), (**22a**), (**24b**) и (**24d**) продемонстрировали благоприятный профиль цитотоксичности (IC_{50} < 1 мкМ) и значимую проапоптотическую активность, но слабый антитубулиновый эффект. При этом показавшие сильную проапоптотическую активность производные изоксазолина (**19b**), (**21a**) и (**22a**) оказались способными блокировать большинство клеток в фазе G2. Вероятно, помимо митотического веретена эти соединения способны воздействовать и на другие мишени, ответственные за активацию как внутренних, так и внешних апоптотических путей. Полученные данные однозначно свидетельствуют о том, что структурное изменение фрагмента стильбена комбретастатина А-4 может быть чрезвычайно эффективным для получения высокоактивных индукторов апоптоза.

В качестве *цис*-ограниченных аналогов комбретастатина А-4 по реакции кросс-сочетания (схема 13) был синтезирован ряд производных триазола (**25a**–**k**) и (**26a**–**r**) [25]. У полученных соединений оценивали антипролиферативные эффекты, ингибирующее действие на полимеризацию тубулина, влияние на фазы клеточного цикла и способность индуцировать апоптоз. Было установлено, что активность всех синтезированных соединений была выше или сопоставима с активностью комбретастатина А-4. Исследования с помощью проточной цитометрии показали, что обработка клеток рака шейки матки (HeLa) и Т-клеточной лейкемии (Jurkat) наиболее активными соединениями (**26l**) и (**26o**) вызывала остановку клеточного цикла в фазе G2/M, причем выраженность эффекта зависела от концентрации соединений. Это сопровождалось апоптозом клеток, деполяризацией митохондрий, генерацией ROS, активацией каспазы-3 и расщеплением PARP. Было также показано, что соединение (**26l**) обладает потенциальной антиваскулярной активностью, поскольку индуцирует изменение формы эндотелиальных клеток *in vitro* и нарушает прорастание эндотелиальных клеток по данным исследования на кольцах аорты цыпленка.

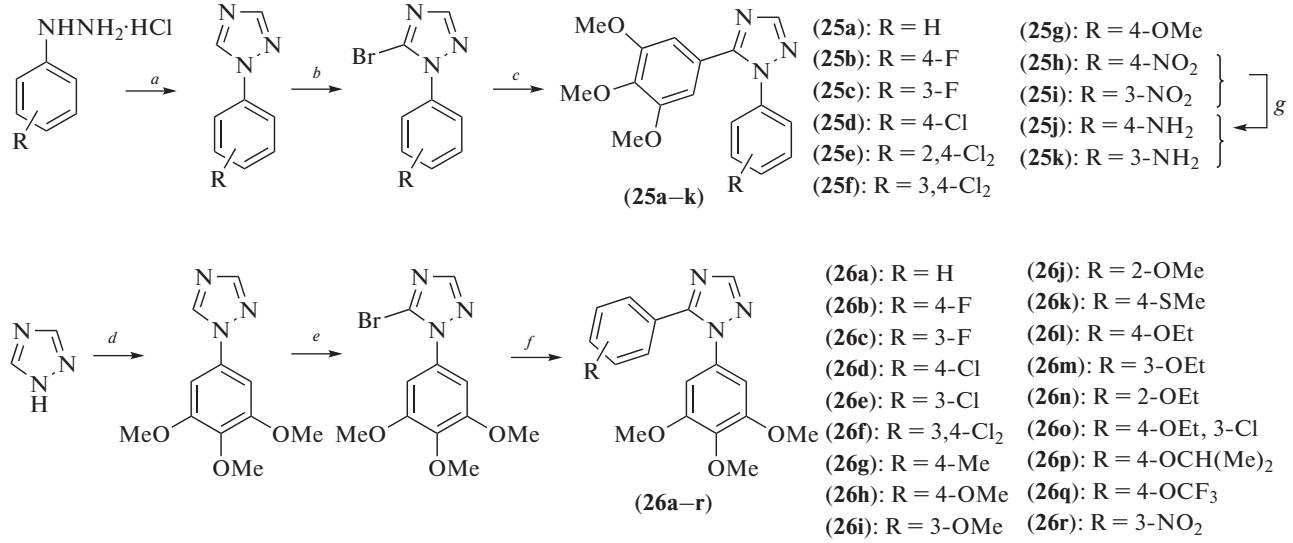
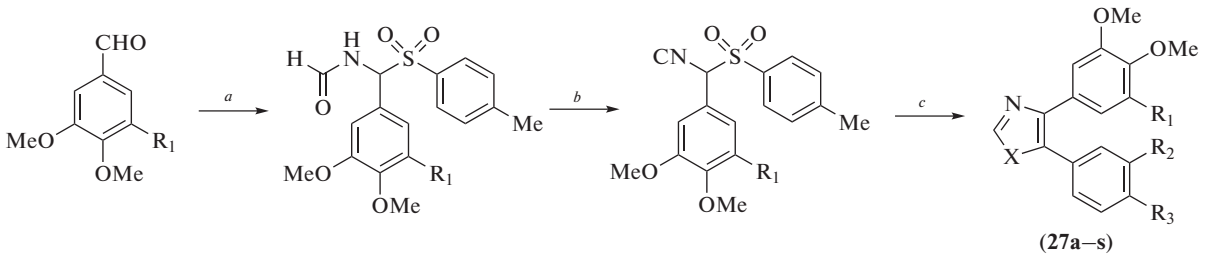


Схема 13. Синтез соединений (**25**) и (**26**). Реагенты и условия реакций: *a* – $HCONH_2$, 120°C, 18 ч; *b*, *e* – NBS, бензоилпероксид (кат.), CCl_4, кипячение; *c*, *f* – $Pd(PPh_3)_4$, K_2CO_3, PhMe, кипячение, 18 ч; *d* – 1-бром-3,4,5-триметоксибензол, $CsCO_3$, CuI, DMF, 120°C, 18 ч; *g* – H_2, 10% Pd/C, DMF.

Получены аналоги комбретастатина А-4, в которых *цис*-конфигурация бензольных колец была фиксирована заменой алкенильного линкера оксазольным или *N*-метилимидазольным фрагментами (схема 14) [26]. Полученные производные (**27**) были изучены на различных линиях раковых клеток и на опухолевых ксенотрансплантатах у мышей. Имидазолы (**27q**) и (**27r**), в отличие от комбретастатина А, были эффективны при наномолярных концентрациях в отношении резистентной клеточной линии рака толстого кишечника (HT-29), клеточной линии топокарциномы молочной железы с множественной лекарственной устойчивостью (MCF-7) и резистентной к цисплатину опухоли зародышевых клеток яичка (1411HP). Исследуемые вещества индуцировали апоптоз и ингибировали полимеризацию тубулина, хорошо переносились мышами в высоких дозах, вызывали обширные внутриопухолевые кровоизлияния и регрессию высоковаскуляризированных ксенотрансплантатов опухоли 1411HP.

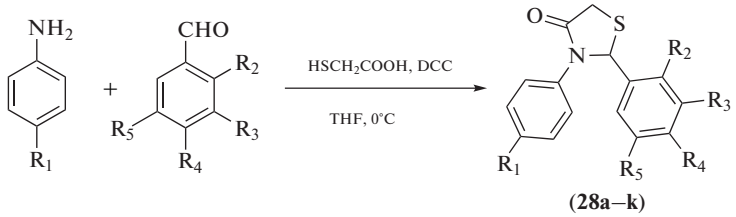


(**27a**): X = O; $R_1 = R_2 = NO_2$; R_3 = OMe
(**27b**): X = O; $R_1 = NO_2$; R_2 = H; $R_3 = NMe_2$
(**27c**): X = NMe; $R_1 = NO_2$; R_2 = OH; R_3 = OMe
(**27d**): X = NMe; $R_1 = NO_2$; R_2 = F; R_3 = OMe
(**27e**): X = NMe; $R_1 = NO_2$; R_2–R_3 = –C(Cl)=CHN(Me)–
(**27f**): X = NMe; R_1 = Cl; $R_2 = NO_2$; R_3 = OMe
(**27g**): X = NMe; R_1 = Br; $R_2 = NO_2$; R_3 = OMe
(**27h**): X = NMe; R_1 = Cl; R_2 = F; R_3 = OMe
(**27i**): X = NMe; R_1 = Br; R_2 = F; R_3 = OMe
(**27j**): X = NMe; R_1 = Cl; R_2 = H; $R_3 = NMe_2$
(**27k**): X = NMe; R_1 = Br; R_2 = H; $R_3 = NMe_2$

(**27l**): X = O; $R_1 = R_2 = NH_2$; R_3 = OMe
(**27m**): X = O; $R_1 = NH_2$; R_2 = H; $R_3 = NMe_2$
(**27n**): X = NMe; $R_1 = NH_2$; R_2 = OH; R_3 = OMe
(**27o**): X = NMe; $R_1 = NH_2$; R_2 = F; R_3 = OMe
(**27p**): X = NMe; $R_1 = NH_2$; R_2–R_3 = –C(Cl)=CHN(Me)–
(**27q**): X = NMe; R_1 = Cl; $R_2 = NH_2$; R_3 = OMe
(**27r**): X = NMe; R_1 = Br; $R_2 = NH_2$; R_3 = OMe
(**27s**): X = NMe; R_1 = OMe; $R_2 = NH_2$; R_3 = OMe

Схема 14. Синтез соединений (**27**). Реагенты и условия реакций: *a* – $HCONH_2$, CSA, *n*-толуолсульфиновая кислота, 16 ч, 60°C; *b* – $POCl_3$, Et_3N, DME, 3 ч, –5°C; *c* – ArCHO, K_2CO_3, DME/MeOH, 2 ч, кипячение (для X = O) или ArCHO, $MeNH_2$ (33% в EtOH), AcOH, EtOH, 2 ч, кипячение (для X = NMe); *d* – HCO_2NH_4, Pd/C (5%), MeOH, 2 ч, кипячение (для соединений (**27a**–**d**)) или Zn, HCl, THF, 10 мин, комн. темп. (для соединений (**27e**–**g**)).

Также была синтезирована библиотека соединений, где в качестве линкера, соединяющего бензольные фрагменты, выступал 2,3-тиазолидин-4-он (схема 15) [27]. Некоторые из этих соединений продемонстрировали более выраженное по сравнению с ресвератролом ингибирующее влияние на рост клеток рака молочной железы. Примечательно, что если соединения (**28g**) и (**28h**) проявили сильную противоопухолевую активность по отношению к ER-положительной клеточной линии MCF-7, то производные (**28j**) и (**28k**) обладали сильной цитостатической активностью к ER-отрицательной клеточной линии SkBr3, т.е. биологическое действие этих молекул может зависеть от различных паттернов эстрогеновых рецепторов.



(**28a**): $R_1 = R_4$ = OH; $R_2 = R_3 = R_5$ = H
(**28b**): $R_1 = R_3 = R_4$ = OH; $R_2 = R_5$ = H
(**28c**): $R_1 = R_3 = R_5$ = OH; $R_2 = R_4$ = H
(**28d**): $R_1 = R_2 = R_4$ = OH; $R_3 = R_5$ = H
(**28e**): R_1 = OH; $R_2 = R_4$ = OMe; $R_3 = R_5$ = H
(**28f**): R_1 = OH; $R_3 = R_4 = R_5$ = OMe; R_2 = H
(**28g**): R_1 = OH; $R_3 = R_4$ = OMe; $R_2 = R_5$ = H
(**28h**): R_1 = OH; $R_2 = R_3 = R_5$ = H; R_4 = Cl
(**28i**): $R_1 = CH_3$; $R_2 = R_3 = R_5$ = H; R_4 = Cl
(**28j**): $R_1 = CH_3$; $R_3 = R_4 = R_5$ = OMe; R_2 = H
(**28k**): $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5$ = H

Схема 15. Синтез соединений (**28**) [27].

Реакцией циклоприсоединения иминов к 2-хлорацетилхлориду в присутствии триэтиламина (схема 16) синтезирована новая серия структурно жестких производных 1,4-диарил-3-хлороазетидин-2-она [28], оценено их регуляторное воздействие на рост клеточных линий MCF7 и SkBr3 рака молочной железы человека. Все исследуемые соединения обладали более высокой биодоступностью *in vitro* по сравнению с ресвератролом и показали противоопухолевую активность от умеренной до высокой (максимальная для соединений (**29d**) и (**29f**)) по отношению к тестируемым линиям.

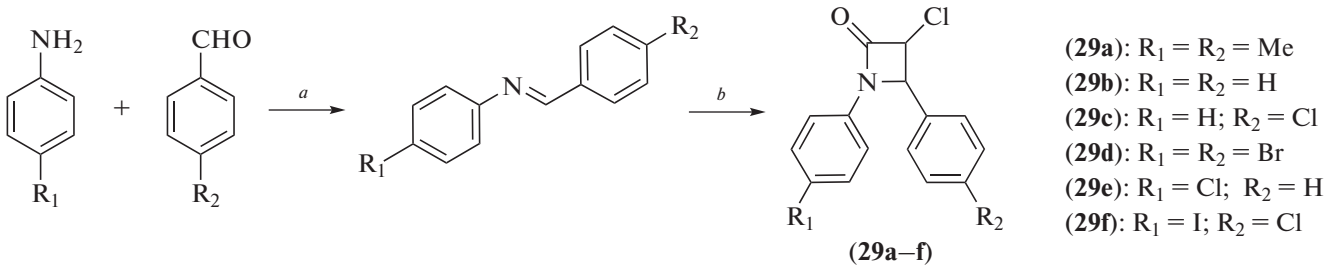


Схема 16. Синтез соединений (**29**). Реагенты и условия реакций: *a* – толуол; *b* – 2-хлорацетилхлорид, TEA, CH_2Cl_2, –78°C.

Основываясь на данных о способности ресвератрола ингибировать репликацию ВИЧ-1 в соответствии со схемой 17, был получен ряд его производных, для которых была оценена способность подавлять репликацию ВИЧ-1 в пределах одного цикла [29]. Показано, что производные (**30c**, **d**) и (**31c**, **d**) обладают более высокой активностью против ВИЧ-1, чем ресвератрол. Однако только для ресвератрола был выявлен синергетический эффект при совместном применении с известным препаратом децитабином.

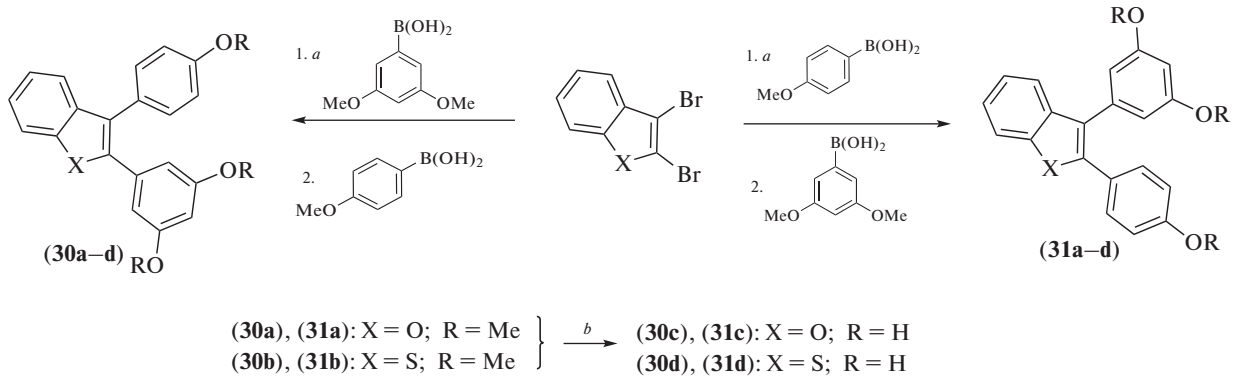


Схема 17. Синтез соединений (**30**) и (**31**). Реагенты и условия реакций: *a* – $Pd(PPh_3)_4$, 2 M Na_2CO_3, толуол/EtOH 3 : 1, кипячение, 6 ч; *b* – 1 M BBr_3, CH_2Cl_2, комн. темп., 20 ч.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Модификация структуры ресвератрола продолжает привлекать внимание медицинских химиков. Как видно из табл. 1, многие исследовательские группы сосредоточили свою работу на получении синтетических аналогов ресвератрола с целью повышения их биологической активности, прежде всего для создания эффективных средств борьбы с онкологическими заболеваниями. В ряде работ была продемонстрирована многообещающая антипролиферативная и цитотоксическая активность новых синтетических аналогов ресвератрола. Тем не менее были выявлены и соединения с иным потенциалом биологического действия, в частности аналоги с противовоспалительным, нейропротективным, противовирусным, сосудорасширяющим и другими эффектами (табл. 2). В рамках данного обзора мы постарались обобщить наиболее привилегированные структуры, производные которых показали ряд терапевтических эффектов и могут выступать в качестве хит-соединений при создании новых химиотерапевтических средств. Кроме того, анализ зависимостей структура–эффект для рассматриваемых библиотек аналогов будет способствовать лучшему пониманию молекулярных механизмов действия наиболее перспективных соединений. Мы надеемся, что этот обзор поможет медицинским химикам в рациональном дизайне и разработке новых лекарственных средств, направленных на профилактику и лечение наиболее значимых заболеваний человека.

Таблица 1. Антипролиферативная и цитотоксическая активность гетероциклических аналогов ресвератрола

Объект исследования	Метод исследования	Соединение	Активность IC_{50}, мкМ	Ссылка
Клеточная линия аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231	MTT-тест	(**1f**)	≈0.01	[10]
		(**1g–m**)	≈0.1	[10]
		(**3c**)	40	[11]
		(**3d**)	17.5	[11]
		(**3e**)	45.5	[11]
		транс-Ресвератрол	129.9	[11]
	SRB-тест	(**13c**)	17.4	[19]
		(**14f**)	18.1	[19]
		(**14e**)	19.4	[19]
		(**12b**)	46.1	[19]
		(**13b**)	47.4	[19]
		(**14c**)	67.6	[19]
		транс-Ресвератрол	20.5	[19]
Клеточная линия аденокарциномы молочной железы человека MCF7	MTT-тест	(**26o**)	0.017	[25]
		(**26l**)	0.05	[25]
		(**26h**)	0.36	[25]
		(**26k**)	0.39	[25]
		(**26g**)	0.54	[25]
		(**26p**)	0.61	[25]
		(**28g**)	2.58	[27]
		(**25g**)	7.4	[25]
		(**28h**)	5	[27]
		(**29f**)	11.77	[28]
		(**29d**)	16.72	[28]
		транс-Ресвератрол	28.07	[27]
		цис-Ресвератрол	28.38	[28]
		Комбретастатин	0.37	[25]
Клеточная линия аденокарциномы молочной железы человека с множественной лекарственной устойчивостью MCF7/Topo	MTT-тест	(**27l**)	0.00123	[26]
		(**27q**)	0.32	[26]
		(**27r**)	0.34	[26]
		Комбретастатин	0.5	[26]
Клеточная линия аденокарциномы молочной железы человека SkBr3	MTT-тест	(**28g**)	0.23	[27]
		(**28k**)	0.81	[27]
		(**29f**)	9.51	[28]
		(**29d**)	11.09	[28]
		транс-Ресвератрол	41.42	[27]
		цис-Ресвератрол	41.22	[28]

Таблица 1. Продолжение

Объект исследования	Метод исследования	Соединение	Активность IC_{50}, мкМ	Ссылка
Клеточная линия Т-клеточного лейкоза человека Jurkat	МТТ-тест	(**26o**)	0.003	[25]
		(**26l**)	0.005	[25]
		(**26h**)	0.05	[25]
		(**26k**)	0.05	[25]
		(**25g**)	0.093	[25]
		(**26g**)	0.3	[25]
		(**26p**)	0.65	[25]
		Комбретастатин	0.005	[25]
Клеточная линия промиелоцитарного лейкоза человека HL60	МТТ-тест	(**27j**)	0.00005	[26]
		(**27r**)	0.0001	[26]
		(**27q**)	0.0002	[26]
		(**27k**)	0.0002	[26]
		(**27m**)	0.0009	[26]
		(**26o**)	0.003	[25]
		(**27l**)	0.0038	[26]
		(**26l**)	0.02	[25]
		(**26g**)	0.09	[25]
		(**21a**)	0.1	[24]
		(**26h**)	0.12	[25]
		(**22a**)	0.25	[24]
		(**24d**)	0.3	[24]
		(**24b**)	0.5	[24]
		(**26k**)	0.5	[25]
		(**26p**)	0.7	[25]
		(**19b**)	0.9	[24]
		(**22b**)	2	[24]
		(**21b**)	2	[24]
		(**27n**)	4.6	[26]
		(**23b**)	5	[24]
		(**25g**)	6.2	[25]
		(**27i**)	9.7	[26]
		(**20b**)	15	[24]
		Комбретастатин	0.001	[25]
		транс-Ресвератрол	5	[30]
		цис-Ресвератрол	42	[30]

Таблица 1. Продолжение

Объект исследования	Метод исследования	Соединение	Активность IC_{50}, мкМ	Ссылка
Клеточная линия промиелоцитарного лейкоза человека с множественной лекарственной устойчивостью HL60R	MTT-тест	(**22a**)	0.75	[24]
		(**21a**)	0.25	[24]
		(**19b**)	1	[24]
		транс-Ресвератрол	60	[31]
Клеточная линия хронического миелогенного лейкоза человека K562	MTT-тест	(**26o**)	0.02	[25]
		(**26l**)	0.02	[25]
		(**26k**)	0.34	[25]
		(**26p**)	0.8	[25]
		(**26h**)	0.95	[25]
		Комбретастатин	0.005	[25]
		транс-Ресвератрол	28	[31]
Клеточная линия хронического миелогенного лейкоза человека K562/Adr, устойчивая к адриамицину	MTT-тест	(**22a**)	0.5	[24]
		(**21a**)	0.5	[24]
Клеточная линия рака легких (карцинома) человека A549	MTT-тест	(**26o**)	0.01	[25]
		(**26l**)	0.1	[25]
		(**26h**)	0.52	[25]
		(**26k**)	0.8	[25]
		(**26g**)	1.1	[25]
		Комбретастатин	0.18	[25]
		транс-Ресвератрол	119.6	[32]
Клеточная линия эмбриональной карциномы яичек человека 1411HP, чувствительная к цисплатину	SRB-тест	(**27r**)	0.022	[26]
		(**27q**)	0.03	[26]
		Комбретастатин	Неактивен	[26]
Клеточная линия эмбриональной карциномы яичек человека 1411HP, устойчивая к цисплатину	SRB-тест	(**27r**)	0.054	[26]
		(**27q**)	0.06	[26]
		Комбретастатин	Неактивен	[26]
Клеточная линия эпителиомы шейки матки человека HeLa	MTT-тест	(**26o**)	0.006	[25]
		(**26l**)	0.015	[25]
		(**26k**)	0.15	[25]
		(**26g**)	0.25	[25]
		(**26h**)	0.28	[25]
		(**26p**)	0.6	[25]
		Комбретастатин	0.004	[25]
		транс-Ресвератрол	47.9	[33]

Таблица 1. Окончание

Объект исследования	Метод исследования	Соединение	Активность IC_{50}, мкМ	Ссылка
Клеточная линия эндоцервикальной аденокарциномы человека KB-V1, устойчивая к винбластину	МТТ-тест	(**27l**)	0.00005	[26]
		(**27s**)	0.3	[26]
		(**27r**)	0.2	[26]
		(**27q**)	0.4	[26]
		Комбретастатин	0.0004	[26]
Клеточная линия аденокарциномы толстой кишки человека HT29	МТТ-тест	(**27r**)	0.00002	[26]
		(**27q**)	0.00006	[26]
		(**27j**)	0.0002	[26]
		(**27k**)	0.0043	[26]
		(**27l**)	0.057	[26]
		(**27s**)	0.064	[26]
		(**27i**)	0.51	[26]
		(**27h**)	0.53	[26]
		Комбретастатин	3.6	[26]
		транс-Ресвератрол	27	[34]
Клеточная линия меланомы человека 518A2	МТТ-тест	(**27l**)	0.002	[26]
		(**27r**)	0.0064	[26]
		(**27q**)	0.062	[26]
		(**27i**)	0.066	[26]
		(**27m**)	0.11	[26]
		(**27h**)	0.4	[26]
		(**27k**)	0.86	[26]
		(**27j**)	2.3	[26]
		(**27n**)	2.8	[26]
		Комбретастатин	0.018	[26]
	SRB-тест	*транс*-Ресвератрол	30	[35]
Головной мозг крупного рогатого скота	Оценка подавления полимеризации тубулина методом турбидиметрии	(**26l**)	0.76	[25]
		(**26o**)	1.5	[25]
		(**26h**)	2.3	[25]
		(**26k**)	3.6	[25]
		(**26g**)	3.9	[25]
		(**26p**)	5.1	[25]
		(**25g**)	16	[25]
		Комбретастатин	1.2	[25]

Таблица 2. Другие виды биологической активности гетероциклических аналогов ресвератрола

Объект исследования	Метод исследования	Соединение	Активность		Ссылка
			параметр	значение	
Противовоспалительная активность					
Клеточная линия мыши RAW264.7	Оценка ингибирования LPS-индуцированной продукции NO по методу Грисса	(**7ll**)	IC_{50}, мкМ	13.5	[14]
		(**7ff**)		23.27	[14]
		(**7l**)		30	[14]
		(**9n**)		45.3	[14]
		(**10i**)		47.8	[15]
		транс-Ресвератрол		30.71	[14]
Противовирусная активность					
Инфицированные ВИЧ-1 клетки человека U373-MAGI, экспрессирующие CXCR4	Анализ однократной репликации	(**30d**)	EC_{50}, мкМ	34.4	[29]
		(**30c**)		35	[29]
		(**31d**)		45.1	[29]
		транс-Ресвератрол		21.4	[29]
Вазорелаксирующая активность					
Кольца аорты крыс линии Wistar	Оценка снижения тонуса гладкомышечных клеток кольца аорты, вызванного KCl	(**14e**)	IC_{50}, мкМ	12.0226	[19]
		(**14h**)		12.5892	[19]
		(**12b**)		15.4882	[19]
		(**14f**)		15.4882	[19]
		(**13b**)		15.8489	[19]
		транс-Ресвератрол		6.91831	[19]
Активация хинонредуктазы 1					
Клеточная линия мыши Hepa-1c1c7	MTT-тест	(**7p**)	CD, мкМ	0.059	[14]
		(**10d**)		0.06	[15]
		(**10e**)		0.08	[15]
		(**9o**)		0.087	[16]
		(**9n**)		0.117	[16]
		(**9e**)		0.143	[16]
		(**9b**)		0.192	[16]
		(**9f**)		0.25	[16]
		(**9a**)		0.32	[16]
		(**9c**)		0.36	[16]
		(**9k**)		0.39	[16]
		(**9j**)		0.39	[16]
		(**7r**)		0.44	[14]
		(**7z**)		0.47	[14]
		(**7bb**)		0.54	[14]
		(**7aa**)		0.57	[14]
		(**9d**)		0.59	[16]
		(**7jj**)		0.98	[14]
		(**9r**)		1.1	[16]
		(**7j**)		1.72	[14]
		(**7h**)		1.73	[14]
		(**7o**)		1.8	[14]
		(**9s**)		1.98	[16]
		(**7q**)		2	[14]
		(**7e**)		2.07	[14]
		(**7a**)		2.1	[14]
		(**7t**)		2.1	[14]

Таблица 2. Продолжение

Объект исследования	Метод исследования	Соединение	Активность		Ссылка
			параметр	значение	
Клеточная линия мыши Hepa-1c1c7	МТТ-тест	(**7a**)	CD, мкМ	2.1	[14]
		(**9g**)		2.47	[16]
		(**7m**)		3.1	[14]
		(**7d**)		4	[14]
		(**7w**)		4	[14]
		(**7s**)		4	[14]
		(**7ii**)		4.04	[14]
		(**7n**)		4.9	[14]
		(**7dd**)		5.23	[14]
		(**9u**)		5.52	[16]
		(**9l**)		9.61	[16]
		(**7f**)		16	[14]
		(**7y**)		16	[14]
		(**7u**)		18.2	[14]
		(**10j**)		20.1	[15]
		(**9t**)		20.3	[16]
		транс-Ресвератрол		21	[14]
Клеточная линия мыши BPrc1c	МТТ-тест	(**9k**)	CD, мкМ	2.4	[16]
		(**7aa**)		2.8	[14]
		(**7z**)		4.4	[14]
		(**9h**)		6.1	[16]
		(**7p**)		6.5	[14]
		(**9g**)		6.8	[16]
		(**7bb**)		8.1	[14]
		(**9j**)		9.2	[16]
		(**9s**)		12.6	[16]
		(**9u**)		16.3	[16]
		(**7j**)		34.6	[14]
		(**9c**)		35.7	[16]
		(**7w**)		38.2	[14]
		(**7u**)		44.5	[14]
		(**7a**)		49.7	[14]
		цис-Ресвератрол		49.7	[14]
Клеточная линия мыши Hepa, мутантная по TAOc1c	МТТ-тест	(**9k**)	CD, мкМ	0.63	[16]
		(**7z**)		2	[14]
		(**7p**)		2.5	[14]
		(**9s**)		2.7	[16]
		(**7r**)		3.8	[14]
		(**9h**)		5.6	[16]
		(**9g**)		5.9	[16]
		(**7bb**)		6.3	[14]
		(**9j**)		7.8	[16]
		(**9u**)		13.4	[16]
		(**7a**)		18.6	[14]
		(**9c**)		33.9	[16]
		(**7u**)		41	[14]
		(**7j**)		44.3	[14]
		(**7w**)		48.7	[14]
Ингибирование ароматазы					

Таблица 2. Окончание

Объект исследования	Метод исследования	Соединение	Активность		Ссылка
			параметр	значение	
Ароматаза человека (дибензилфлуоресцеин в качестве субстрата)	Флуориметрия	(**10g**)	IC_{50}, мкМ	0.004	[15]
		(**10i**)		0.023	[15]
		(**10h**)		0.078	[15]
		(**10m**)		0.164	[15]
		(**7b**)		0.2	[14]
		(**10a**)		0.59	[15]
		(**7c**)		0.8	[14]
		(**10k**)		0.9	[15]
		(**10l**)		1.04	[15]
		(**10c**)		1.36	[15]
		(**10j**)		2.39	[15]
		(**10d**)		2.68	[15]
		(**10m**)		6.73	[15]
		(**10d**)		7.41	[15]
		(**10f**)		7.92	[15]
		(**10b**)		14.9	[15]
		(**10e**)		18	[15]
		транс-Ресвератрол		25	[15]
Ингибирование TNF-α-индуцированной активации NF-κB					
Эмбриональная клеточная линия почек человека HEK 293	Анализ экспрессии репортерного гена люциферазы	(**7ii**)	IC_{50}, мкМ	0.4	[13]
		(**7s**)		0.8	[13]
		(**10g**)		2.55	[15]
		(**9e**)		2.7	[16]
		(**10c**)		10.35	[15]
		транс-Ресвератрол		0.98	[13]

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Семенов А.В., Семенова Е.В., Балакирева О.И.* // Биоорг. химия. 2021. Т. 47. С. 111–128. [*Semenov A.V., Semenova E.V., Balakireva O.I.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2021. V. 47. P. 134–148.] https://doi.org/10.1134/S1068162021010210
2. *Shaito A., Posadino A.M., Younes N., Hasan H., Halabi S., Alhababi D., Al-Mohannadi A., Abdel-Rahman W.M., Eid A.H., Nasrallah G.K., Pintus G.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 2084–2109. https://doi.org/10.3390/ijms21062084
3. *Ruivo J., Francisco C., Oliveira R., Figueiras A.* // Braz. J. Pharm. Sci. 2015. V. 51. P. 499–514. https://doi.org/10.1590/S1984-82502015000300002
4. *Wang F., Chatterjee S.* // J. Phys. Chem. B. 2017. V. 121. P. 4745–4755. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.7b02115
5. *Tosato M.G., Vicendo P., Thomas A.H., Lorente C.* // J. Photochem. Photobiol. A Chem. 2018. V. 367. P. 327–331. https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2018.08.050
6. *Zupančič Š., Lavrič Z., Kristl J.* // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2015. V. 93. P. 196–204. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.04.002
7. *Nieoczym D., Socala K., Gawel K., Esquerra C.V., Wyska E., Wlaź P.* // Neurochem. Res. 2019. V. 44. P. 1043–1055. https://doi.org/10.1007/s11064-019-02735-2
8. *Martínez-Márquez A., Morante-Carriel J.A., Ramírez-Estrada K., Cusidó R.M., Palazon J., Bru-Martínez R.* // Plant Biotech. J. 2016. V. 14. P. 1813–1825. https://doi.org/10.1111/pbi.12539
9. *Lizard G., Latruffe N., Vervandier-Fasseur D.* // Molecules. 2020. V. 25. P. 605–618. https://doi.org/10.3390/molecules25030605
10. *Pagliai F., Pirali T., Del Grosso E., Di Brisco R., Tron G.C., Sorba G., Genazzani A.A.* // J. Med. Chem. 2006. V. 49. P. 467–470. https://doi.org/10.1021/jm051118z
11. *Nagaradja E., Bentabed-Ababsa G., Scalabrini M., Chevallier F., Phillipot S., Fontanay S., Duval R.E., Halauko Y.S., Ivashkevich O.A., Matulis V.E., Roisnel T., Mongin F.* // Bioorg. Med. Chem. 2015. V. 23. P. 6355–6363. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.08.031
12. *Bellina F., Guazzelli N., Lessi M., Manzini C.* // Tetrahedron. 2015. V. 71. P. 2298–2305. https://doi.org/10.1016/j.tet.2015.02.024

13. *Vergara D., De Domenico S., Tinelli A., Stanca E., del Mercato L.L., Giudetti A.M., Simeone P., Guazzelli N., Lessi M., Manzini C., Santino A., Bellina F., Maffia M.* // Mol. BioSyst. 2017. V. 13. P. 1131–1141. https://doi.org/10.1039/C7MB00128B
14. *Mayhoub A.S., Marler L., Kondratyuk T.P., Park E.-J., Pezzuto J.M., Cushman M.* // Bioorg. Med. Chem. 2012. V. 20. P. 510–520. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.09.031
15. *Mayhoub A.S., Marler L., Kondratyuk T.P., Park E.-J., Pezzuto J.M., Cushman M.* // Bioorg. Med. Chem. 2012. V. 20. P. 2427–2434. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.01.047
16. *Mayhoub A.S., Marler L., Kondratyuk T.P., Park E.-J., Pezzuto J.M., Cushman M.* // Bioorg. Med. Chem. 2012. V. 20. P. 7030–7039. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.10.006
17. *Ogas T., Kondratyuk T.P., Pezzuto J.M.* // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2013. V. 1290. P. 21–29. https://doi.org/10.1111/nyas.12196#
18. *Gobec M., Tomašič T., Markovič T., Mlinarič-Raščan I., Dolenc M.S., Jakopin Ž.* // Chemico-Biological Interactions. 2015. V. 240. P. 200–207. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.08.018
19. *Bertini S., Calderone V., Carboni I., Maffei R., Martelli A., Martinelli A., Minutolo F., Rajabi M., Testai L., Tuccinardi T., Ghidoni R., Macchia M.* // Bioorg. Med. Chem. 2010. V. 18. P. 6715–6724. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.07.059
20. *Chen P.-C., Tsai W.-J., Ueng Y.-F., Tzeng T.-T., Chen H.-L., Zhu P.-R., Huang C.-H., Shiao Y.-J., Li W.-T.* // J. Med. Chem. 2017. V. 60. P. 4062–4073. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00376
21. *Tanini D., Panzella L., Amorati R., Capperucci A., Pizzo E., Napolitano A., Menichettia S., d'Ischia M.* // Org. Biomol. Chem. 2015. V. 13. P. 5757–5764. https://doi.org/10.1039/C5OB00193E
22. *Farinha D.F.* // Selenium-containing polyphenols: antioxidant properties / Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Química Bioorgânica. Outubro. 2016. 53 p. http://hdl.handle.net/10362/21502
23. *Roberti M., Pizzirani D., Simoni D., Rondanin R., Baruchello R., Bonora C., Buscemi F., Grimaudo S., Tolomeo M.* // J. Med. Chem. 2003. V. 46. P. 3546–3554. https://doi.org/10.1021/jm030785u
24. *Simoni D., Grisolia G., Giannini G., Roberti M., Rondanin R., Piccagli L., Baruchello R., Rossi M., Romagnoli R., Invidiata F.P., Grimaudo S., Jung M.K., Hamel E., Gebbia N., Crosta L., Abbadessa V., Di Cristina A., Dusonchet L., Meli M., Tolomeo M.* // J. Med. Chem. 2005. V. 48. P. 723–736. https://doi.org/10.1021/jm049622b
25. *Romagnoli R., Baraldi P.G., Cruz-Lopez O., Cara C.L., Carrion M.D., Brancale A., Hamel E., Chen L., Bortolozzi R., Basso G., Viola G.* // J. Med. Chem. 2010. V. 53. P. 4248–4258. https://doi.org/10.1021/jm100245q
26. *Schobert R., Biersack B., Dietrich A., Effenberger K., Knauer S., Mueller T.* // J. Med. Chem. 2010. V. 53. 6595–6602. https://doi.org/10.1021/jm100345r
27. *Sala M., Chimento A., Saturnino C., Gomez-Monterrey I.M., Musella S., Bertamino A., Milite C., Sinicropi M.S., Caruso A., Sirianni R., Tortorella P., Novellino E., Campiglia P., Pezzi V.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2013. V. 23. P. 4990–4995. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.06.051
28. *Chimento A., Sala M., Gomez-Monterrey I.M., Musella S., Bertamino A., Caruso A., Sinicropi M.S., Sirianni R., Puoci F., Parisi O.I., Campana C., Martire E., Novellino E., Saturnino C., Campiglia P., Pezzi V.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2013. V. 23. P. 6401–6405. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.09.054
29. *Clouser C.L., Chauhan J., Bess M.A., van Oploo J.L., Zhou D., Dimick-Gray S., Mansky L.M., Patterson S.E.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2012. V. 22. P. 6642–6646. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.08.108
30. *Roberti M., Pizzirani D., Simoni D., Rondanin R., Baruchello R., Bonora C., Buscemi F., Grimaudo S., Tolomeo M.* // J. Med. Chem. 2003. V. 46. P. 3546–3554. https://doi.org/10.1021/jm030785u
31. *Roberti M., Pizzirani D., Recanatini M., Simoni D., Grimaudo S., Di Cristina A., Abbadessa V., Gebbia N., Tolomeo M.* // J. Med. Chem. 2006. V. 49. P. 3012–3018. https://doi.org/10.1021/jm060253o
32. *Yang J., Liu G.-Y., Dai F., Cao X.-Y., Kang Y.-F., Hu L.-M., Tang J.-J., Li X.-Z., Li Y., Jin X.-L., Zhou B.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2011. V. 21 P. 6420–6425. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.08.090
33. *Yan J., Guo Y., Wang Y., Mao F., Huang L., Li X.* // Eur. J. Med. Chem. 2015. V. 95. P. 220–229. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.03.030
34. *Estrela J.M., Mena S., Obrador E., Benlloch M., Castellano G., Salvador R., Dellinger R.W.* // J. Med. Chem. 2017. V. 60. P. 9413–9436. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01026
35. *Csuk R., Albert S., Siewert B., Schwarz S.* // Eur. J. Med. Chem. 2012. V. 54. P. 669–678. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.06.015

Heterocyclic Resveratrol Analogs – Synthesis and Physiological Activity. Part 2. Analogs Obtained by the Replacement of Ethylene Fragment with Heterocyclic Residues

A. V. Semenov*, #, E. V. Semenova*, and O. I. Balakireva*

#Phone: +7 (987) 691-05-38; e-mail: salexan@mail.ru

**National Research Ogarev Mordovia State University, ul. Bolshevistskaya 68, Saransk, 430005 Russia*

Continuing the consideration of synthetic analogues of one of the most studied natural polyphenols, resveratrol, the second part of the review is devoted to the structures obtained by the transformation of the ethylene fragment connecting benzene rings in the backbone of the natural prototype. The main attention is paid to the methods of identification and the revealed physiological effect of the structures, which uses a brief transformed into a heterocyclic fragment. Modification of such a rigid structure aimed at the decreasing of the conformational mobility of the molecule.

Keywords: resveratrol, heterocyclic analogues, conformational restrictions, antioxidants, antitumor activity, anti-inflammatory activity, quinone oxidoreductase 1 activation, aromatase inhibitors

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2022, том 48, № 1, с. 53–62

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.122.3

СХЕМА И ВЫВОДЫ ЛЕНИНДЖЕРА НУЖДАЮТСЯ В УТОЧНЕНИЯХ

© 2022 г. А. В. Малиновский*, #

** Биофизприбор, СКТБ, филиал ФГУП "ЭПМ" ФМБА России, Россия, 197183 Санкт-Петербург, ул. Сабировская, 37*

Поступила в редакцию 05.10.2020 г.
После доработки 21.10.2020 г.
Принята к публикации 23.10.2020 г.

В 1970 г. на основе данных о распаде аминокислот у позвоночных американский биохимик Альберт Ленинджер составил схему введения углеродных скелетов аминокислот в цикл Кребса, объединив аминокислоты в семь групп. Эта схема до сих пор используется в различных учебниках и справочниках по биохимии. Однако в ней имеются устаревшие сведения. Кроме того, Ленинджер занес каждую аминокислоту в одну из этих семи групп, между тем как для животного организма характерно иное превращение некоторых аминокислот. Что касается выводов насчет глюкогенного либо кетогенного действия той или иной аминокислоты, то они не всегда соответствуют данной схеме. В настоящем обзоре на основе современных данных о превращении аминокислот приводится уточненная автором схема введения углеродных скелетов аминокислот в цикл Кребса и полностью соответствующие ей выводы о глюкогенном либо кетогенном действии той или иной аминокислоты.

Ключевые слова: треонин, триптофан, лизин, глюкогенное действие, кетогенное действие

DOI: 10.31857/S0132342322010080

Введение.....53
Распад треонина у позвоночных.....54
Распад триптофана у позвоночных.....57
Распад лизина у позвоночных.....58
Заключение.....60
Список литературы.....61

ВВЕДЕНИЕ

Для окисления 20 различных аминокислот, входящих в состав белков, существует 20 различных путей, включающих большое число ферментативных реакций. Однако все эти пути приводят к получению небольшого числа продуктов, вовлекаемых в цикл Кребса. Американский биохимик Альберт Ленинджер в 1970 г. составил схему путей введения углеродных скелетов аминокислот в разные стадии окислительных превращений в цикле Кребса, объединив аминокислоты в 7 групп (схема 1) [1]. С тех пор эта схема принята за основу во многих учебниках и справочниках по биохимии животных и даже человека. Тем не менее в ней имеются три противоречия с выводами самого Ленинджера, а также устаревшие сведения.

У позвоночных после отщепления азота углеродные скелеты аминокислот могут превращаться в глюкозу или кетоновые тела, в зависимости от этого аминокислоты обладают глюкогенным либо кетогенным действием. Глюкогенное либо кетогенное действие той или иной аминокислоты приобретает особенное значение при голодании и сахарном диабете. Ленинджер относит треонин и триптофан к глюкогенным аминокислотам, но из схемы 1 следует, что треонин обладает как глюкогенным, так и кетогенным действием (поскольку превращение треонина в глицин по Ленинджеру сопровождается эквивалентным отщеплением ацетальдегида, имеющего кетогенное действие), а триптофан – только кетогенным. Что касается лизина, то Ленинджер считает, что он обладает как глюкогенным, так и кетогенным действием, но из схемы видно, что только кетогенным (как лейцин). В связи с этим необходимо обратиться к последним данным по распаду треонина, триптофана и лизина у позвоночных. Следует начать изложение материала с треонина, поскольку его распад, в отличие от триптофана и лизина, был в дальнейшем пересмотрен.

Сокращения: ЩУК – щавелевоуксусная кислота; КоА – кофермент А.

#Автор для связи: (эл. почта: malinovskiy.andrey@yandex.ru).

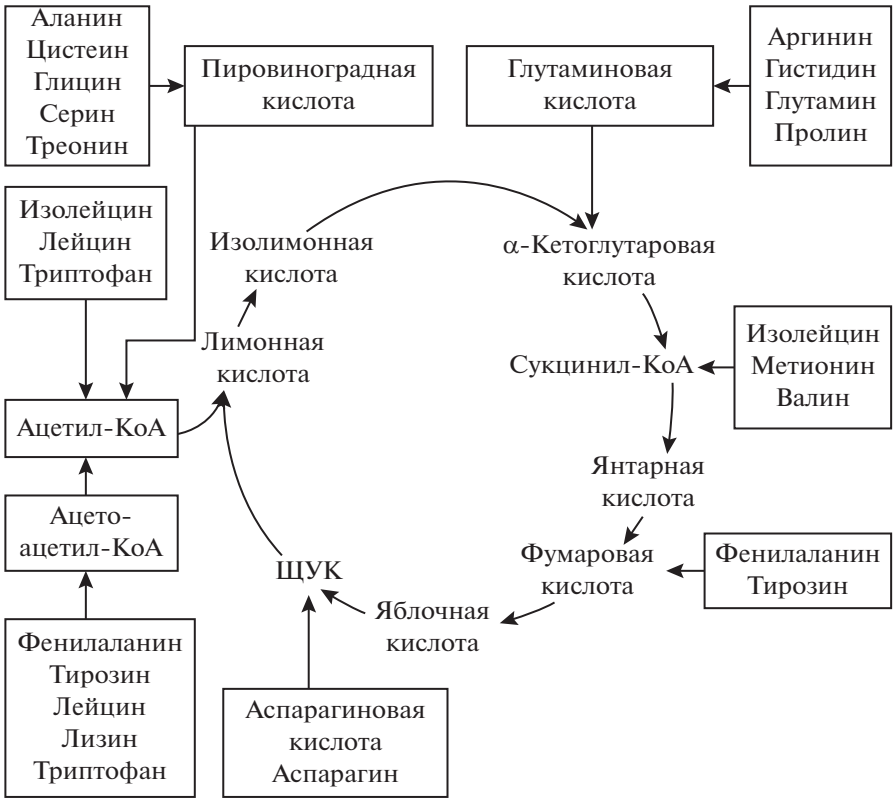


Схема 1. Пути введения углеродных скелетов аминокислот в цикл Кребса (по Ленинджеру [1]).

РАСПАД ТРЕОНИНА У ПОЗВОНОЧНЫХ

В книге Дэгли и Никольсона [2] приводится схема превращения треонина в печени (схема 2). Согласно этой схеме образующийся глицин, превращаясь в дальнейшем в серин, обладает глюкогенным действием, а ацетальдегид, окисляясь в ацетил-КоА, – кетогенным. Однако эта схема противоречит давно установленному факту о незаменимости треонина. Аналогичную схему превращения треонина в ацетил-КоА предлагает и Ленинджер, только согласно ей треонин распадается на глицин и ацетил-КоА необратимо, причем причина необратимости никак не объясняется на фоне обратимого взаимопревращения серина и глицина [1]. В работах Neuberger [3] и Devlin [4] также основным путем распада треонина считается его альдольное расщепление, катализируемое пиридоксалевым ферментом треонинальдолазой. И только Bird и Nunn [5] первыми усомнились в этом. Они показали низкую активность треонинальдолазы в печени крысы [5, 6] и сделали заключение, что альдолаза не может быть главным ферментом распада треонина у позвоночных (что никак не противоречит высокой активности треонинальдолазы у ряда бактерий, очевидно, распространенной Ленинджером на все организмы).

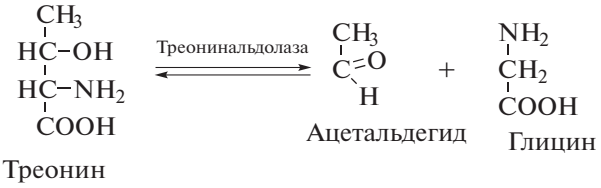


Схема 2. Взаимопревращение треонина и глицина [2].

Bird и Nunn пришли к выводу [5], что активность треонинальдолазы у позвоночных на самом деле имитируется последовательными действиями другого пиридоксалевого фермента треониндегидратазы и NAD-зависимого фермента лактатдегидрогеназы, причем первая расщепляет треонин необратимо до α-кетомасляной кислоты, которая может обратимо восстанавливаться в α-гидроксимасляную кислоту под влиянием лактатдегидрогеназы, которая, как известно, катализирует обратимое восстановление пировиноградной кислоты в молочную при гликолизе (схема 3). Образующаяся из треонина α-кетомасляная кислота может также обратимо переаминироваться в α-аминомасляную

кислоту, но в своей большей части подвергается необратимому окислительному декарбоксилированию с превращением в пропионил-КоА, который в свою очередь через ряд соединений приходит к таким участникам цикла Кребса, как сукцинил-КоА и янтарная кислота, что роднит распад треонина с распадом валина, изолейцина и метионина и обусловливает его глюкогенное действие.

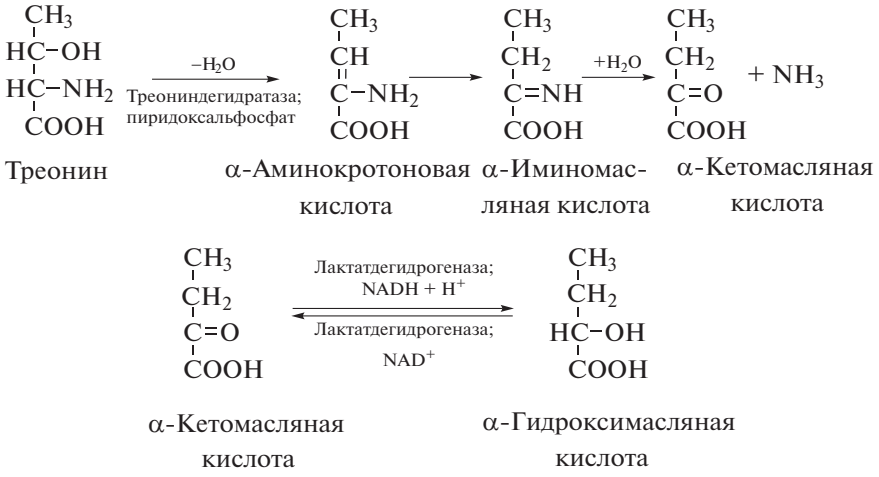


Схема 3. Необратимый распад треонина с дальнейшим восстановлением α-кетомасляной кислоты (по данным Yeung [7]).

Яркое доказательство отсутствия треонинальдолазы в тканях позвоночных – исчезновение подобной активности после осаждения треониндегидратазы специфическим антителом. При этом сохранялась активность альдольного расщепления аллотреонина – оптического изомера треонина, не входящего в состав белков [7]. Дальнейшие исследования подтвердили существование у позвоночных альдолазы, которая, подобно серингидроксиметилтрансферазе, обратимо расщепляет аллотреонин [8]. В работе Darling et al. [9] рассматривается катаболизм треонина у взрослого человека, и при этом треонинальдолаза уже не упоминается. Остается неясным значение альдолазы, расщепляющей аллотреонин. Последний не выполняет функции треонина в организме млекопитающих [10], не встречается как природное вещество [11] и не может в организме эпимеризоваться в треонин [12].

Стоит отметить, что серингидроксиметилтрансфераза – фермент, катализирующий взаимопревращение серина и глицина, широко распространен в организме млекопитающих. Schrichen и Gross [13] сообщили, что в печени крыс этот фермент идентичен треонинальдолазе. Это послужило установившемуся мнению, что треонин распадается под действием серингидроксиметилтрансферазы. Однако препараты этого фермента, полученные в лабораториях из печени крыс, не проявляли активности треонинальдолазы. Из этого в работе Ogawa et al. [14] сделан вывод о том, что треонинальдолаза у млекопитающих отсутствует.

Итак, главными ферментами распада треонина у млекопитающих до недавнего времени считались ферменты цитозоля печени треониндегидратаза и треонинальдолаза. Позднее было установлено, что треонин также окисляется в митохондриях под действием треониндегидрогеназы [15]. Последняя катализирует NAD-зависимое окисление треонина до α-аминоацетоуксусной кислоты, которая самопроизвольно декарбоксилируется, превращаясь в аминоацетон [6, 16, 17] (схема 4). Аминоацетон в дальнейшем окисляется в аминоацетоновом цикле [15] (схема 5).

Схема 4. Окисление треонина в митохондриях (по данным Bird и Nunn [6]; Pagani et al. [16, 17]).

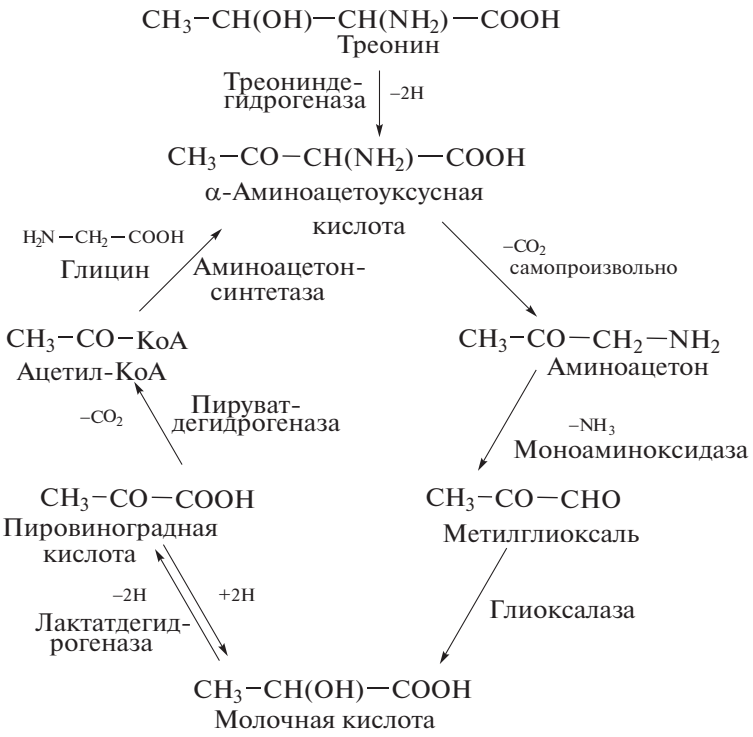


Схема 5. Окисление треонина в аминоацетоновом цикле (по данным Green и Elliott [15]).

Как мы видим, распадаясь под действием треониндегидрогеназы с дальнейшим окислением в аминоацетоновом цикле, треонин превращается в молочную и пировиноградную кислоты, а следовательно, обладает глюкогенным действием подобно аланину, серину, глицину и цистеину без какого-либо кетогенного эффекта.

Однако Linstead et al. [18] обнаружили, что у трипаносомы – паразитического простейшего, вызывающего у млекопитающих и человека сонную болезнь, – треонин активно используется для синтеза липидов. Он расщепляется комплексом треониндегидрогеназы и аминоацетонсинтетазы до глицина и ацетил-KoA. Последний факт послужил основанием для некоторых авторов считать треонин одновременно глюкогенной и кетогенной аминокислотой [19, 20], несмотря на то, что в работе Уайт с соавт. [21] отмечается, что у млекопитающих *in vivo* не наблюдается образование кетоновых тел из треонина.

Аналогично в работе Steven et al. [22] заявлено о том, что стволовые клетки мыши содержат очень активную треониндегидрогеназу, осуществляющую также в комплексе с аминоацетонсинтетазой нетипичную для млекопитающих форму катаболизма треонина, расщепляя его на глицин и ацетил-KoA, причем глицин тут же включается в биосинтез пуриновых оснований, а ацетил-KoA используется как энергетический субстрат для цикла Кребса. Этот вопрос затем обсуждался в ряде исследований [23–25]. В процессе дифференцировки клеток мыши активность треониндегидрогеназы резко уменьшается. Guerranti et al. [26] показали, что у крыс образование из треонина под действием треониндегидрогеназы даже мизерного количества ацетил-KoA достаточно для полного ингибирования треониндегидрогеназы всеми образующимися из ацетил-KoA соединениями по принципу обратной связи.

У человека Zhao et al. [27] не удалось обнаружить превращения треонина плазмы крови в глицин. Тогда считалось, что у животных ферменты треонинальдолаза и треониндегидрогеназа катализируют распад треонина до глицина, поэтому впервые было сделано предположение об отсутствии этих ферментов у человека. Однако вскоре было установлено, что треонинальдолаза, в отличие от треониндегидрогеназы, отсутствует и у животных (см. выше).

Edgar [28] проводит сравнение генов треониндегидрогеназы человека и ряда животных и делает вывод, что человек в процессе эволюции утратил способность к синтезу треониндегидрогеназы.

Chuanchin et al. [23] и Winkle et al. [24] также подтверждают, что у человека из-за генной мутации отсутствует функциональная треониндегидрогеназа. Поэтому вопрос о кетогенном действии треонина у человека отпадает сам собой.

Ленинджер относит треонин к глюкогенным аминокислотам у млекопитающих вполне справедливо. Более того, еще в 1974 г. академик А.А. Покровский, подчеркивая особую важность для глюконеогенеза у млекопитающих аминокислот серина и треонина на фоне безуглеводных, богатых белком диет (наряду с аланином, аспарагиновой кислотой и орнитином), заявил, что за первую стадию их включения в глюконеогенез ответственен фермент сериндегидратаза, который катализирует и реакцию дегидратации треонина, а потому данный фермент может с полным правом быть назван серин-треонин-дегидратазой [29]. Значительно позже была установлена идентичность апоферментов (белков) треониндегидратазы и сериндегидратазы [30], а следовательно, тождественность этих двух ферментов [31, 32]. Но распадается треонин с дальнейшим вступлением в цикл Кребса у животных иначе, чем это описывается у Ленинджера. Поэтому в схеме 1, если она относится к животному организму, треонин должен быть занесен в одну группу с изолейцином, метионином и валином.

РАСПАД ТРИПТОФАНА У ПОЗВОНОЧНЫХ

Триптофан – незаменимая аминокислота, поэтому его углеродный скелет у позвоночных также распадается необратимо. В настоящее время установлено, что из существующих в организме четырех путей распада триптофана в норме 95% этой аминокилоты распадается по кинурениновому пути [33, 34]. Остальные три побочных пути и образующиеся в них продукты следующие: 1) гидроксилирование (серотонин в мозге или мелатонин в шишковидной железе), 2) декарбоксилирование (триптамин), 3) переаминирование (индолилпировиноградная кислота). Но все эти три пути не приводят к раскрытию индольного кольца. Следовательно, их продукты не поступают в цикл Кребса. Только кинурениновый путь, составляющий 95% распада триптофана, приводит к раскрытию индольного кольца и может приводить к циклу Кребса. Однако следует оговориться, что и в этом пути основной поток триптофана приводит к образованию 3-гидроксикинуренина, который необратимо гидролизуется на аланин и 3-гидроксиантраниловую кислоту. В свою очередь основной поток 3-гидроксиантраниловой кислоты ведет к синтезу коферментов NAD и NADP, необходимых для биологического окисления, и только ее незначительная часть окисляется в ацетоацетил-КоА, который способен вступить в цикл Кребса.

Ленинджер [1] предложил схему превращения триптофана в ацетил-КоА и ацетоацетил-КоА (схема 6). Поскольку в наши дни эта схема не претерпела принципиальных изменений, стоит ее рассмотреть внимательнее. Ничего нельзя возразить об образовании из триптофана ацетоацетил-КоА, что говорит о не отмеченном Ленинджером кетогенном действии триптофана у млекопитающих. В этом отношении автор правильно занес триптофан в одну группу с фенилаланином, тирозином, лейцином и лизином. Однако в силу превращения значительного количества 3-гидроксиантраниловой кислоты в хинолиновую (физиологически активна), никотиновую (витамин PP – предшественник коферментов NAD и NADP) и пиколиновую кислоты (также физиологически активна) кетогенное действие триптофана будет незначительным [33, 34]. Что же касается превращения триптофана в ацетил-КоА, то автор справедливо замечает, что последний – продукт распада аланина, образующегося из триптофана в ходе расщепления 3-гидроксикинуренина на 3-гидроксиантраниловую кислоту и аланин. Но аланин – глюкогенная аминокислота. При дезаминировании он превращается в пировиноградную кислоту, которая может дальше идти тремя путями: 1) необратимо подвергаться окислительному декарбоксилированию до ацетил-КоА; 2) обратимо карбоксилироваться в щавелевоуксусную кислоту (ЩУК) – катализатор цикла Кребса; 3) обратимо превращаться в глюкозу или гликоген. Именно последним объясняется и глюкогенное действие триптофана у млекопитающих. Но в таком случае недопустимо в схеме 1 объединять триптофан как образующую ацетил-КоА аминокислоту в одну группу с лейцином и изолейцином (лейцин и изолейцин превращаются в ацетил-КоА без образования каких-либо глюкогенных продуктов), а надлежит занести его в одну группу с аланином, который образуется из триптофана. Тогда глюкогенное действие триптофана становится очевидным.

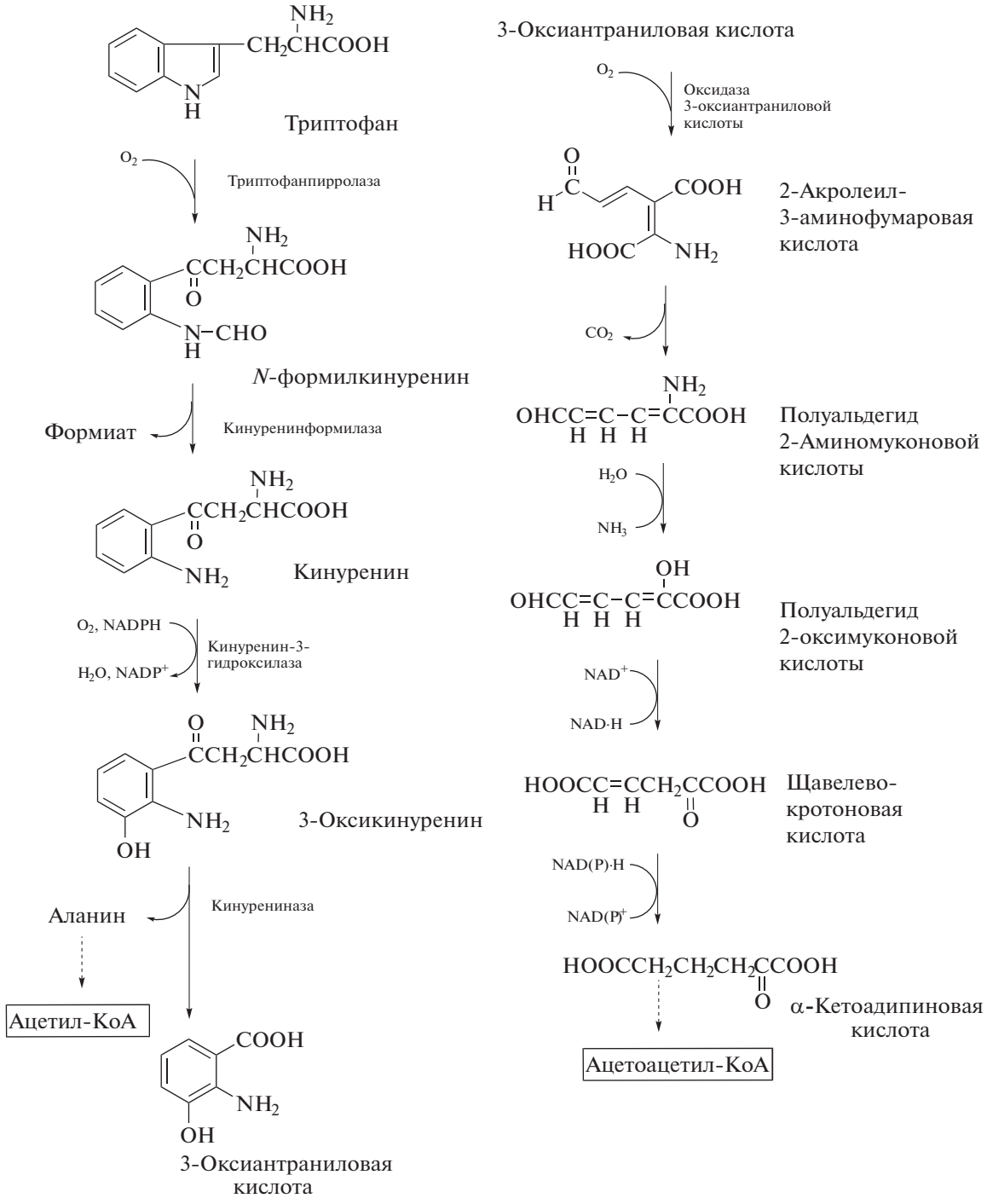


Схема 6. Превращение триптофана в ацетил-КоА и ацетоацетил-КоА [1].

РАСПАД ЛИЗИНА У ПОЗВОНОЧНЫХ

Лизин – единственная из природных аминокислот, не способная подвергаться переаминированию, а потому у позвоночных необратим не только распад углеродного скелета лизина (как у всех других незаменимых аминокислот), но и дезаминирование этой аминокислоты.

Ленинджер предложил схему превращения лизина в ацетоацетил-КоА (схема 7) [1]. Однако эта схема представляет лишь пипеколатный путь распада лизина, преобладающий в мозге взрослых млекопитающих. В остальных тканях млекопитающих, а также в эмбриональной мозговой ткани преобладает сахаропиновый путь [35]. Здесь не имеет смысла его рассматривать, поскольку оба пути сходятся на уровне Δ^1-пиперидин-6-карбоновой кислоты (у Ленинджера Δ^6-пиперидин-2-карбоновой, что не является ошибкой). Она находится в равновесии со своей открытой формой – полуальдегидом α-аминоадипиновой кислоты. Последний окисляется в α-аминоадипиновую кислоту, которая при переаминировании с α-кетоглутаровой кислотой превращается в α-кетоадипиновую кислоту. Последняя, как и в случае триптофана, распадается до ацетоацетил-КоА. Это показано Ленинджером на схеме 7 и говорит о том, что лизин – аминокислота только с кетогенным действием. Ленинджер на схеме 1 вполне обоснованно поместил лизин в одну группу с лейцином, фенилаланином, тирозином и триптофаном. Однако вывод автора о том, что лизин у млекопитающих, кроме кетогенного действия, обладает и гликогенным, неверен.

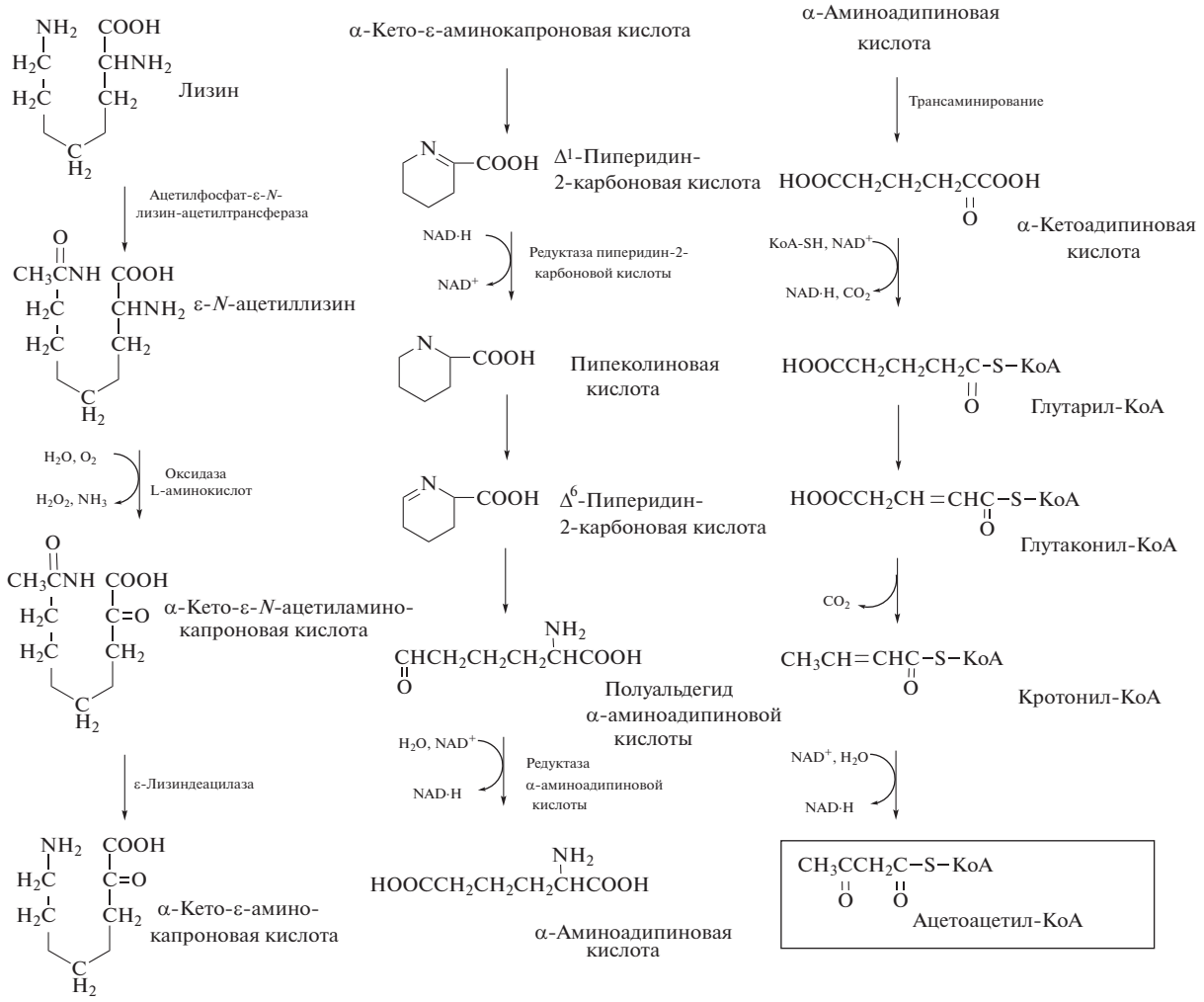


Схема 7. Превращение лизина в ацетоацетил-КоА [1].

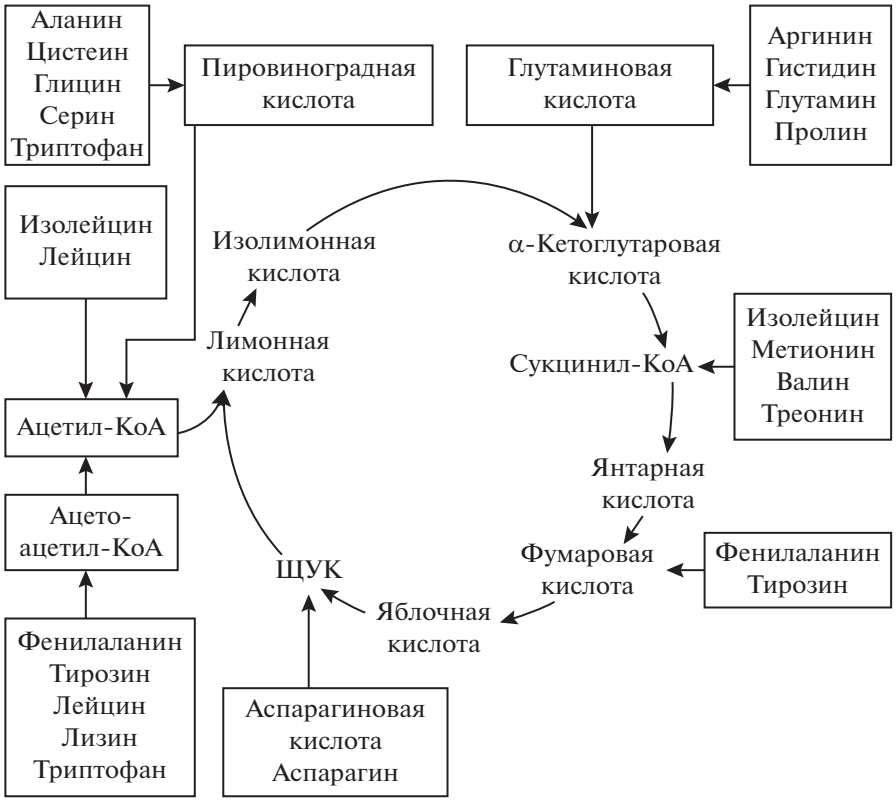


Схема 8. Пути введения углеродных скелетов аминокислот в цикл Кребса согласно современным представлениям.

В то же время в новом издании своего учебника [36] Ленинджер оставляет примерно ту же схему (схема 1), но удаляет из нее группу, демонстрирующую превращение изолейцина в ацетил-КоА, упоминая при этом, что триптофан и лейцин, которые в предыдущем издании также помещены в эту группу, могут превращаться в ацетил-КоА. О превращении в последний изолейцина не говорится и в тексте. Следовательно, в отличие от предыдущего издания, полностью умалчивается, какой аминокислотой выступает изолейцин – глюкогенной или кетогенной. При этом автор справедливо относит лизин к кетогенным аминокислотам, а триптофан – к кетогенным и глюкогенным, но почему-то последний назван 2 раза: как глюкогеная и как кетогенная аминокислота, в то время как фенилаланин и тирозин названы 1 раз как аминокислоты, одновременно обладающие кетогенным и глюкогенным действием. Об изолейцине, который тоже обладает и кетогенным, и глюкогенным действием, как уже было сказано выше, вообще не упоминается. И так же, как в предыдущем издании, не объясняется, почему превращающийся в ацетил-КоА и ацетоацетил-КоА триптофан обладает глюкогенным действием.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С учетом изложенных в настоящем обзоре современных данных о превращении аминокислот автор предлагает вниманию читателей уточненную схему введения углеродных скелетов аминокислот в цикл Кребса (схема 8) и полностью соответствующие ей выводы о глюкогенном либо кетогенном действии той или иной аминокислоты. Данные уточнения касаются трех аминокислот: треонина, триптофана и лизина.

Треонин распадается у млекопитающих и человека под действием треониндегидратазы и, подобно изолейцину и метионину, превращается в пропионил-КоА. Последний после карбоксилирования превращается в метилмалонил-КоА, который образуется также из валина. Метилмалонил-КоА под влиянием фермента метилмалонил-КоА-мутазы, содержащего в качестве кофермента витамин B_{12}, изомеризуется в сукцинил-КоА и включается в цикл Кребса. Поэтому, в первую очередь, треонин должен быть записан в одну группу с валином, изолейцином и метионином (схема 8). Если учитывать распад треонина у млекопитающих (но не у человека!) под действием треониндегидрогеназы, то треонину следует также находиться в той же группе, где он находится у Ленинджера, но по другой причине: образую-

щийся из треонина аминоацетон окисляется в аминоацетоновом цикле с образованием пировиноградной кислоты. В обоих случаях треонин будет только глюкогенной аминокислотой. Но поскольку у человека отсутствует треониндегидрогеназа, автор считает, что занесение треонина в последнюю группу лишит схему 8 универсальности для позвоночных.

Триптофан у позвоночных распадается по четырем путям, из которых только кинурениновый путь, составляющий 95% распада триптофана, приводит к раскрытию индольного кольца и может приводить к циклу Кребса. Основной поток триптофана приводит к образованию 3-гидроксикинуренина, который необратимо гидролизуется на аланин и 3-гидроксиантраниловую кислоту. Поэтому место триптофана – в одной группе с аланином, цистеином, глицином и серином, и подобно им триптофан – глюкогенная аминокислота (схема 8). Нахождение его в одной группе с лейцином и изолейцином как предшественниками ацетил-КоА неверно. В то же время основной поток 3-гидроксиантраниловой кислоты ведет к синтезу коферментов NAD и NADP, необходимых для биологического окисления, и только ее незначительная часть окисляется в ацетоацетил-КоА, что и обусловливает слабое кетогенное действие триптофана. Поэтому Ленинджер также определил триптофан в одну группу с фенилаланином, тирозином, лейцином и лизином, что не является ошибкой.

Лизин у млекопитающих распадается двумя путями, но оба приводят к ацетоацетил-КоА. Поэтому Ленинджер верно записал его в одну группу с лейцином, фенилаланином, тирозином и триптофаном. Но из этого следует, что лизин – только кетогенная аминокислота, что учтено автором в новом издании учебника [36].

Представленная уточненная схема введения углеродных скелетов аминокислот в цикл Кребса (схема 8) может быть рекомендована к использованию взамен схемы 1 в учебниках и справочниках по биохимии животных и человека.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ленинджер А.* // Биохимия. М.: Мир, 1976.
2. *Дэгли С., Никольсон Д.* // Метаболические пути. М.: Мир, 1973.
3. *Neuberger A.* // Comp. Biochem. 1981. V. 19A. P. 257–303.
4. *Devlin T.M.* // Textbook of Biochemistry. John Wiley and Sons, New York, 1982.
5. *Bird M.I., Nunn P.B.* // Biochem. Soc. Trans. 1979. V. 7. P. 1274–127. https://doi.org/10.1042/bst0071274
6. *Bird M.I., Nunn P.B.* // Biochem. J. 1983. V. 214. P. 687–693. https://doi.org/10.1042/bj2140687
7. *Yeung Y.G.* // Biochem. J. 1986. V. 237. P. 187–190. https://doi.org/10.1042/bj2370187
8. *Pagani R.* // Biochem. Soc. Trans. 1991. V. 19. P. 3465.
9. *Darling P.B., Grunov J., Rafii M., Brookes S., Ball R.O., Pencharz P.B.* // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2000. V. 278. P. 877–884. https://doi.org/10.1152/ajpendo.2000.278.5.E877
10. *West H.D., Carter H.E.* // J. Biol. Chem. 1938. V. 122. P. 611–617.
11. *Karasek M.A., Greenberg D.M.* // J. Biol. Chem. 1957. V. 227. P. 191–205.
12. *Malkin L.I., Greenberg D.M.* // Biochem. Biophys. Acta. 1964. V. 85. P. 117–131.
13. *Schirch I., Gross T.* // J. Biol. Chem. 1968. V. 243. P. 5651–5655.
14. *Ogawa H., Gomi T., Fujioka. M.* // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2000. V. 32. P. 289–301. https://doi.org/10.1016/s1357-2725(99)00113-2
15. *Green M.L., Elliott W.H.* // Biochem. J. 1964. V. 92. P. 537.
16. *Pagani R., Guerranti R., Leoncini R., Marinello E.* // Ital. J. Biochem. 1990. V. 39. P. 108.
17. *Pagani R., Guerranti R., Righi S., Leoncini R., Vannoni D., Marinello E.* // Biochem. Soc. Trans. 1992. V. 20. P. 245. https://doi.org/10.1042/bst020024s
18. *Linstead D.J., Klein R.A., Cross G.A.M.* // J. Gen. Microbiol. 1977. V. 101. P. 243–251. https://doi.org/10.1099/00221287-101-2-243
19. *Voet D., Voet J.G.* // Biochemistry. 2nd ed. Wiley, New York, 1995.
20. *Garret R.H., Grisham C.M.* // Biochemistry. Saunders College Publishing, Orlando, 1995.
21. *Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И.* // Основы биохимии. М.: Мир, 1981.
22. *Steven L., MeKnight D., Wang J.* // Patent US8288158B2, 16.10.2012.
23. *Chuanchin H., Hao G., Jiaxu W., Weiguang L., Yide M., Mian W.* // Stem. Cells. 2013. V. 31. P. 953–965. https://doi.org/10.1002/stem.1335
24. *Winkle L.J.V., Gallat V., Iannaccone P.M.* // Cell Develop. Biol. 2014. V. 2. P. 18. https://doi.org/10.3389/fcell.2014.00018
25. *Shyh-Chang Nq, Locasale J.W., Lyssiotis C.A., Zheng Y., Teo R.Y., Ratanasirintrawoot S., Zhang J., Onder T., Untermaehrer J.J., Zhu H., Asara J.M., Daley G.Q., Cantley L.C.* // Science. 2013. V. 339. P. 222–226. https://doi.org/10.1126/science.1226603

26. *Guerranti R., Pagani R., Neri S., Errico S.V., Leoncini R., Marinello E.* // Biochem. Biophys. Acta. 2001. V. 1568. P. 45–52. https://doi.org/10.1016/s0304-4165(01)00197-0
27. *Zhao X.H., Wen Z.M., Meredith C.N., Matthews D.E., Bier D.M., Young V.R.* // Am. J. Clin. Nutr. 1986. V. 43. P. 795–802. https://doi.org/10.1093/ajcn/43.5.795
28. *Edgar A.J.* // BMC Biochem. 2002. V. 3. P. 18. https://doi.org/10.1186/1471-2156-3-18
29. *Покровский А.А.* // Роль биохимии в развитии науки о питании. М.: Наука, 1974.
30. *Watanabe R., Fujimura S., Kadowaki M., Ishibashi T.* // Anim. Sci. Technol. (Jpn.). 1998. V. 69. P. 108–116.
31. *House J.D., Hall B.N., Brosnan J.T.* // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2002. V. 281. P. E1300–E1307. https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.281.6.E1300
32. *Nagao K., Bannai M., Seki S., Mori M., Takahashi M.* // Amino Acids. 2009. V. 36. P. 555–562. https://doi.org/10.1007/s00726-008-0117-7
33. *Badawi A.A.* // Int. J. Tryptophan. Res. 2017. V. 10. P. 1–20. https://doi.org/10.1177/1178646917691938
34. *Badavi A.A.* // Egypt J. Basic Clin. Pharmacol. 2019. V. 9. P. 1–30.
35. *Hallen A., Jamie J.F.* // Amino Acids. 2013. V. 45. P. 1249–1272. https://doi.org/10.1007/s00726-013-1590-1
36. *Ленинджер А.* // Биохимия. М.: Мир, 1985.

Leninger's Scheme and Conclusions Need Defining More Exactly

A. V. Malinovsky*, #

#*E-mail: info@biofizpribor.ru*

**Biofizpribor, Branch of Federal Medical-Biological Agency, ul. Sabirovskaya 37, St. Petersburg, 197183 Russia*

It was in 1970 that on the basis of the data concerning decay of amino acids in vertebrates the American biochemist Albert Leninger made up a scheme of introducing carbon skeletons of amino acids into Krebs cycle; amino acids being united into seven groups. Since that time his scheme has been used in different manuals and textbooks on biochemistry. However, we believe that some information which can be found in Leninger's scheme is obsolete. Moreover, Leninger referred each amino acid to one of the seven groups which in our opinion is incorrect as the animal organism is characterized by other transformation of some amino acids. As to the conclusions concerning the glucogenic and ketogenic actions of one or another amino acid, they do no fully correspond to his scheme. In the present review the scheme of introducing aminoacids carbon skeletons into Krebs cycle specified by the author on the basis of the latest data about aminoacids transformation is given and a fully correspondent conclusion of glucogenic and ketogenic actions of one or the other aminoacid is drawn.

Keywords: threonine, tryptophan, lysine, the glucogenic action, the ketogenic action

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2022, том 48, № 1, с. 63–74

УДК 577.18+577.112.4

ПРЯМОЕ КОНЪЮГИРОВАНИЕ ПЕНИЦИЛЛИНОВ И ЦЕФАЛОСПОРИНОВ С БЕЛКАМИ ДЛЯ РЕЦЕПТОРНОГО АНАЛИЗА БЕТА-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ

© 2022 г. Т. С. Серченя*, #, И. В. Горбачева*, О. В. Свиридов*

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

Поступила в редакцию 26.04.2021 г.
После доработки 04.05.2021 г.
Принята к публикации 21.05.2021 г.

Пятнадцать белковых конъюгатов пенициллинов и цефалоспоринов, содержащих амино- и/или карбоксильные группы в исходных структурах, синтезированы в реакциях с сывороточным альбумином человека или овальбумином с использованием 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорида (EDC) или комбинации EDC/*N*-гидроксисульфосукцинимид (sNHS) при различных соотношениях базовых реагентов. Проведено сравнительное исследование состава и свойств конъюгатов методами УФ-спектроскопии, масс-спектрометрии и лиганд-рецепторного анализа. Показано, что содержание остатков антибиотика в полученных макромолекулах варьируется от 1 до 22, бета-лактамный цикл остается интактным, и это обеспечивает специфическое взаимодействие конъюгатов с пенициллин-связывающим белком. В двух разработанных моделях рецепторных биоаналитических систем конъюгат ампициллина на твердой фазе взаимодействует с пенициллин-связывающим белком в составе его комплекса с моноклональным антителом, которое детектировали с использованием иммуноферментной метки в микропланшетах или наночастиц золота на тест-полосках. Связывание конъюгированного ампициллина с рецептором конкурентно ингибировалось антибиотиками, добавленными в жидкую фазу, и показатели аналитической чувствительности в отношении пенициллина G для микропланшетной и рецепторно-хроматографической тест-систем составили 0.05 и 1 нг/мл соответственно.

Ключевые слова: гаптен-белковые конъюгаты, бета-лактамы, рецепторный анализ, антибиотики

DOI: 10.31857/S0132342322010122

ВВЕДЕНИЕ

Бета-лактамные антибиотики составляют один из наиболее широко используемых в медицине и ветеринарной химиотерапии классов противомикробных препаратов [1, 2]. Поэтому точные, простые и быстрые методы их определения востребованы и актуальны для контроля биобезопасности продуктов питания животного происхождения [3–6], оценки уровня бета-лактамов в крови в целях назначения адекватной дозы пациентам при неотложных состояниях [6–9], а также для мониторинга содержания в объектах окружающей среды [10, 11]. Эффективным методом скринингового контроля различных антибиотиков признан иммуноанализ, основанный на реакции антиген–антитело [3, 12–15]. Однако в случае бета-лактамных антибиотиков уникальную возможность для разработки методов биоанализа представляет лиганд-рецепторное взаимодействие с участием специфического пенициллин-связывающего белка (ПСБ), узнающего обязательный структурный элемент этих лекарственных субстанций – бета-лактамное кольцо. ПСБ в мембране бактерий играет ключевую роль в механизме антибактериального действия бета-лактамов, образуя с ними комплекс с последующей химической модификацией остатка серина в активном центре и обусловленной этим утратой ПСБ функции транспептидазы в биосинтезе пептидогликанов клеточной стенки бактерии, что приводит к гибели микроорганизма [16–18]. Преимущество использования рецептора в биоанализе, в отличие от большинства антител, заключается в

Сокращения: К.В. – коэффициент вариации; МАт – моноклональное антитело; ПСБ – пенициллин-связывающий белок; ЧСА – сывороточный альбумин человека; B_0 – оптическая плотность в анализе в отсутствие конкурирующего бета-лактама в жидкой фазе; BSA – бычий сывороточный альбумин; EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид; IC_{50} – концентрация антибиотика в растворе, вызывающая 50%-ное ингибирование связывания рецептора с твердофазным лигандом; MES – 2-(*N*-морфолино)этансульфоновая кислота; PBS – натрий-фосфатный буфер; sNHS – *N*-гидроксисульфосукцинимид.

Автор для связи: (тел.: +375 (17) 300-57-07; эл. почта: serchenya@iboch.by).

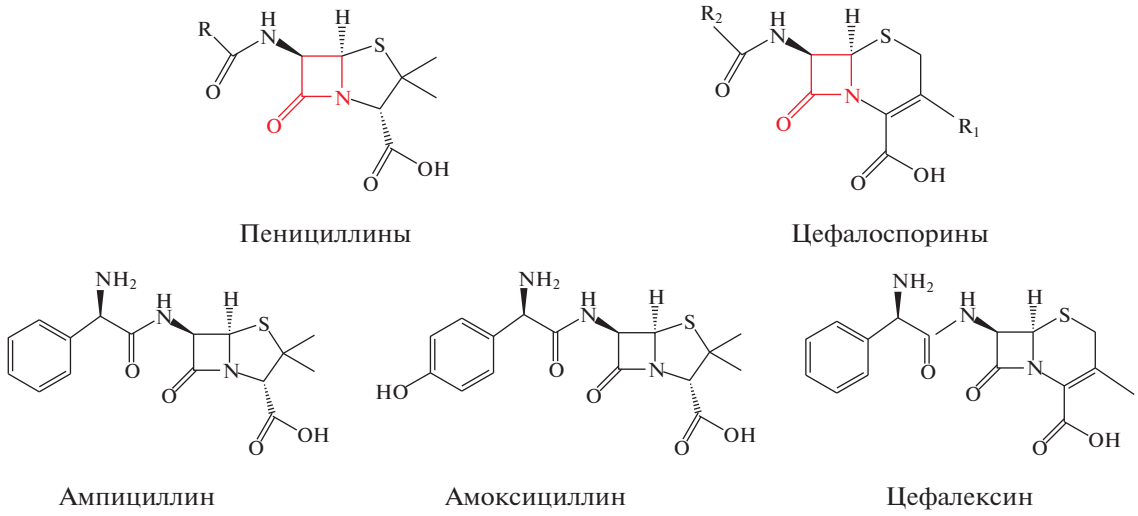


Рис. 1. Структурные формулы исследуемых бета-лактамных антибиотиков.

способности узнавать и связывать целую группу бета-лактамов, при этом взаимодействие происходит только с активными формами этих антибиотиков, имеющими цельное бета-лактамное кольцо. Тест-системы рецепторного анализа – новый и перспективный инструмент, в сравнении с иммуноанализом они характеризуется повышенной аналитической чувствительность и гораздо более широкой групповой специфичностью.

Химически модифицированные белки и производные низкомолекулярных органических биомолекул (гаптенов) представляют собой главные реагенты для создания иммуно- и рецепторно-аналитических систем. При этом высокоэффективная стратегия модификации соединений должна обеспечивать получение биологически активных и стабильных гаптен-белковых конъюгатов, отличаться простотой и воспроизводимостью. В нашей работе для получения белковых конъюгатов бета-лактамных антибиотиков были выбраны подходы к биоконъюгированию, учитывающие наличие реакционноспособных групп в исходных соединениях и необходимость сохранения структуры бета-лактамного кольца – основного сайта узнавания антибиотика рецепторным белком. При этом задействовались как аминогруппы, так и карбоксильные группы пенициллинов и цефалоспоринов – наиболее важных в практическом плане подклассов бета-лактамов.

В основе молекул аминопенициллинов лежит структура 6-аминопенициллановой кислоты, включающая конденсированные тиазолидиновый и бета-лактамный циклы (рис. 1). Аминированные цефалоспорины – производные 7-аминоцефалоспорановой и 7-аминодезацетоксицефалоспорановой кислот, содержащие конденсированные бета-лактамное и дигидротиазиновое кольца (рис. 1). Для проявления биологической активности большое значение имеют целостность и, соответственно, реакционная способность бета-лактамного цикла, который очень неустойчив в кислой и щелочной средах, а также может разрушаться в ходе химической модификации.

Из литературы неясно, как химическая природа сайта конъюгирования в молекуле бета-лактама и способ его ковалентного присоединения к белку могут влиять на поведение конъюгата антибиотика на твердой фазе и на взаимодействие с рецепторным белком в биоаналитической системе. Описаны белковые конъюгаты бета-лактамных антибиотиков, применяемые в качестве иммуногенов для получения антител, и конъюгаты с пероксидазой из корней хрена для иммуноаналитических тест-систем [13–15, 19, 20]. Эти конъюгаты синтезировали с использованием различных линкеров или безлинкерным карбодиимидным методом. Однако в литературе отсутствуют количественные характеристики присоединения антибиотиков к белку в терминах содержания гаптена в описанных конъюгатах и сведения о зависимости этого показателя от мольного соотношения реагентов, а также данные о влиянии сайта модификации молекулы антибиотика на стехиометрию конъюгирования. Не изучена в полной мере связь между аналитическими параметрами тест-систем рецепторного анализа и свойствами твердофазных белковых конъюгатов бета-лактамов.

Цель данной работы – провести комплексное сравнительное исследование способов прямого (“безлинкерного”) конъюгирования пенициллинов и цефалоспоринов с инертными белками и изучить зависимость характеристик связывания конъюгатов с пенициллин-связывающим белком от их общей структуры. Такие знания и полученные реагенты полезны в разработках высокочув-

ствительных систем микропланшетного и хроматографического рецепторного анализа с широкой групповой специфичностью в отношении бета-лактамных антибиотиков в пищевых продуктах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез белковых конъюгатов бета-лактамных антибиотиков. Для получения белковых конъюгатов бета-лактамов были выбраны методы биоконъюгирования с учетом реакционноспособных групп, присутствующих в исходных антибиотиках. При этом также учитывали, что в процессе синтеза конъюгатов не должно разрушаться бета-лактамное кольцо, выступающее основным сайтом узнавания антибиотика рецепторным белком. Целостность бета-лактамного кольца подтверждали спектрофотометрически по отсутствию пиков поглощения при 320–330 нм [21]. Наличие в исходных молекулах доступных карбокси- и аминогрупп определило выбор методик с использованием водорастворимого карбодиимида и получения активированных сложных эфиров. Эти синтетические подходы позволяют проводить реакцию образования прочной амидной связи между компонентами конъюгата в водных средах (иногда с добавлением органического растворителя), в которых многие малые биомолекулы достаточно хорошо растворимы, а белки могут сохранять свою нативную структуру. Карбодиимид (EDC), хорошо себя зарекомендовавший в безлинкерном синтезе биоконъюгатов, образует с карбоксильной группой неустойчивый в водных растворах промежуточный продукт, поэтому этот реагент часто используют в комбинации с *N*-гидроксисукцинимидом или его сульфопроизводным (sNHS) и получают эффективный в реакции *N*-ацилирования сложный эфир.

Поскольку практически все белки содержат аминогруппы, их модификация особенно часто проводится посредством активированных эфиров малых органических молекул. Все бета-лактамы характеризуются наличием карбоксильной группы, которая, однако, расположена вблизи бета-лактамного кольца. Поэтому мы выбрали такие пенициллины и цефалоспорины (ампициллин, амоксициллин и цефалексин), которые содержат также и аминогруппу в боковой цепи, что позволяет в конъюгате пространственно разделить функционально важный бета-лактамный цикл и амидную связь антибиотика с белком. Кроме того, в отличие от природного пенициллина G, синтетические аминопенициллины достаточно стабильны в водных растворах при нейтральных pH, что позволяет избежать расщепления бета-лактамного кольца в реакции конъюгирования. Из цефалоспоринов был взят цефалексин, по структуре очень близкий к аминопенициллинам, но отличающийся строением цикла, конденсированного с бета-лактамным кольцом (рис. 1).

В нашей работе белковые конъюгаты аминопенициллинов и цефалоспоринов синтезированы путем ковалентного присоединения к молекулам сывороточного альбумина человека (ЧСА) и овальбумина исследуемых бета-лактамов путем карбодиимидной конденсации с EDC и в реакции активированных эфиров с использованием комбинации EDC/sNHS. В первом случае происходит конъюгирование преимущественно по аминогруппам антибиотика, хотя возможны и реакции с участием его карбоксильных групп, а поперечная сшивка молекул белка, скорее всего, тормозится из-за конкуренции со стороны аминопроизводных бета-лактамов, имеющих более высокую подвижность в растворе. В вариантах синтеза с EDC/sNHS за счет изменения порядка добавления реагентов проводили активацию карбоксильной группы антибиотика или белка и далее ацилировали полученными активированными эфирами NH_2-группы другого компонента реакции конъюгирования. При этом мольные соотношения белок/антибиотик варьировались в диапазоне от 1 : 10 до 1 : 150.

По данным MALDI-TOF-масс-спектрометрии, количество остатков присоединенного к белкам (ЧСА и овальбумин) антибиотика изменялось от 1 до 22. Показано, что при одинаковом мольном соотношении реагентов количество присоединенных остатков бета-лактамов к ЧСА зависит от выбранной методики конъюгирования (табл. 1). При одностадийном конъюгировании с EDC наблюдалось присоединение 7, 20 и 22 остатков ампициллина к одной белковой молекуле при, соответственно, 10-, 50- и 150-кратном мольном избытке этого антибиотика. В то же время в реакции активированных эфиров при тех же соотношениях реагентов были получены другие количества присоединенного гаптена: при ацилировании аминогрупп белковой молекулы – 1, 5 и 6, а при конъюгировании по аминогруппам ампициллина – 5, 12 и 19. Видно, что при карбодиимидной конденсации в сравнении с использованием двух реагентов EDC/sNHS максимальное присоединение происходит уже при 50-кратном избытке антибиотика. При активации карбоксильных групп бета-лактама наблюдается присоединение не более 5–6 остатков гаптена даже при его большом мольном избытке, а в случае 10-кратного избытка ампициллина мы получаем конъюгат лишь с эквимольным соотношением белок–гаптен. В табл. 1 не включены конъюгаты ЧСА с цефтиофуром (К13, синтезирован по методике с EDC/sNHS), цефапирином и цефоперазоном (К14 и К15, получены с использованием EDC), которые содержали, соответственно, 5, 12 и 2 остатка антибиотика на молекулу белка.

Отметим, что при конъюгировании по аминогруппам гаптена в случае реакции активированных эфиров наблюдается последовательное и наиболее контролируемое увеличение количе-

Таблица 1. Синтезированные белковые конъюгаты бета-лактамов, использованные методы конъюгирования и содержание остатков антибиотиков в конъюгатах

Шифр конъюгата	Бета-лактам	Метод и сайт(ы) конъюгирования в антибиотике	Избыток антибиотика в реакции, моль/моль белка	Содержание остатков антибиотика в конъюгате, моль/моль белка
К1	Ампициллин	EDC (H_2N-Амп-COOH)	10	7
К2	Ампициллин	EDC (H_2N-Амп-COOH)	150	22
К3	Ампициллин	EDC/sNHS (Амп-COOH)	10	1
К4	Ампициллин	EDC/sNHS (Амп-COOH)	150	6
К5	Ампициллин	EDC/sNHS (Амп-NH_2)	10	5
К6	Ампициллин	EDC/sNHS (Амп-NH_2)	50	12
К7	Ампициллин	EDC/sNHS (Амп-NH_2)	150	19
К8	Цефалексин	EDC/sNHS (Цеф-COOH)	10	1
К9	Цефалексин	EDC/sNHS (Цеф-COOH)	10	2
К10	Цефалексин	EDC (H_2N-Цеф-COOH)	50	7
К11	Цефалексин	EDC/sNHS (Цеф-NH_2)	150	18
К12	Амоксициллин	EDC/sNHS (Амокс-NH_2)	150	12

Примечание: все конъюгаты бета-лактамов синтезированы с использованием ЧСА, кроме К8, который получен при конъюгировании с овальбумином.

ства присоединенных остатков ампициллина согласно возрастанию его мольной нагрузки в реакционной смеси.

Спектральные характеристики конъюгатов. Спектральные характеристики некоторых синтезированных конъюгатов (К6, К11 и К12) представлены на рис. 2. Интактный ЧСА характеризовался максимумом спектра поглощения при 278 нм, а овальбумин – при 279 нм. Значение коэффициента молярной экстинкции в максимуме поглощения для ЧСА составило 3.5×10^4 M^{-1} $см^{-1}$, а для овальбумина – 3.2×10^4 M^{-1} $см^{-1}$. Форма спектров поглощения конъюгатов, синтезированных с использованием различных методик (данные не представлены), была та же, что и у спектра исходного белка, но наблюдался сдвиг максимума абсорбции и гиперхромный эффект, зависящие от количества присоединенного гаптена. Так, спектры поглощения эквимольных конъюгатов имели характеристики, практически идентичные абсорбционным спектрам немодифицированных белков. В случаях присоединения более 1–2 остатков ампициллина, цефалексина или амоксицилина к белковым молекулам происходит сдвиг максимума спектра поглощения в коротковолновую область на 4–6 нм для конъюгатов с ампициллином и амоксициллином и на 6–8 нм для конъюгатов с цефалексином. В то же время дополнительные пики и плечи в полосах спектров конъюгатов отсутствуют, что указывает на сохранение интактного бета-лактамного кольца антибиотиков в составе конъюгатов. Таким образом, абсорбционная спектроскопия оказалась эффективным инструментом количественного и качественного контроля структуры белковых конъюгатов бета-лактамов, предназначенных для систем биоанализа.

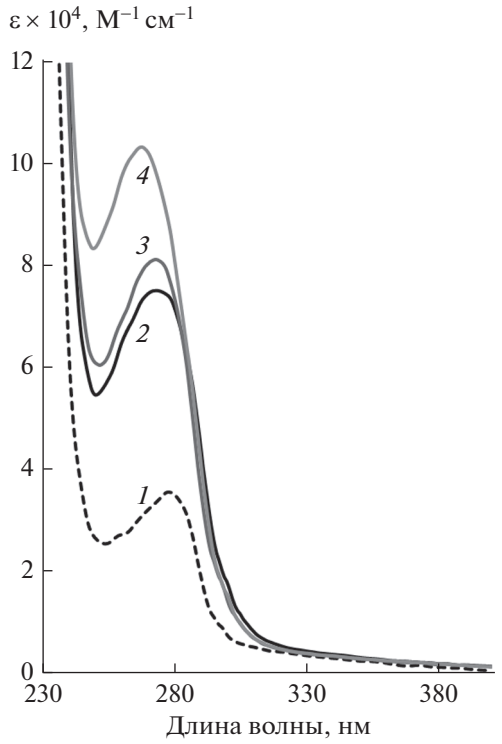


Рис. 2. Спектры поглощения синтезированных конъюгатов бета-лактамов с ЧСА: *1* – ЧСА, *2* – конъюгат ампициллина К6, *3* – конъюгат амоксициллина К12, *4* – конъюгат цефалексина К11.

Рецепторный анализ, связывание с рецепторным белком бета-лактамов и биоаналитические свойства конъюгатов. Исследовано влияние белкового конъюгирования на связывающую активность бета-лактамов по отношению к ПСБ, установле-

ны биоаналитические свойства полученных конъюгатов и разработаны конструкции модельных систем рецепторного анализа в микропланшетном варианте и на хроматографических тест-полосках.

За модель мы принимаем исследовательскую биоаналитическую систему в качестве промежуточного объекта на общепринятом этапе создания валидированной практической системы для тестирования не только стандартных, но и неизвестных проб, приготовленных из образцов пищевой продукции [22]. По сравнению с иммуноанализом, рецепторный анализ в скрининговых лабораторных исследованиях содержания бета-лактамов в различных пищевых матрицах обладает следующими преимуществами: более высокой чувствительностью, широкой групповой специфичностью, способностью выявлять реакционноспособные формы антибиотиков.

В микропланшетном варианте рецепторного анализа на твердой фазе иммобилизовали синтезированные конъюгаты бета-лактамных антибиотиков, а главным компонентом жидкой фазы был ПСБ в составе специфического комплекса с моноклональным антителом (МАт) к нему, которое выполняло только функцию биологической метки и не влияло на активность лиганд-связывающего центра рецепторного белка. В гетерофазной системе происходило распределение ПСБ между антибиотиком на твердой фазе и его конкурентом в растворе в составе "стандартов" с возрастающими концентрациями бета-лактама. Выявление связавшегося ПСБ осуществляли с помощью антивидовых антител (иммуноглобулины козы против иммуноглобулинов мыши), конъюгированных с пероксидазой из корней хрена.

Сравнение конъюгированных бета-лактамов проводили по параметрам рецепторного связывания, показателям калибровочного графика и аналитическим характеристикам тест-системы (табл. 2). При этом оценивали связывающую активность конъюгатов в отсутствие конкурирующего бета-лактама в растворе (B_0, о.е.) и параметры конкурентного ингибирования взаимодействия ПСБ с твердофазным антибиотиком возрастающими концентрациями (0.03–900 нг/мл) пенициллина G, ампициллина и цефалексина. Кроме того, определяли разницу сигнал–фон (ΔB), соотношения значений оптической плотности B_i/B_0 для стандартов, содержащих пенициллин G (0.05 нг/мл), ампициллин (0.05 нг/мл) и цефалексин (3 нг/мл), чувствительность анализа (IC_{50}, нг/мл) и повторяемость (К.В., %). Результаты исследования представлены в табл. 2.

Согласно полученным данным, эквимольные конъюгаты слабее других конъюгатов связывались с рецепторным белком, и для конъюгата с ампициллином B_0 составило лишь 0.52 о.е. В конъюгатах с ампициллином и амоксициллином при мольных соотношениях белок/гаптен, равных 1 : (5–7) (К1, К4, К5), значение B_0 составило 1.17–1.28 о.е., а при содержании 1 : 12 (К6, К12) соответствующий колориметрический сигнал был уже 1.50 о.е. При максимальных количествах конъюгированных ампициллина (К2, К7) и цефалексина (К11) с белком параметр связывания B_0 составил, соответственно, 1.97–2.12 и 1.15 о.е. Как видно из результатов, цефалексин, конъюгированный с ЧСА или овальбумином, характеризуется намного более низкими показателями связывания с рецептором по сравнению с ампициллином при одинаковых мольных долях этих бета-лактамов в конъюгатах (К2 и К11; К1, К4, К5 и К10). Это свидетельствует о меньшем сродстве данного цефалоспорина к ПСБ, что также подтверждается значениями ингибиторной активности IC_{50} при использовании цефалексина в качестве стандарта (табл. 2).

Итак, в лиганд-рецепторной системе, включающей белковый конъюгат бета-лактама и ПСБ, с ферментно-колориметрической детекцией взаимодействия оптический ответ в существенной мере зависит от природы и количества присоединенных остатков антибиотика в конъюгате. При выборе твердофазного лиганда для разработки рецепторной тест-системы для определения бета-лактамов следует учитывать тот установленный нами факт, что наибольшее связывание с ПСБ имеют конъюгаты, содержащие 12–22 остатков ампициллина или амоксициллина.

При сравнении характеристик конъюгатов с идентичным содержанием бета-лактамов (К1, К4, К5, К10; К6, К12; К2, К7, К11), но синтезированных различными способами прямого конъюгирования, мы показали, что в терминах параметров B_0, ΔB и IC_{50} они имеют схожие характеристики взаимодействия с рецептором и близкие биоаналитические свойства. Это говорит о том, что сайт в молекуле бета-лактама, через который он напрямую присоединяется к белку-носителю, не критичен для последующего взаимодействия конъюгированного антибиотика с рецепторным белком. Таким образом, бета-лактамное кольцо остается доступным для лиганд-связывающего центра ПСБ при модификации как аминогруппы на периферии молекулы, так и карбоксильной группы вблизи бета-лактамной группировки.

При сравнении биоаналитических свойств конъюгатов видно, что для всех твердофазных конъюгированных антибиотиков в рецепторной тест-системе графически рассчитанная чувствительность анализа (IC_{50}) находится в пределах 0.34–0.38 нг/мл для растворов пенициллина G в стандартах, 0.39–0.45 нг/мл для ампициллина и 50–55 нг/мл для цефалексина (табл. 2). Эти данные свидетельствуют о том, что увеличение содержания остатков антибиотика в составе конъюгата с белком незначительно влияет на положе-

Таблица 2. Биоаналитические характеристики синтезированных конъюгатов бета-лактамов

№	B_0, о.е.	Стандарт									К.В., %
		пенициллин G			ампициллин			цефалексин			
		ΔB	IC_{50}, нг/мл	$B_{0.05}/B_0$, %	ΔB	IC_{50}, нг/мл	$B_{0.05}/B_0$, %	ΔB	IC_{50}, нг/мл	B_3/B_0, %	
K1	1.28	1.12	0.38	81	1.12	0.40	90	1.10	53.0	90	3.2
K2	1.97	1.81	0.38	91	1.82	0.45	94	1.78	55.0	93	3.3
K3	0.52	0.40	0.34	79	0.41	0.39	86	0.38	52.0	85	4.1
K4	1.21	1.06	0.35	80	1.07	0.39	87	1.02	52.0	86	4.3
K5	1.17	1.01	0.35	80	1.02	0.39	87	0.98	52.0	86	2.5
K6	1.51	1.38	0.35	88	1.37	0.38	92	1.34	53.0	92	3.4
K7	2.12	1.97	0.35	89	1.98	0.42	92	1.94	55.0	94	4.3
K8	0.32	0.23	–	80	0.23	–	84	0.22	–	84	2.8
K9	0.33	0.23	–	80	0.23	–	87	0.22	–	84	3.2
K10	0.47	0.35	0.34	84	0.35	0.39	88	0.32	50.0	85	3.1
K11	1.15	1.01	0.35	85	1.01	0.41	90	0.98	51.0	93	3.1
K12	1.50	1.38	0.36	89	1.40	0.41	92	1.34	52.0	93	3.2

Примечание: прочерк – параметр IC_{50} не рассчитывали при $B_0 < 0.4$ о.е.

ние калибровочного графика относительно оси концентраций. Это свойство отличает рецепторный анализ от работы большинства иммунохимических тест-систем с использованием моно- или поликлональных антител. Так что выбрать оптимальный конъюгат для рецепторного анализа, обеспечивающий наибольший колориметрический сигнал B_0, можно не в ущерб чувствительности анализа IC_{50}. Конъюгаты K13–K15 на основе цефтиофура, цефапирина и цефоперазона проявляли активность в отношении ПСБ, и характеристики их связывания укладывались в структурно-функциональные зависимости, описанные выше.

Из синтезированных продуктов подходящими для иммуноанализа (данные не приведены) оказались белковые конъюгаты ампициллина (K3) и цефалексина (K8, K9), что будет предметом последующих публикаций.

Для оценки групповой специфичности анализа бета-лактамов в модельных рецепторно-ферментных тест-системах микропланшетной конструкции использовали конъюгаты ампициллина (K7), цефалексина (K11) и калибраторы – растворы с точными концентрациями индивидуальных антибиотиков группы бета-лактамов, наиболее часто применяемых в клинической практике и ветеринарии. Результаты исследования представлены в табл. 3. Установлено, что связывающая активность бета-лактамных лигандов по отношению к рецепторному белку уменьшается в следующем ряду: пенициллин G > ампициллин > амоксициллин > цефоперазон > цефапирин > цефтиофур > > цефалексин. Показано также, что специфичность анализа не зависит от природы (пенициллин или цефалоспорин) твердофазного лиганда. Калибровочные графики, полученные для исследуемых бета-лактамов, характеризовались IC_{50} в диапазоне 0.35–0.46 нг/мл для пенициллинов и 0.72–55 нг/мл для цефалоспоринов, а перекрестная реактивность относительно пенициллина G составила 82.6–86.4% для пенициллинов и 0.7–48.6% для цефалоспоринов. Индивидуальные рабочие диапазоны достоверно определяемых концентраций различных бета-лактамов находились в широких пределах: 0.05–8.0 нг/мл для пенициллинов и 0.05–600 нг/мл для цефалоспоринов.

Сравнивая работу в рецепторно-ферментных системах конъюгатов K2 и K7 с практически одинаковым высоким содержанием ампициллина, присоединенного через его аминогруппу, мы обнаружили, что в случае двухэтапной методики синтеза (K7) конъюгат имеет несколько лучшие биоаналитические характеристики (B_0 и IC_{50}). Поэтому конъюгат K7 признан оптимальным лигандом для микропланшетной твердой фазы, и в последующей работе его использовали для иммобилизации на нитроцеллюлозной мембране хроматографических тест-полосок.

Расширяя сделанную нами ранее формулировку, отметим, что аналитические характеристики системы гетерофазного рецепторно-ферментного анализа, включающей белковый конъюгат бета-лактама на твердой фазе, в значительной степени определяются содержанием и природой антибиотика в конъюгате и в меньшей мере зависят от сайта присоединения в гаптене, а также способа прямого конъюгирования.

В результате экспериментов по оптимизации условий лиганд-рецепторного взаимодействия в микропланшетной системе (концентрации конъюгата K7 на твердой фазе, ПСБ и ампициллина в растворе, pH и ионная сила среды, температура)

Таблица 3. Характеристики специфичности и диапазоны определяемых концентраций бета-лактамов в рецепторно-ферментном анализе с использованием твердофазных конъюгатов ампициллина и цефалексина

Твердофазный конъюгат	Стандарт	IC_{50}, нг/мл	Перекрестная реактивность, %	К.В., %	Диапазон концентраций, нг/мл
Ампициллин–альбумин (К7)	Пенициллин G	0.38	100.0	3.6	0.05–4.0
	Ампициллин	0.44	86.4	3.7	0.05–8.0
	Амоксициллин	0.46	82.6	3.8	0.05–8.0
	Цефалексин	55.0	0.7	5.1	3.0–600.0
	Цефоперазон	0.80	47.5	4.2	0.05–8.0
	Цефтиофур	4.0	9.5	4.0	0.3–100.0
	Цефапирин	1.1	34.5	4.0	0.05–30.0
Цефалексин–альбумин (К11)	Пенициллин G	0.35	100	3.8	0.05–4.0
	Ампициллин	0.41	85.4	3.7	0.05–8.0
	Амоксициллин	0.42	83.3	3.7	0.05–8.0
	Цефалексин	51.0	0.7	5.2	3.0–600.0
	Цефоперазон	0.72	48.6	4.3	0.05–8.0
	Цефтиофур	3.5	10.0	4.1	0.3–100.0
	Цефапирин	0.80	43.7	3.8	0.05–30.0

получены аналитические характеристики, которые выражаются калибровочной кривой, представленной на рис. 3. Рабочий диапазон анализа составляет 0.05–8.0 нг/мл при IC_{50} = 0.42 ± ± 0.05 нг/мл (n = 5) и аналитической чувствительности 0.05 нг/мл в отношении ампициллина, что превышает показатели, представленные в литературе [13, 14, 19]. Так, иммуносенсор для флуоресцентного анализа бета-лактамных антибиотиков в работе Benito-Peña et al. [13] характеризовался следующими параметрами: IC_{50} = = 30 нг/мл и предел детекции 2.4 нг/мл при динамическом диапазоне анализа 6–191 нг/мл. Предел детекции ампициллина в буферном растворе в биосенсоре с использованием МАт, представленном в работе Cliquet et al. [14], не превышал 46 нг/мл. Разработанная Zeng et al. [19] тест-система для определения бета-лактамов с использованием ПСБ (рекомбинантного аналога природного рецептора PBP 2x из *Streptococcus pneumoniae* R6) позволяет определять ампициллин и пенициллин G в диапазоне 1–16 нг/мл и характеризуется пределом детекции для этих бета-лактамов 0.75 и 1.22 нг/мл соответственно.

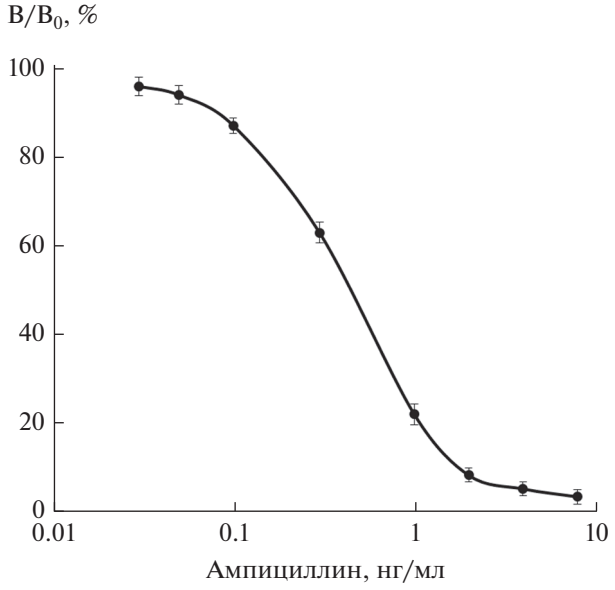


Рис. 3. Зависимость связывания ПСБ с твердофазным конъюгатом ампициллина К7 от концентрации свободного ампициллина в жидкой фазе модельной системы рецепторно-ферментного анализа.

Разработанная в данной работе конструкция тест-системы с высокими показателями чувствительности может стать прототипом набора реагентов для рецепторно-ферментного анализа бета-лактамов в пищевой продукции животного происхождения.

Рецепторно-хроматографический анализ. В настоящее время широкое применение получили экспресс-методы детекции малых биомолекул и белковых маркеров на хроматографических тест-полосках благодаря быстроте и простоте выполнения, высокой производительности и возможности проведения анализа вне лаборатории без сложного оборудования. Такой анализ – эффективный инструмент качественного и количественного определения антибиотиков в продуктах [4, 23].

Нами исследовано взаимодействие синтезированного белкового конъюгата ампициллина, свободных бета-лактамов и ПСБ в разработанной рецепторно-хроматографической системе на тест-

Таблица 4. Пределы обнаружения бета-лактамов на тест-полосках модельного рецепторно-хроматографического анализа

Антибиотик	Максимально допустимый уровень, нг/мл		Предел обнаружения, нг/мл
	молоко	мясо	
Пенициллин G	4	50	1
Ампициллин	4	50	2
Амоксициллин	4	50	2
Цефоперазон	50	–	4
Цефалексин	100	200	200

полоске, которая представляет собой мультимембранный композит. На рабочей нитроцеллюлозной мембране в аналитической зоне иммобилизовали конъюгат ампициллина K7, показавший наилучшие результаты в микропланшетной системе, а контрольную зону формировали адсорбцией антивидовых антител (иммуноглобулины козы против иммуноглобулинов мыши). В подвижной фазе детектирующим реагентом был ПСБ, иммунохимически иммобилизованный через МАт мыши к ПСБ, адсорбированное на золотых наночастицах, которые, в свою очередь, служили колориметрической меткой. В ходе анализа тест-полоску мембраной для образца погружали в раствор, содержащий детектирующий комплекс и исследуемые стандартные пробы с возрастающими концентрациями бета-лактамов (пенициллин G, ампициллин, амоксициллин или цефалексин). При движении раствора вдоль полоски к впитывающей верхней мембране происходило взаимодействие твердофазного конъюгата K7 с меченым ПСБ в аналитической зоне, а затем протекало связывание в контрольной зоне адсорбированных антивидовых антител с МАт в составе детектирующего комплекса. Аналитический процесс состоит из одной стадии и занимает 10 мин. Оценка результатов заключается в визуальном контроле наличия или отсутствия окрашивания в аналитической и контрольной зонах тест-полоски (рис. 4).

Различные бета-лактамные антибиотики в качестве конкурентных ингибиторов связывания

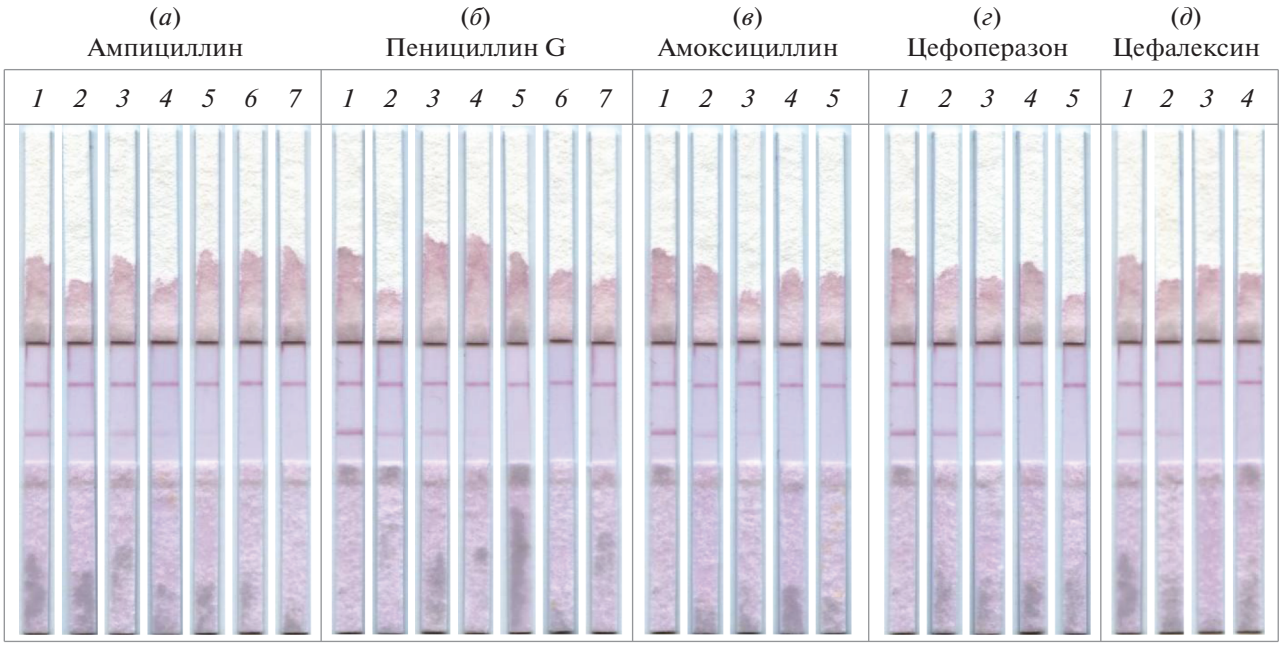


Рис. 4. Взаимодействия меченного золотыми наночастицами комплекса МАт–ПСБ с конъюгатом ампициллина K7 в аналитической зоне и антивидовыми антителами в контрольной зоне тест-полоски при возрастающих концентрациях бета-лактамов в подвижной фазе модельной системы рецепторно-хроматографического анализа: (*а*) – ампициллин в концентрации 0 (*1*), 0.25 (*2*), 0.5 (*3*), 1.0 (*4*), 2.0 (*5*), 3.0 (*6*) и 5.0 нг/мл (*7*); (*б*) – пенициллин G в концентрации 0 (*1*), 0.25 (*2*), 0.5 (*3*), 1.0 (*4*), 2.0 (*5*), 3.0 (*6*) и 5.0 нг/мл (*7*); (*в*) – амоксициллин в концентрации 0 (*1*), 0.5 (*2*), 1.0 (*3*), 2.0 (*4*) и 5.0 нг/мл (*5*); (*г*) – цефоперазон в концентрации 0 (*1*), 1.0 (*2*), 2.0 (*3*), 4.0 (*4*) и 8.0 нг/мл (*5*); (*д*) – цефалексин в концентрации 0 (*1*), 100 (*2*), 200 (*3*) и 400 нг/мл (*4*).

K7 с меченым ПСБ в стандартных растворах с концентрациями 0.25–5.0 нг/мл для пенициллинов и 1–400 нг/мл для цефалоспоринов снижали интенсивность окраски аналитической полосы, что позволило оценить пределы их обнаружения (табл. 4). Показано, что порог визуальной детекции ампициллина, пенициллина G и амоксициллина составляет 1–2 нг/мл, если не рассматривать на данном этапе влияние пищевого матрикса на результаты определений. Так, разработанная рецепторно-хроматографическая система позволяет выявлять перечисленные бета-лактамы в концентрациях даже ниже значений максимально допустимого уровня (МДУ) этих ветеринарных субстанций в продуктах питания [24, 25].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и материалы. В экспериментальной работе использовали 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид (EDC), *N*-гидроксисульфосукцинимид (sNHS), 2-(*N*-морфолино)этансульфоновую кислоту (MES), бычий сывороточный альбумин (BSA), 30%-ный водный раствор H_2O_2, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ), тимеросаль (Sigma-Aldrich, США); колонки Zeba для хроматографии под действием гравитационных сил для обессоливания (Thermo Fisher Scientific, США); диметилсульфоксид (Applichem, Германия); хлорид натрия, Tween-20, кислоту лимонную моногидрат (Merck, Германия); сахарозу (Riedel-de-Haën, Германия); колонки с Sephadex G-25 (GE Healthcare, США). Реактивы отечественных и российских производителей: натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный, натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный, гидроокись натрия, соляная кислота, серная кислота, глицерин – имели классификацию не ниже ч.д.а. ЧСА (5%-ный раствор) предоставлен РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий (Беларусь), антитела козы против иммуноглобулинов мыши получены от УП "ХОП ИБОХ" НАН Беларуси (Беларусь). Конъюгат этих антител с высокоочищенной (Rz ≥ 3.0) пероксидазой из корней хрена (Диаэм, Россия) синтезировали путем окисления углеводных цепей фермента периодатом натрия, присоединения иммуноглобулина с образованием основания Шиффа и стабилизацией конъюгата восстановлением двойной связи борогидридом натрия. Сухие порошки высокоочищенных антибиотиков: пенициллин G, ампициллин, амоксициллин, цефалексин, цефоперазон, цефтиофур, цефапирин – куплены у Sigma-Aldrich, США. ПСБ (рекомбинантный аналог природного рецептора PBP 2x из *Streptococcus pneumoniae* R6) и моноклональные антитела к нему приобретены у Glory Sciences Co., Ltd, КНР (www.glorybios.com).

Для приготовления всех растворов использовали деионизированную воду с удельным электрическим сопротивлением 17–18 МОм см, полученную в модульной системе очистки воды Arium® pro VF (Sartorius, Германия).

При проведении рецепторно-ферментного анализа в качестве твердофазных носителей использовали разборные полистирольные 96-луночные микропланшеты (ООО "Хема-медика", Россия). Системы хроматографического анализа на тест-полосках конструировали с применением комплекта мембран из набора MDI Easypack (Advanced Microdevices, Индия).

Получение белковых конъюгатов бета-лактамов. В трех описанных ниже методиках конъюгаты бета-лактамов с белками синтезировали в присутствии EDC в одну стадию или с использованием EDC/sNHS в две стадии в вариантах первоначальной активации карбоксилов антибиотика или белка и, соответственно, присоединения бета-лактама через карбоксильную или аминогруппу. В качестве белка-носителя применяли ЧСА в случаях ампициллина и амоксициллина или же ЧСА и овальбумин в случае цефалексина.

Реакция карбодиимидной конденсации в присутствии EDC. Препарат ЧСА растворяли в 0.01 M MES (pH 6.0) с 0.15 M NaCl. К растворам, содержащим 15 мг (225 нмоль), 3 мг (45 нмоль) или 1 мг (15 нмоль) ЧСА, добавляли 0.7 мг (3.7 мкмоль) EDC и 0.8 мг (2.3 мкмоль) ампициллина в 0.01 M MES (pH 6.0), что соответствовало 10-, 50- или 150-кратному мольному избытку антибиотика по отношению к белку. Реакцию конъюгирования проводили в течение 18 ч при 4°C.

Биоконъюгация путем активирования карбоксильных групп антибиотика с использованием EDC/sNHS. Препарат ЧСА растворяли в 0.1 M натрий-фосфатном буфере (PBS), pH 7.4, с 0.15 M NaCl. Препараты антибиотиков растворяли в 0.01 M MES (pH 6.0) с 0.15 M NaCl. К трем растворам антибиотика, содержащим по 0.8 мг (2.3 мкмоль) ампициллина, добавляли 0.8 мг (3.7 мкмоль) sNHS и 0.7 мг (3.7 мкмоль) EDC, инкубировали 15–20 мин при 25°C. Далее вносили растворы белка, содержащие 15 мг (225 нмоль), 3 мг (45 нмоль) или 1 мг (15 нмоль) ЧСА, что соответствовало 10-, 50- или 150-кратному мольному избытку антибиотика в реакционной смеси. Реакцию конъюгирования проводили в течение 18 ч при 4°C.

Конъюгирование за счет карбоксильных групп белка, активированных EDC/sNHS. Препарат ЧСА растворяли в 0.01 M MES (pH 6.0) с 0.15 M NaCl. К растворам, содержащим 15 мг (225 нмоль), 3 мг (45 нмоль) или 1 мг (15 нмоль) ЧСА, добавляли 0.8 мг (3.7 мкмоль) sNHS и 0.7 мг (3.7 мкмоль) EDC, инкубировали 15–20 мин при 25°C. Далее к растворам белка добавляли 0.8 мг (2.3 мкмоль) ампициллина в 0.1 M PBS (pH 7.0) с 0.15 M NaCl,

что соответствовало 10-, 50- или 150-кратному мольному избытку антибиотика по отношению к белку. Реакцию конъюгирования проводили в течение 18 ч при 4°C.

С применением аналогичных подходов были приготовлены конъюгаты цефалексина с ЧСА и овальбумином (10-, 50-, 150-кратный мольный избыток антибиотика в реакциях). Конъюгат амоксициллина с ЧСА синтезировали через NH_2-группу антибиотика с использованием его 150-кратного мольного избытка.

Очистку всех полученных конъюгатов проводили хроматографией под действием гравитационных сил с использованием колонок Zeba, уравновешенных 0.02 M PBS (pH 7.2), содержащим 0.15 M NaCl. Очищенные конъюгаты разбавляли в 2 раза глицерином и хранили при –20°C.

Спектральные измерения. Спектры поглощения растворов антибиотиков и синтезированных конъюгатов измеряли в кювете с длиной оптического пути 1 см с использованием спектрофотометра Tecan Infiniti M200 (Австрия).

Масс-спектры. Масс-спектры MALDI-TOF регистрировали на приборе Microflex LRF (Bruker, Германия). Изменение молекулярной массы (M) белков при конъюгировании ΔM, выраженное в Да, определяли как разницу в молекулярных массах конъюгата и немодифицированного белка. Степень конъюгирования (1 моль антибиотика на 1 моль белка) рассчитывали как ΔM/M (антибиотика).

Биоспецифическое связывание и конкурентное ингибирование взаимодействий в рецепторно-ферментных системах. В лунках микропланшета иммобилизовали белковые конъюгаты антибиотиков из 100 мкл раствора с концентрацией 0.1 мкг/мл путем инкубации при 4–8°C в течение 18 ч. Стабилизацию проводили путем внесения во все лунки по 150 мкл 0.05 M PBS (pH 7.4), содержащего 0.15 M NaCl, 0.05% Tween-20, 1 мг/мл BSA, 2% сахарозы, 0.01% эуксил K-100, и выдерживания планшета при 4–8°C в течение 18 ч. Исходные растворы исследуемых антибиотиков в концентрации 4 мг/мл готовили в 0.01 M PBS (pH 7.2), 0.15 M NaCl. Стандарты (калибровочные растворы) готовили в том же буфере в концентрации 0, 0.03–8.0 нг/мл для пенициллина G, амоксициллина, ампициллина, цефоперазона; 0, 0.05–100.0 нг/мл для цефтиофура и цефапирина; 1–900 нг/мл для цефалексина.

При проведении анализа в лунки вносили по 50 мкл калибровочных растворов с антибиотиком в возрастающих концентрациях и по 50 мкл предварительно приготовленной смеси, содержащей ПСБ и МАт к нему в концентрациях 0.05 и 0.1 мкг/мл соответственно. Инкубацию системы в планшете проводили при 25°C в течение 30 мин. Далее удаляли непрореагировавшие компоненты и промывали планшет с использованием промывочного раствора (0.01 M PBS, pH 7.2, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween-20). На второй стадии вносили в лунки по 100 мкл раствора конъюгата антивидовых антител (иммуноглобулины козы против иммуноглобулинов мыши) с пероксидазой хрена в титре 1 : 25000. После инкубации при 25°C в течение 15 мин содержимое лунок удаляли и промывали планшет, как описано выше. В лунки вносили по 100 мкл хромоген-субстратного раствора, содержащего ТМБ и перекись водорода (0.1 M натрий-цитратный буфер, pH 4.2, 3 мМ H_2O_2 и 1 мМ ТМБ), и инкубировали 15 мин при 20–25°C. Ферментативную реакцию останавливали добавлением в лунки по 100 мкл 5%-ной H_2SO_4.

Измеряли оптическую плотность при 450 нм ($ОП_{450}$) в планшетном спектрофотометре Tecan Infinity M200 (Австрия) и рассчитывали соотношение B_i/B_0 (%), где B_0 – оптическая плотность в отсутствие бета-лактама в растворе, B_i – оптическая плотность в присутствии возрастающих концентраций антибиотика в растворе. Калибровочные графики зависимости конкурентного связывания от концентраций бета-лактама в калибровочных пробах строили в координатах: B_i/B_0 (%, ось ординат – линейная) и концентрация (нг/мл, ось абсцисс – логарифмическая).

Общую чувствительность метода оценивали по графически определенной величине IC_{50}, что соответствует концентрации антибиотика в растворе, вызывающей 50%-ное ингибирование связывания рецептора с твердофазным лигандом (уменьшение B_0 вдвое). Аналитическую чувствительность (предел обнаружения, минимальную достоверно измеряемую концентрацию) получали из калибровочного графика как абциссу точки $B_0 - 2$ SD, где SD – среднеквадратичное отклонение. Перекрестную реактивность (ПР) рассчитывали по формуле: ПР (%) = IC_{50} (пенициллин G)/IC_{50} (другой антибиотик) × 100.

Рецепторно-хроматографический анализ на тест-полосках. Нанесение реагентов на нитроцеллюлозную мембрану проводили с помощью автоматического диспенсера IsoFlow (Imagene Technology, США). Аналитическую зону тест-полоски формировали путем нанесения конъюгата ампициллина K7 из раствора с концентрацией 0.5 мг/мл, а в контрольной зоне иммобилизовали антивидовые антитела (иммуноглобулины козы против иммуноглобулинов мыши) из раствора с концентрацией 0.25 мг/мл. Функционализированные мембраны высушивали на воздухе при 20–22°C не менее 20 ч и вместе с подложкой для исследуемой пробы и впитывающей мембраной собирали в мультимембранный композит. Тест-полоски нарезали шириной 3.5 мм с помощью автоматического гильотинного нарезчика Index-Cutter 1 (A-PointTechnologies, США).

Наночастицы золота получали восстановлением золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия по методу Френса, как описано в работе Byzova et al. [26]. Полученные наночастицы в выбранной на основании фотометрических данных концентрации 10 мкг/мл адсорбционно конъюгировали с МАт к ПСБ. Для проведения модельного рецепторно-хроматографического анализа бета-лактамов в лунки инертного пластмассового микропланшета вносили меченный наночастицами золота комплекс МАт–ПСБ и добавляли бета-лактам (ампициллин, пенициллин G, амоксициллин, цефоперазон или цефалексин) в возрастающих концентрациях в диапазоне 0.25–400 нг/мл. Далее реагенты выдерживали в течение 3–5 мин и в лунку помещали подготовленные тест-полоски. Хроматографию проводили в течение 10 мин и визуально регистрировали окрашивание в аналитической и контрольной зонах.

Все эксперименты по лиганд-рецепторному связыванию проводили не менее чем в трех повторах. Обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Excel. На калибровочном графике (рис. 3) планки погрешностей обозначают среднеквадратичное отклонение SD.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполненного исследования охарактеризованы методики прямого конъюгирования пенициллинов и цефалоспоринов с белковыми макромолекулами (ЧСА и овальбумина) для технологий рецепторного анализа. Установлено влияние модификаций пенициллинов и цефалоспоринов в области бета-лактамного кольца и в боковой цепи на связывание с белком-рецептором, определены спектральные характеристики синтезированных белковых конъюгатов бета-лактамов. Предложены оптимальные условия биоконъюгирования белков с этими субстанциями без предварительного введения линкерных (спейсерных) групп в структуры антибиотиков. Установлено оптимальное мольное соотношение антибиотика и белка-носителя в синтезированном конъюгате для его эффективного взаимодействия с ПСБ. В модельных системах лиганд-рецепторного связывания исследованы биоаналитические свойства полученных конъюгатов. Разработаны конструкции тест-систем для рецепторного анализа бета-лактамных антибиотиков в микропланшетном варианте и в виде хроматографических тест-полосок, характеризующиеся широкой групповой специфичностью и высокой аналитической чувствительностью в отношении пенициллинов и цефалоспоринов.

В ближайшей перспективе описанная в данной работе модельная рецепторно-хроматографическая тест-система для выявления бета-лактамов может стать практическим аналитическим средством экспресс-контроля биобезопасности продуктов питания.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено по теме задания 2.3.1 государственной программы научных исследований “Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биооргхимия”, финансируемого Национальной академией наук Беларуси.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sachi S., Ferdous J., Sikder M.H., Azizul Karim Hussani S.M.* // J. Adv. Vet. Anim. Res. 2019. V. 6. P. 315–332. https://doi.org/10.5455/javar.2019.f350
2. *Landers T.F., Cohen B., Wittum T.E., Larson E.L.* // Public Health Rep. 2012. V. 127. P. 4–22. https://doi.org/10.1177/003335491212700103
3. *Kantiani L., Farre M., Barcelo D.* // Trends Anal. Chem. 2009. V. 28. P. 729–744. https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.04.005
4. *Dzantiev B.B., Byzova N.A., Urusov A.E., Zherdev A.V.* // Trends Anal. Chem. 2014. V. 55. P. 81–93. https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.11.007
5. *Zhang J., Wang Z., Wen K., Liang X., Shen J.* // Anal. Biochem. 2013. V. 442. P. 158–165. https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.07.042
6. *Merola G., Martini E., Tomassetti M., Campanella L.* // J. Pharm. Biomed. Anal. 2014. V. 106. P. 186–196. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.08.005
7. *Abdulla A., Bahmany S., Wijma R.A., van der Nagel B.C.H., Koch B.C.P.* // J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 2017. V. 1060. P. 138–143. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.06.014
8. *Briscoe S.E., McWhinney B.C., Lipman J., Roberts J.A., Ungerer J.P.J.* // J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 2012. V. 907. P. 178–184. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.09.016
9. *Rawson T.M., Sharma S., Georgiou P., Holmes A., Cass A., O’Hare D.* // Electrochem. Commun. 2016. V. 82. P. 1–5. https://doi.org/10.1016/j.elecom.2017.07.011
10. *Merola G., Martini E., Tomassetti M., Campanella L.* // Sens. Actuators B Chem. 2014. V. 199. P. 301–313. https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.03.083
11. *Hrioua A., Loudiki A., Farahi A., Bakasse M., Lahrich S., Saqrane S., Mhammedi M.A.El.* // Bioelectrochemistry.

2021. V. 137. P. 107687.
https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107687
12. *Бызова Н.А., Зверева Е.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. С. 685–693. [*Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2011. V. 47. P. 627–634.]
https://doi.org/10.1134/S0003683811060032
13. *Benito-Peña E., Moreno-Bondi M.C., Orellana G., Maquieira Á., van Amerongen A.* // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. P. 6635–6642.
https://doi.org/10.1021/jf0511502
14. *Cliquet P., Goddeeris B.M., Bonroy K., Cox E.* // Food Agric. Immunol. 2005. V. 16. P. 101–115.
https://doi.org/10.1080/09540100500139239
15. *Cliquet P., Cox E., Van Dorpe C., Schacht E., Goddeeris B.M.* // J. Agric. Food Chem. 2001. V. 49. P. 3349–3355.
https://doi.org/10.1021/jf001428k
16. *Macheboeuf P., Contreras-Martel C., Job V., Dideberg O., Dessen A.* // FEMS Microbiol. Rev. 2006. V. 30. P. 673–691.
https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00024.x
17. *Sauvage E., Kerff F., Terrak M., Ayala J.A., Charlier P.* // FEMS Microbiol. Rev. 2008. V. 32. P. 234–258.
https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x
18. *Mbah A.N., Isokpehi R.D.* // Chemother. Res. Pract. 2013. V. 2013. Article ID 614670.
https://doi.org/10.1155/2013/614670
19. *Zeng K., Zhang J., Wang Y., Wang Z.H., Zhang S.X., Chong Ming W.U.* // Biomed. Environ. Sci. 2013. V. 26. P. 100–109.
https://doi.org/10.3967/0895-3988.2013.02.004
20. *Peng J., Cheng G., Huang L., Wang Y., Hao H., Peng D.* // Anal. Bioanal. Chem. 2013. V. 405. P. 8925–8933.
https://doi.org/10.1007/s00216-013-7311-5
21. *Komova N.S., Berlina A.N., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.* // Orient. J. Chem. 2020. V. 36. P. 21–25.
https://doi.org/10.13005/ojc/360103
22. *Вашкевич И.И., Ястребова А.А., Куприенко О.С., Серченя Т.С., Иванько М.В., Шкиндерова В.О., Пыжик И.П., Смоляк Т.М., Мелещеня А.В., Свиридов О.В.* // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. 2020. Т. 56. № 3. С. 318–332.
https://doi.org/10.29235/1561-8331-2020-56-3-318-332
23. *Chen W., Huang Z., Hu S., Peng J., Liu D., Xiong Y., Xu H., Wei H., Weihua L.* // J. Dairy Sci. 2019. V. 102. P. 1887–1900.
https://doi.org/10.3168/jds.2018-15462
24. Перечень ветеринарных лекарственных средств (фармакологически активных веществ), максимально допустимые уровни остатков которых могут содержаться в непереработанной пищевой продукции животного происхождения, в том числе в сырье, и методик их определения // Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 13.02.2018 г. № 28. http://pravo.by/document/?guid=3871&p0=F91800044
25. European Commission. Commission Regulation (EU) No. 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin // Official Journal of the European Union. 2010. L 15/1.
https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf
26. *Byzova N.A., Smirnova N.I., Zherdev A.V., Eremin S.A., Shanin I.A., Lei H.T., Sun Y., Dzantiev B.B.* // Talanta. 2013. V. 119. P. 125–132.
https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.10.054

Direct Conjugation of Penicillins and Cephalosporins with Proteins for Receptor Assays of Beta-Lactam Antibiotics

T. S. Serchenya*, #, I. V. Harbachova*, and O. V. Sviridov*

#Phone: +375 (17) 300-57-07; e-mail: serchenya@iboch.by

**Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, ul. Kuprevicha 5/2, Minsk, 220141 Belarus*

Fifteen protein conjugates of penicillins and cephalosporins containing amino- and/or carboxylic groups in the initial structures have been synthesized in the reactions with human serum albumin or ovalbumin using 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC) or a combination of EDC and *N*-hydroxysulfosuccinimide at various relationships of the basic reagents. A comparative study of conjugates composition and properties have been carried out by UV spectroscopy, mass-spectrometry and a ligand-receptor assay. It was shown that the antibiotic residues content of the obtained macromolecules varied from 1 to 22, the beta-lactam cycle remained intact assuring specific interactions of the conjugates with a penicillin-binding protein. In two developed models of receptor bioanalytic systems, an ampicillin conjugate onto a solid phase binds to penicillin-binding protein complexed with a monoclonal antibody which was detected by an immunoenzyme label in microplate wells or gold nanoparticles on test strips. Conjugated ampicillin binding to the receptor was competitively inhibited by beta-lactam antibiotics added to the liquid phase, and analytical sensitivities relative to penicillin G were 0.05 and 1 ng/mL for microplate and receptor chromatographic systems, respectively.

Keywords: hapten-protein conjugates, beta-lactams, receptor assay, antibiotics

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2022, том 48, № 1, с. 75–86

УДК 577.182.22:57.083.3

КОНЪЮГАТЫ АМИНОПЕНИЦИЛЛИНОВ С БЕЛКАМИ: СИНТЕЗ, ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА, СВЯЗЫВАНИЕ С РЕЦЕПТОРОМ БЕТА-ЛАКТАМОВ И АНТИТЕЛАМИ

© 2022 г. О. С. Куприенко*, #, Т. С. Серченя*, И. И. Вашкевич*, И. В. Горбачева*, А. И. Зильберман*, О. В. Свиридов*

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

Поступила в редакцию 24.05.2021 г.
После доработки 29.06.2021 г.
Принята к публикации 11.07.2021 г.

Предложен новый подход к модификации аминопенициллинов и получению их конъюгатов с белками с использованием ди-*N*-гидроксисукцинимидных эфиров дикарбоновых кислот в качестве кросс-линкеров. Ацилирование ампициллина (Amp) и амоксицилина (Amox) ди-*N*-гидроксисукцинимидными эфирами адипиновой или терефталевой кислоты проводили в диметилформамиде. Последующее конъюгирование полученных производных аминопенициллинов с белками протекало в водной среде при pH 8.3, в результате чего синтезированы иммуногенные и ферментные конъюгаты Amp и Amox. Показано, что в результате химических модификаций Amp и в ходе синтеза линкерных конъюгатов не происходит разрушение бета-лактамного цикла антибиотика. В ходе длительной иммунизации кроликов иммуногенным конъюгатом Amp с тироглобулином, содержащим ароматический линкер, получены поликлональные антитела, способные с очень высокой чувствительностью связывать Amp, Amox и пенициллин G. Конъюгаты аминопенициллинов с пероксидазой из корней хрена охарактеризованы в конкурентном белок-связывающем (рецепторном) анализе, а также в системе прямого конкурентного иммуноферментного анализа (ELISA). Из исследованных модельных иммуноаналитических систем наилучшими характеристиками в отношении определения Amp обладала система гетерологичного прямого ELISA с использованием полученных поликлональных антител и синтезированного конъюгата Amp с пероксидазой, в котором в качестве линкера использован фрагмент адипиновой кислоты: аналитическая чувствительность составила 0.03 нг/мл, IC_{50} = 0.20 нг/мл.

Ключевые слова: пенициллины, бета-лактамные антибиотики, гаптен-белковые конъюгаты, рецепторный анализ, иммуноферментный анализ

DOI: 10.31857/S0132342322010067

ВВЕДЕНИЕ

Пенициллины, относящиеся к группе бета-лактамных антибиотиков, широко используются в ветеринарной практике. Остаточные количества этих соединений могут присутствовать в продукции животного происхождения и поступать в организм человека, нанося существенный вред здоровью. Они могут спровоцировать серьезные аллергические реакции, привести к изменению микрофлоры кишечника, а также служить причиной возникновения резистентных штаммов микроорганизмов [1]. В Евразийском экономическом союзе и Евросоюзе установлены максимально допустимые уровни остатков бета-лактамов в непереработанной пищевой продукции животного происхождения. В частности, для пенициллина G, ампициллина (Amp) и амоксициллина (Amox) они составляют 4 мкг/кг в молоке и 50 мкг/кг в мясе [2, 3].

Для обеспечения биобезопасности продуктов питания предложены различные методы определения пенициллинов. Один из них – жидкостная хроматография с масс-селективной детекцией [4–6] – метод дорогостоящий, трудоемкий и длительный из-за сложной и продолжительной подготовки образцов перед анализом. Альтернативой

Сокращения: Amp – ампициллин; Amox – амоксициллин; BSA – бычий сывороточный альбумин; CR – перекрестная реактивность; DMF – диметилформамид; EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид; ELISA – иммуноферментный анализ; HRP – пероксидаза из корней хрена; HSA – сывороточный альбумин человека; rhLF – рекомбинантный лактоферрин человека; NHS – *N*-гидроксисукцинимид; sNHS – *N*-гидроксисульфосукцинимид; PBP – пенициллин-связывающий белок; PBS – натрий-фосфатный буфер; TG – тироглобулин; TMB – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин.

Автор для связи: (тел.: +375 (17) 395-92-75; эл. почта: kuprienko@iboch.by).

ему выступают быстрые и относительно недорогие иммунохимические методы. Для их разработки и применения необходимы белковые реагенты (рецепторы или антитела), способные к высокочувствительному связыванию пенициллинов, а также высокомолекулярные производные этих антибиотиков как гаптенов – ферментные конъюгаты, иммуногены и конъюгированные антигены.

Белки, обладающие высоким специфическим сродством к пенициллинам, можно разделить на два вида. Первый – это пенициллин-связывающие белки (PBP), выполняющие у бактерий строительную и защитную функцию, такие как высокомолекулярная мембранная транспептидаза PBP2x из *Streptococcus pneumonia* R6 [7] и карбоксиконцевой фрагмент трансмембранного бета-лактамного рецептора BlaR-CTD из *Bacillus licheniformis* [8]. Эти белки распознают структуру антибиотика, включающую бета-лактамный цикл, и связывают различные бета-лактамы, относящиеся не только к пенициллинам, но и к цефалоспоринам. Такая широкая специфичность бактериальных PBP – главное преимущество при использовании в рецепторно-аналитических системах, однако она же и ограничивает их применение, поскольку максимально допустимые уровни пенициллинов и цефалоспоринов в продуктах питания существенно различаются [2, 3].

Другой вид белков, способных связывать пенициллины, представлен специфическими антителами к ним. Описано получение как поликлональных [9–13], так и моноклональных антител [14–16] к пенициллинам. Также получены антитела, которые распознают расщепленные гидролизом бета-лактамные антибиотики [13, 17]. Лишь в единичных случаях чувствительность к пенициллинам систем иммуноферментного анализа (ELISA), в которые включены упомянутые антитела, составляет ~1 нг/мл [10, 13, 16]. С учетом максимальных допустимых уровней беталактамов в продуктах питания такая чувствительность ELISA может быть недостаточной при определении пенициллина G, Amp и Amox в молоке, разведенном в 5–10 раз. При этом многократное разведение образца – зачастую единственный способ снижения неспецифического влияния его компонентов на взаимодействие антитело–антиген.

Удобный вариант иммунохимических и рецепторных систем – хроматографический анализ в формате тест-полосок. Описан иммунохроматографический анализ широкого спектра беталактамов с использованием PBP [18, 19] и специфического к Amp моноклонального антитела [20].

В литературе предложены разные подходы к получению конъюгатов бета-лактамных антибиотиков с белками. Описано использование кросс-линкеров, обеспечивающих алифатическую или ароматическую вставку между белком и антибиотиком [7, 9–11, 14, 15, 18], применение соединений, непосредственно (без линкеров) ковалентно связывающих антибиотик с белком [7–10, 12, 14, 15, 19], “физиологический” метод конъюгирования, в основе которого лежит высокая реакционная способность бета-лактамного цикла [7, 13, 14]. Каждый из этих методов не лишен недостатков. Так, использование глутарового альдегида ограничено высокой вероятностью сшивки полипептидных цепей белков и получения конъюгатов с нестабильными физико-химическими свойствами. Из-за наличия в структуре аминопенициллинов как карбоксильной, так и аминогруппы применение водорастворимого карбодиимида не гарантирует получение конъюгатов только по одной из групп. Иммунореагенты, синтезированные по “физиологическому” пути, не могут быть использованы в биоанализе на основе рецепторных белков, а применение их в анализе с участием специфических антител требует проводить пробоподготовку, обеспечивающую полное разрушение бета-лактамного цикла антибиотика в составе образца продукта [13, 17].

Цель данного исследования – разработка нового способа синтеза конъюгатов аминопенициллинов с белками, который основан на формировании устойчивой связи между белком и гаптеном, исключает возможность образования внутри- и межмолекулярных сшивок полипептидных цепей и не приводит к разрушению бета-лактамного кольца пенициллинов. В круг задач также входило получение высокоафинных к ампициллинам антител, которые в комбинации с синтезированными по предложенной методике конъюгатами могут быть использованы в высокочувствительных тест-системах ELISA для определения пенициллинов в продуктах питания.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез производных аминопенициллинов и их конъюгатов с белками. Предложен двухстадийный метод получения конъюгатов аминопенициллинов с использованием гомобифункциональных кросслинкеров. Он заключается в синтезе *N*-гидроксисукцинимидных эфиров (OSu-эфиров) карбоксипроизводных аминопенициллинов и выделении их из реакционной среды с возможностью продолжительного хранения и последующего простого и быстрого конъюгирования с белками.

Один из использованных в работе кросслинкеров – ди-*N*-гидроксисукцинимидный эфир терефталевой кислоты *p*Ph$(OSu)_2$ – получали из соответствующего дихлорангидрида, к раствору которого в хлористом метилене добавляли 3.5-кратный избыток *N*-гидроксисукцинимида (NHS). В результате реакции, протекающей в

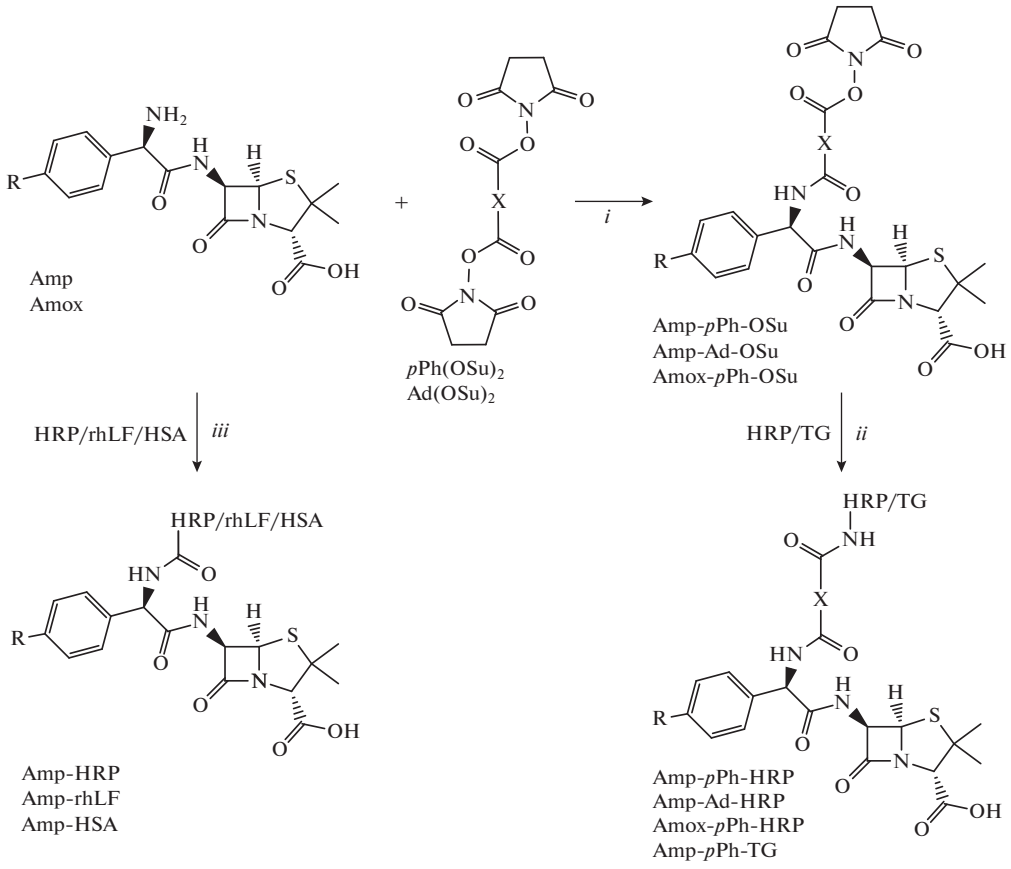


Рис. 1. Схема синтеза конъюгатов аминопенициллинов. Условия реакции: *i* – DMF, Et_3N, 3 ч, 20–25°C; *ii* – 0.1 M $NaHCO_3$, pH 8.3, 16 ч, 4°C; *iii* – EDC или EDC/sNHS, pH 6.0, 16 ч, 4°C. Формулы заместителей R и линкеров X приведены в табл. 1.

присутствии основания, продукт *p*Ph$(OSu)_2$ выпадал в виде белого осадка. Ди-*N*-гидриксисукцинимидный эфир адипиновой кислоты Ad$(OSu)_2$ синтезировали с использованием диизопропилкарбодиимида, который приливали к раствору смеси адипиновой кислоты и NHS в диоксане. Ad$(OSu)_2$ осаждали из реакционной среды диэтиловым эфиром после удаления осадка диизопропилмочевины, также образовавшейся в результате реакции. Структуры синтезированных кросс-линкеров подтверждены данными ЯМР- и масс-спектров. В спектре ^{1}H-ЯМР *p*Ph$(OSu)_2$ присутствуют сигналы протонов метиленовых групп сукцинимидного фрагмента (δ 2.92 м.д.) и бензольного кольца (δ 8.34 м.д.), в спектре ^{1}H-ЯМР Ad$(OSu)_2$ – сигналы протонов метиленовых групп сукцинимидного фрагмента (δ 2.81 м.д.) и адипиновой кислоты (δ 1.68–1.74 и 2.74 м.д.). В масс-спектре синтезированных кросс-линкеров наблюдали пики, соответствующие молекулярным ионам $[M + Na]^+$ и $[2M + Na]^+$.

Схема синтеза “линкерных” конъюгатов аминопенициллинов представлена на рис. 1. Структуры заместителя R и линкера X, а также характеристики использованных исходных реагентов и полученных производных антибиотиков приведены в табл. 1. На первой стадии растворы Amp или Amox в органическом растворителе добавляли к 1.1–1.2-кратному мольному избытку диэфира *p*Ph$(OSu)_2$ или Ad$(OSu)_2$. О полноте протекания реакции судили по исчезновению окрашиваемого нингидрином пятна на пластинке для тонкослойной хроматографии. Из реакционной среды активированные эфиры Amp-*p*Ph-OSu, Amp-Ad-OSu или Amox-*p*Ph-OSu осаждали диэтиловым эфиром. В масс-спектрах полученных производных аминопенициллинов наблюдали протонированные молекулы $[M + H]^+$ и молекулярные ионы $[M + Na]^+$ (табл. 1).

На второй стадии навески синтезированных производных аминопенициллинов растворяли в диметилформамиде (DMF), их 20-кратные мольные избытки добавляли к растворам пероксидазы из корней хрена (HRP) в 0.1 M $NaHCO_3$, pH 8.3 (объемная доля органического растворителя в ко-

Таблица 1. Производные аминопенициллинов и исходные реагенты для синтеза конъюгатов

Соединение	Заместитель R	Линкер X	*m/z*	Степень включения, моль антибиотика/ моль белка
Amp	H	–	–	–
Amox	OH	–	–	–
*p*Ph(OSu)$_2$	–	C_6H_4	383.0 $[M + Na]^+$, 743.1 $[2M + Na]^+$	–
Ad(OSu)$_2$	–	C_4H_8	363.1 $[M + Na]^+$, 703.2 $[2M + Na]^+$	–
Amp-*p*Ph-OSu	H	C_6H_4	595.2 $[M + H]^+$, 617.1 $[M + Na]^+$	–
Amp-Ad-OSu	H	C_4H_8	575.2 $[M + H]^+$, 597.2 $[M + Na]^+$	–
Amox-*p*Ph-OSu	OH	C_6H_4	611.1 $[M + H]^+$, 633.1 $[M + Na]^+$	–
HRP	–	–	43278	–
rhLF	–	–	79599	–
HSA	–	–	66495	–
Amp-*p*Ph-HRP	H	C_6H_4	43795	1.1
Amp-Ad-HRP	H	C_4H_8	43507	0.5
Amox-*p*Ph-HRP	OH	C_6H_4	43562	0.6
Amp-*p*Ph-TG	H	C_6H_4	–	H/o*
Amp-HRP	H	–	44087	1.8
Amp-rhLF	H	–	83882	12.3
Amp-HSA	H	–	66914	1.2

Примечание: конъюгаты синтезировали по схеме, приведенной на рис. 1.

* Из-за слишком большой молекулярной массы TG не удалось использовать метод масс-спектрометрии для определения молекулярной массы конъюгата и расчета степени включения Amp.

нечной реакционной смеси не превышала 5%), и выдерживали в течение 16 ч при 4°C. Модификацию тироглобулина (TG) проводили в аналогичных условиях, используя существенно больший (670-кратный) мольный избыток Amp-*p*Ph-OSu. В результате получены конъюгаты, в которых молекула Amp или Amox через шестичленый алифатический мостик или ароматическое ядро присоединена к аминогруппам остатков аминокислот полипептидной цепи белка. Степень включения антибиотиков в конъюгаты определяли после удаления избытков несвязавшихся реагентов, сравнивая масс-спектры исходных и модифицированных белков (табл. 1). Из-за слишком большой молекулярной массы TG вывод о его превращении в Amp-*p*Ph-TG делали на основании существенного возрастания поглощения света раствором этого конъюгата в диапазоне 250–280 нм.

Следует отметить, что Cliquet et al. [14] уже использовали схожую вставку ароматического фрагмента между молекулами Amp и белка. Amp ацилировали OSu-эфиром 3-малеимидобензойной кислоты и добавляли к растворам бычьего сывороточного альбумина (BSA) или овальбумина, в молекулы которых предварительно в результате двухстадийной модификации были введены дополнительные сульфгидрильные группы. Предложенный нами метод синтеза конъюгатов аминопенициллинов с использованием ди-OSu-эфиров проще и быстрее, не требует продолжительной модификации белка и приводит к получению стабильных связей.

Синтез “безлинкерных” конъюгатов Amp-HRP и Amp-rhLF осуществляли по той же схеме (рис. 1), добавляя водорастворимый 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC) к смеси Amp с HRP или рекомбинантным лактоферрином человека (rhLF). Синтез Amp-HSA проводили по ранее предложенной методике [19] через промежуточную стадию получения активированного эфира Amp в результате взаимодействия антибиотика с *N*-гидроксисульфосукцинимидом (sNHS) в присутствии EDC, который затем добавляли к раствору сывороточного альбумина человека (HSA). Степень включения Amp, рассчитанная на основании масс-спектров конъюгатов и исходных белков, приведена в табл. 1.

Связывание низкомолекулярных производных и ферментных конъюгатов аминопенициллинов с PBP. Пенициллины – неустойчивые соединения из-за лабильности бета-лактамного кольца. Для того чтобы выяснить, происходит ли разрушение

Таблица 2. Результаты воздействия условий синтеза линкерных конъюгатов Amp на его связывание с PBP

№	Условия воздействия	Выдерживание	Связывающая активность, %
1	Amp в воде свежеприготовленный (50 мкг/мл)	–	100
2	Amp в воде (50 мкг/мл)	–20°C, 1 месяц	95
3	Amp в воде (50 мкг/мл)	4°C, 16 ч	103
4	Amp в 0.1 M $NaHCO_3$, pH 8.3 (50 мкг/мл)	4°C, 16 ч	104
5	Amp в 0.1 M $NaHCO_3$, pH 8.3 (50 мкг/мл)	37°C, 16 ч	37
6	Amp в DMF и 1%-ном Et_3N (10 мг/мл)	25°C, 3 ч	105
7	Amp из раствора № 6 после упаривания растворителя и последующего растворения в DMF (10 мкг/мл)	50°C, 30 мин	100
8	Amp-*p*Ph-OSu в DMF и 1%-ном Et_3N (10 мкг/мл)	25°C, 3 ч	100

бета-лактамного цикла антибиотиков в условиях синтеза производных, проверяли их связывающую активность в отношении PBP, распознающего интактную бета-лактамную группировку. Ранее этот PBP использовали в непрямом рецепторном анализе в микропланшетном формате и рецепторно-хроматографической тест-системе для определения бета-лактамных антибиотиков [19]. В нашей работе с применением этого белка исследована устойчивость бета-лактамного кольца Amp в условиях ацилирования антибиотика диэфиром *p*Ph$(OSu)_2$ (органический растворитель DMF, основание Et_3N, повышенная температура) и синтеза белковых конъюгатов (pH 8.3, 16 ч при 4°C). В табл. 2 приведены значения связывающей активности Amp и его производных, рассчитанные так, как описано в "Эксперим. части". Обнаружено, что кратковременное нагревание до 50°C раствора Amp в DMF в присутствии основания Et_3N, выдерживание раствора антибиотика в течение 16 ч при 4°C в 0.1 M $NaHCO_3$ (pH 8.3) и ацилирование аминогруппы ди-*N*-гидроксисукцинимидным эфиром *p*Ph$(OSu)_2$ не приводят к изменению взаимодействия Amp с PBP (связывающая активность находилось в пределах 95–105%, что соответствует допустимой вариации результатов биоанализа). В то же время после инкубации Amp в растворе с pH 8.3 при 37°C в течение более длительного времени, чем продолжительность синтеза, наблюдалось уменьшение связывания антибиотика в системе рецепторного анализа на 63%. Таким образом, показано, что ни на одном этапе синтеза низкомолекулярного производного Amp и его белковых конъюгатов не происходит разрушение бета-лактамного цикла.

В системе конкурентного рецепторного анализа провели сравнение характеристик связывания синтезированных пероксидазных конъюгатов аминопенициллинов. Для получения колориметрического сигнала A_{450} в диапазоне 1.4–1.6 о.е. линкерные конъюгаты Amp-*p*Ph-HRP, Amp-Ad-HRP и Amox-*p*Ph-HRP использовали в концентрации 0.5 мкг/мл, а безлинкерный конъюгат Amp-HRP – 2.5 мкг/мл. Показано, что линкерные конъюгаты взаимодействуют с PBP в присутствии возрастающих количеств Amp одинаковым образом, отличающимся от характера связывания "прямого" конъюгата Amp-HRP. Аналитическая чувствительность модельных рецепторных систем с использованием линкерных конъюгатов или Amp-HRP составляла в среднем 0.11 и 0.25 нг/мл соответственно. В этих системах концентрация Amp, вызывающая 50%-ное ингибирование связывания пероксидазных конъюгатов (IC_{50}) Amp-*p*Ph-HRP, Amp-Ad-HRP и Amox-*p*Ph-HRP, в среднем составляла 0.60 нг/мл, а при использовании Amp-HRP – 0.76 нг/мл (рис. 2). Такая разница может

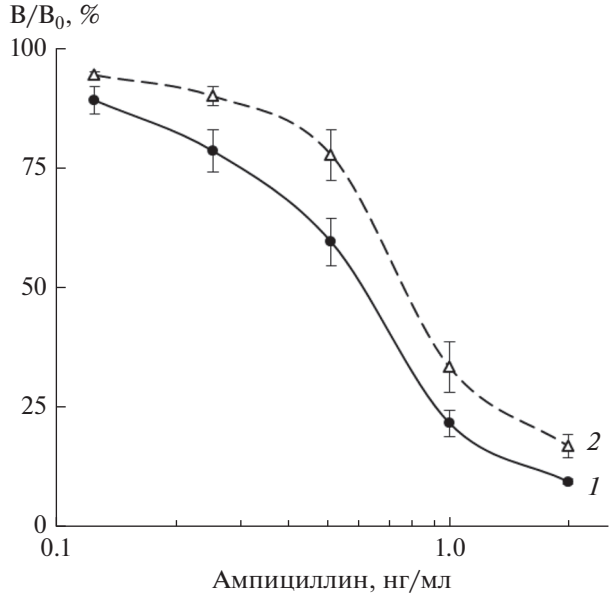


Рис. 2. Конкурентное связывание синтезированных ферментных конъюгатов с PBP в присутствии возрастающих количеств Amp: *1* – Amp-Ad-HRP; *2* – Amp-HRP.

быть связана с частичным разрушением бета-лактамного кольца в ходе синтеза конъюгата Amp-HRP. Причиной также может выступать меньшая доступность антибиотика в составе конъюгата, в котором ампициллин напрямую связан с белком.

Иммуногенные конъюгаты аминопенициллинов в получении поликлональных антител. Синтезированные конъюгаты Amp-*p*Ph-TG и Amp-rhLF использовали для наработки поликлональных антител к ампициллину в результате иммунизации двух групп кроликов. Для оценки иммуногенности конъюгатов полученные антисыворотки испытывали в биоаналитической системе непрямого ELISA, включающей иммобилизованный на твердой фазе безлинкерный конъюгат Amp-HSA с низким включением антибиотика, а также Amp в возрастающих концентрациях и антисыворотки в различных разведениях. Для выявления количества связавшихся специфических антител использовали ферментный конъюгат антител козы против иммуноглобулинов кролика и цветную реакцию окисления TMB в присутствии H_2O_2, катализируемую HRP. Интенсивность детектируемого сигнала A_{450} зависела от содержания анти-Amp-антител в образце антисыворотки и концентрации Amp в жидкой фазе системы. Установленные параметры непрямого ELISA в сравнении с литературными данными [12] приведены в табл. 3. Рабочий титр антисывороток, полученных в результате иммунизации конъюгатом Amp-*p*Ph-TG, оказался в ~3 раза выше, чем в случае использования в качестве иммуногена Amp-rhLF.

Повышенная иммуногенность первого конъюгата может быть связана с природой белка-носителя. Ранее группой ученых было показано, что использование TG для получения антител к Amp предпочтительнее применения белков с меньшей молекулярной массой, таких как BSA или овальбумин [14]. Мы подтвердили ранее установленный факт, что введение в молекулу иммуногена ароматического линкера между Amp и белком-носителем не мешает наработке специфических анти-Amp-антител [14]. Более того, нами показано, что использование иммуногена такой структуры способствует формированию антител с высокой чувствительностью к пенициллинам.

Ранее исследователи обращали внимание на то, что в группе кроликов только отдельные особи активно отвечают на введение иммуногена, содержащего ампициллин [9, 10]. Нами также обнаружено, что чувствительность продуцируемых антител к Amp в непрямом ELISA существенно различалась не только между группами кроликов, но и внутри группы, иммунизированной одним и тем же конъюгатом. Так, в случае иммуногена Amp-rhLF аналитическая чувствительность анализа варьировалась в диапазоне 2–20 нг/мл, а при введении конъюгата Amp-*p*Ph-TG – в диапазоне 0.1–1.0 нг/мл.

Следует отметить, что нами получены антитела, характеризующиеся групповой специфичностью к пенициллинам, с помощью которых в одном анализе может быть определено суммарное содержание по меньшей мере трех антибиотиков пенициллинового ряда: ампициллина, пенициллина G и амоксициллина (другие члены ряда не испытывались). При иммунизации кроликов конъюгатом, синтезированным с использованием в качестве кросс-линкера глутарового альдегида [9, 10], получены антитела со схожей групповой специфичностью, однако по параметру “чувствительность” они существенно уступают лучшим поликлональным антителам, описанным в данной работе.

Поликлональные антитела и пероксидазные конъюгаты в прямом ELISA. Иммуноаналитические свойства синтезированных пероксидазных конъюгатов аминопенициллинов изучены в модельных гетерофазных системах прямого взаимодействия с биоспецифически иммобилизованными антителами из антисывороток к Amp-*p*Ph-TG

Таблица 3. Параметры аналитических систем непрямого ELISA антибиотиков пенициллинового ряда с использованием лучших антисывороток к Amp-*p*Ph-TG и Amp-rhLF, полученных в данной работе, в сравнении с ранее опубликованными результатами

Параметр	Amp-*p*Ph-TG	Amp-rhLF	Amp-BSA*
Титр антисыворотки	1 : 30000	1 : 10000	1 : 30000–1 : 60000
B_0, о.е.	2.0	1.6	1.0
Аналитическая чувствительность, нг/мл	0.1	2.0	5.0
IC_{50}, нг/мл	2.0	61	62
Перекрестная реактивность, %			
Ампициллин	100	100	100
Пенициллин G	48	305	10
Амоксициллин	200	102	<0.1

* Результаты, полученные в работе Самсоновой с соавт. [12].

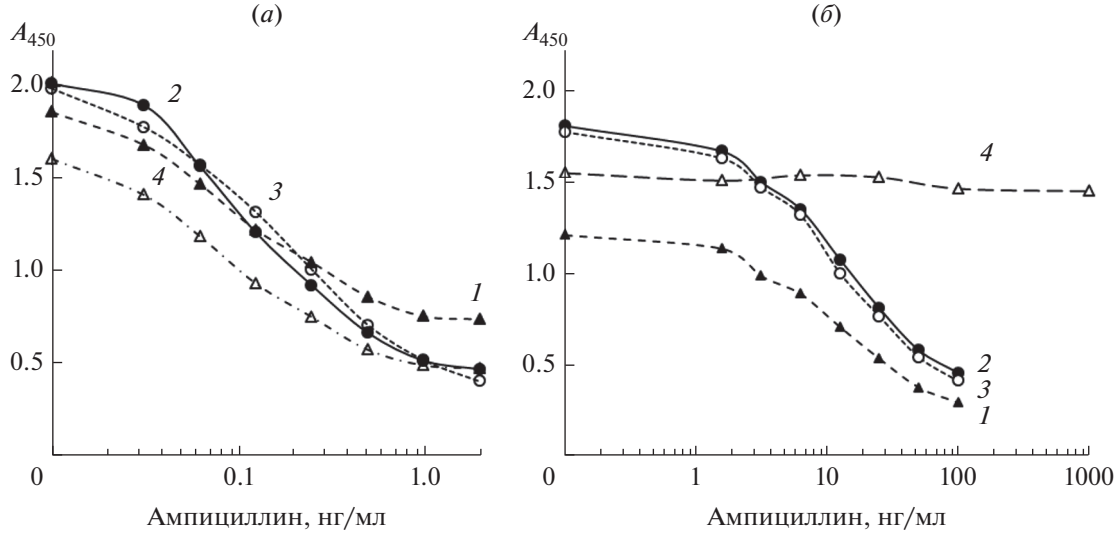


Рис. 3. Связывание синтезированных ферментных конъюгатов с иммобилизованными специфическими поликлональными антителами из антисывороток кроликов к иммуногенам Amp-*p*Ph-TG (*а*) и Amp-rhLF (*б*): *1* – Amp-pPh-HRP; *2* – Amp-Ad-HRP; *3* – Amox-pPh-HRP; *4* – Amp-HRP.

и Amp-rhLF. В случае антисыворотки к Amp-*p*Ph-TG (рис. 3*а*) конъюгаты, содержащие линкеры, использовали в концентрации 0.07 мкг/мл, безлинкерный конъюгат Amp-HRP – в концентрации 0.25 мкг/мл. Аналитическая чувствительность составила в среднем 0.03 нг/мл для всех ферментных конъюгатов (описание расчета приведено в "Эксперим. части"). Параметр IC_{50} варьировался от 0.20 до 0.40 нг/мл, причем его максимальное значение наблюдали в случае использования конъюгата Amp-*p*Ph-HRP. Для этого же конъюгата отмечено, что в конце калибровочного графика его связывание с антителами составило 40% от максимального. В то же время конъюгаты Amp-Ad-HRP, Amox-*p*Ph-HRP и Amp-HRP вытеснялись Amp в концентрации 2 нг/мл на 70–80%.

Определено, что синтезированные линкерные конъюгаты Amp-*p*Ph-HRP, Amp-Ad-HRP и Amox-*p*Ph-HRP взаимодействуют с антителами из антисыворотки к Amp-rhLF схожим образом (рис. 3*б*). Ферментный конъюгат Amp-*p*Ph-HRP использовали в прямом ELISA в концентрации 0.3 мкг/мл, конъюгаты Amp-Ad-HRP и Amox-*p*Ph-HRP – в концентрации 0.5 мкг/мл. Чувствительность анализа составила 2.0 нг/мл, величина IC_{50} была 17–20 нг/мл. Совпадающий по общей структуре с иммуногеном конъюгат Amp-HRP, взятый в концентрации 0.3 мкг/мл, образовывал комплексы с антителами к Amp-rhLF, однако не вытеснялся из них даже при использовании ампициллина в концентрации 1 мкг/мл.

Таким образом, показано, что прямой ELISA с использованием антител к Amp-*p*Ph-TG чувствительнее непрямого анализа (табл. 3). Результаты, полученные в прямом ELISA (рис. 3), подтвердили, что антитела из антисыворотки к Amp-*p*Ph-TG более чувствительны к антибиотикам группы пенициллинов, чем поликлональные антитела из антисыворотки к Amp-rhLF. Кроме того, нами, как и ранее Wang et al. [21], продемонстрировано, что гетерологичные конструкции иммуногена и конъюгированного антигена, отличающиеся по структуре гаптена, использованного для их синтеза, обеспечивают лучшие параметры иммуноанализа. Причем в случае антисыворотки к Amp-*p*Ph-TG этот эффект наблюдали как при изменении линкера между гаптеном и белком, так и при сохранении линкерного фрагмента неизменным и переходе от Amp к Amox.

В наиболее чувствительной из использованных модельных систем прямого ELISA определили динамику продуцирования специфических поликлональных антител и провели контроль их антиген-связывающей активности (связывание ферментного конъюгата и IC_{50}) при введении кролику иммуногена Amp-*p*Ph-TG (рис. 4). Показано, что антисыворотка с лучшими характеристиками связывания получена по истечении 33 недель с начала иммунизации, т.е. после десятого введения иммуногена. При дальнейшей иммунизации чувствительность и специфичность антител в антисыворотке остались на прежнем уровне, концентрация специфических антител не увеличилась. Ранее в литературе также сообщалось о необходимости продолжительной иммунизации кроликов для получения антител, специфических к пенициллинам [10]. Однако опубликованы и сведения о возможности быстрого получения антисыворотки с высоким титром [12],

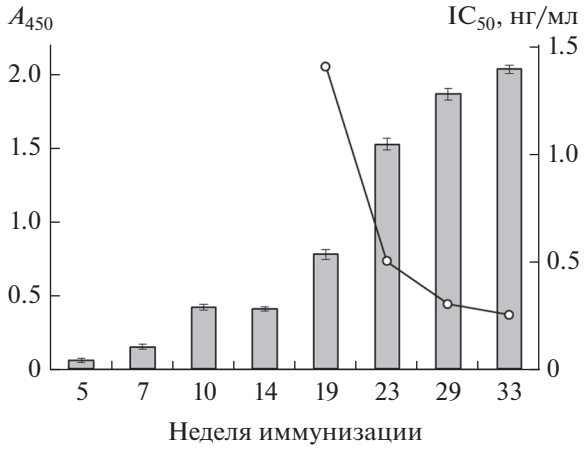


Рис. 4. Связывание ферментного конъюгата Amp-Ad-HRP с иммобилизованными антителами из антисыворотки кролика к Amp-*p*Ph-TG, взятой на разных неделях процедуры иммунизации. Сплошная линия – IC_{50} для Amp в прямом ELISA.

но с низкой аналитической чувствительностью (~5.0 нг/мл).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали ампициллина тригидрат, амоксициллина тригидрат, натриевую соль пенициллина G, BSA, EDC, sNHS, NHS, дихлорангидрид терефталевой кислоты, адипиновую кислоту, диизопропилкарбодиимид, DMF, триэтиламин, TMB, полный адъювант Фрейнда, Tween-20, антитела козы против иммуноглобулинов кролика, меченые HRP (Sigma-Aldrich, США), HRP (Panreac Quimica SLU, Испания). PBP – рекомбинантный аналог природного рецептора PBP2x из *Streptococcus pneumoniae* R6 и моноклональное антитело к нему приобретены у Glory Sciences Co., Ltd, KHP (www.glorybios.com).

TG, выделенный из экстрактов послеоперационной ткани щитовидной железы человека, и два типа очищенных антител овцы против иммуноглобулинов мыши и кролика получены от УП "ХОП ИБОХ НАН Беларуси". HSA предоставлен РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий (Республика Беларусь). rhLF выделен и очищен в Институте микробиологии НАН Беларуси из молока коз-продуцентов, трансгенных по гену лактоферрина человека.

Соли, основания, кислоты и органические растворители белорусских и российских производителей имели классификацию не ниже ч.д.а. Буферные растворы готовили на деионизированной воде с удельным электрическим сопротивлением 17–18 МОм см, полученной в модульной системе очистки воды Arium® pro VF (Sartorius, Германия).

Пероксидазные конъюгаты аминопенициллинов очищали на колонке с Superose 12 (1.0 × × 30.0 см), уравновешенной 0.15 M NaCl, при скорости потока 12 мл/ч в автоматическом режиме на установке для быстрой хроматографии белков (Pharmacia Biotech, Швеция).

ELISA выполняли в разборных микропланшетах из полистирола, состоящих из двенадцати 8-луночных полосок (стрипов), купленных у Greiner Bio-One (Германия) или ООО "Хемамедика" (Россия).

Спектры ^{1}H- и ^{13}C-ЯМР регистрировали на приборе AVANCE 500 (Bruker BioSpin Gmbh, Германия) в d_6-ДМСО. Химические сдвиги определяли относительно остаточных сигналов растворителей. Масс-спектры OSu-эфиров получали с использованием масс-селективного детектора Agilent 6410 Triple Quad в комплекте с жидкостным хроматографом Agilent 1200 SL (Agilent Technologies, Inc., США). Определение молекулярных масс белков и их конъюгатов методом масс-спектрометрии проводили с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометра Microflex LRF System (Bruker Daltonik GmbH, Германия). Измерение колориметрического сигнала в лунках микропланшета проводили с помощью приборов АИФ М/340 (ОАО "Витязь", Беларусь) и iMark™ (Bio-Rad Laboratories Inc., США).

Бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил)терефталат, *p*Ph(OSu)$_2$. К охлажденному на бане со льдом раствору 1.00 г (4.9 ммоль) дихлорангидрида терефталевой кислоты в 30 мл хлористого метилена добавляли 2.00 г (17.4 ммоль) NHS и 2.4 мл (17.4 ммоль) триэтиламина. Перемешивали 30 мин при охлаждении и 48 ч при 20–25°C. Выпавший осадок *p*Ph(OSu)$_2$ отфильтровывали, промывали 5 мл хлористого метилена, суспендировали в 20 мл этого растворителя, опять отфильтровывали и высушивали в вакуумном эксикаторе с P_2O_5 при 20–25°C. Получили 1.37 г (78%) диэфира *p*Ph(OSu)$_2$. Масс-спектр: *m/z* 383.0 $[M + Na]^+$, 743.1 $[2M + Na]^+$. $C_{16}H_{12}N_2O_8$. Вычислено: 360.1. Спектр ^{1}H-ЯМР (ДМСО-d_6) δ: 2.92 (8H, с, 2 × –OC–CH_2–CH_2–CO–), 8.34 (4H, с, 4 × CH). Спектр ^{13}C-ЯМР (ДМСО-d_6) δ: 25.6, 130.1, 131.0, 161.0, 170.2.

Бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил)адипинат, Ad(OSu)$_2$. К раствору 0.44 г (3.0 ммоль) адипиновой кислоты в 15 мл диоксана добавляли 0.73 г (6.3 ммоль) NHS, перемешивали при охлаждении на ледяной бане в течение 10 мин и вносили 0.97 мл (6.3 ммоль) диизопропилкарбодиимида. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 10–15°C и 20 ч при 20–25°C. Выпавший осадок диизопропилмочевины отфильтровывали, из фильтрата отгоняли значительную часть растворителя и добавляли диэтиловый эфир. В результате выпадал ди-*N*-гидроксисукцинимидный эфир

$Ad(OSu)_2$, который повторно растворяли в диоксане и опять осаждали диэтиловым эфиром. Надосадочную жидкость сливали, целевое соединение высушивали в вакуумном эксикаторе с P_2O_5 при 20–25°C. Получили 0.57 г (56%) диэфира $Ad(OSu)_2$. Масс-спектр: m/z 363.1 $[M + Na]^+$, 703.2 $[2M + Na]^+$. $C_{14}H_{16}N_2O_8$. Вычислено: 340.1. Спектр ^{1}H-ЯМР (d_6-ДМСО) δ: 1.68–1.74 (4H, м, 2 × $-OOC-CH_2-C\underline{H}_2-$), 2.74 (4H, т, J 6.1 Гц, 2 × × ($-OOC-CH_2-$)), 2.81 (8H, с, 2 × ($-OC-CH_2-CH_2-CO-$)). Спектр ^{13}C-ЯМР (d_6-ДМСО) δ: 23.3, 25.5, 29.7, 168.8, 170.3.

OSu-эфиры аминопенициллинов. К раствору 50.0 мг (139 мкмоль) *p*Ph$(OSu)_2$ или 50.0 мг (147 мкмоль) $Ad(OSu)_2$ в 2 мл DMF добавляли 50.0 мг (124 мкмоль) ампициллина тригидрата. Затем приливали 50 мкл (360 мкмоль) триэтиламина и перемешивали реакционную смесь в течение 3 ч. За ходом реакции следили по тонкослойной хроматографии в системе этилацетат–метанол–уксусная кислота 4 : 2 : 1, проявляли пластинки УФ-светом и раствором нингидрина в *н*-бутаноле. Растворитель упаривали при 50°C, остаток растворяли в метаноле и осаждали продукт диэтиловым эфиром. Надосадочную жидкость сливали, осадок промывали диэтиловым эфиром и высушивали в вакуумном эксикаторе с P_2O_5 при 20–25°C. Выход составил 71 и 90% для Amp-*p*Ph-OSu и Amp-Ad-OSu соответственно.

Синтез производного Amox проводили аналогичным образом, используя 50.0 мг (119 мкмоль) амоксициллина тригидрата и 50.0 мг (139 мкмоль) *p*Ph$(OSu)_2$. Выход Amox-*p*Ph-OSu составил 76%.

Выделенные OSu-эфиры аминопенициллинов использовали для синтеза конъюгатов без дополнительной очистки.

Пероксидазные конъюгаты Amp-*p*Ph-HRP, Amp-Ad-HRP и Amox-*p*Ph-HRP. К 0.5 мл раствора 2.0 мг (46 нмоль) HRP в 0.1 M $NaHCO_3$ приливали 25 мкл раствора 0.55 мг (920 нмоль) Amp-*p*Ph-OSu, 0.53 мг (920 нмоль) Amp-Ad-OSu или 0.56 мг (920 нмоль) Amox-*p*Ph-OSu в DMF. Перемешивали и инкубировали в течение 16 ч при 4°C. Очистку пероксидазных конъюгатов Amp-*p*Ph-HRP, Amp-Ad-HRP и Amox-*p*Ph-HRP проводили гельфильтрацией на колонке с Superose 12 в режиме быстрой хроматографии белков.

Иммуноген Amp-*p*Ph-TG. К 6.0 мл 28.0 мг (42 нмоль) раствора TG в 0.1 M $NaHCO_3$ добавляли 16.7 мг (28 мкмоль) Amp-*p*Ph-OSu в 0.3 мл DMF. Перемешивали и инкубировали 4 ч при 20–25°C, очищали обессоливанием на Sephadex G-25, уравновешенной 0.15 M NaCl.

Конъюгаты Amp-HRP и Amp-rhLF синтезировали по методикам, предложенным ранее [7, 9, 12], с некоторыми модификациями. К раствору 2.0 мг (46 нмоль) HRP в 0.1 M MES-буфере (pH 6.0) и 0.15 M NaCl добавляли 2.0 мг (5.0 мкмоль) ампициллина тригидрата и 2.0 мг (10 мкмоль) EDC. Инкубировали в течение 16 ч при 4°C, затем очищали гель-фильтрацией в автоматическом режиме. Иммуноген Amp-rhLF получали аналогичным образом, очищали обессоливанием на колонке с Sephadex G-25, уравновешенной 0.15 M NaCl.

Конъюгат Amp-HSA синтезировали по ранее предложенной методике [19], используя 0.8 мг (2.3 мкмоль) Amp, 0.7 мг (3.7 мкмоль) EDC, 0.8 мг (3.7 мкмоль) sNHS и 15 мг (0.2 мкмоль) HSA. Очистку конъюгата проводили хроматографией на колонке с Sephadex G-25, уравновешенной 0.02 M натрий-фосфатным буфером (PBS).

Буферные растворы. PBS содержал 0.05 M раствор смеси гидро- и дигидрофосфата натрия (pH 7.4) и 0.15 M NaCl. Блокирующий буферный раствор приготовлен на основе PBS, содержал 5 г/л BSA. Раствор для иммобилизации специфических антител и проведения ELISA включал PBS, 1 г/л BSA, 0.02% Tween-20. Буфер для промывания лунок планшета содержал PBS и 0.02% Tween-20. Хромоген-субстратную смесь готовили, добавляя одну часть 0.4 мМ раствора TMB в диметилсульфоксиде к 20 частям 3.0 мМ H_2O_2 в 0.04 M натрий-цитратном буфере (pH 4.0). Стоп-раствор представлял собой 1 M H_2SO_4.

Рецепторный анализ. В лунки полистирольного планшета вносили по 100 мкл 5 мкг/мл раствора антител овцы к иммуноглобулинам мыши в 0.1 M $NaHCO_3$. Инкубировали 16 ч при 4°C, затем содержимое лунок удаляли, лунки промывали, вносили в них по 200 мкл блокирующего буферного раствора и снова инкубировали 16 ч при 4°C. Далее раствор из лунок выливали, вносили по 100 мкл моноклонального антитела к PBP в концентрации 2 мкг/мл в буферном растворе и проводили иммунохимическую иммобилизацию антитела, выдерживая планшет в течение 16 ч при 4°C. Затем раствор из лунок удаляли и вносили 50 мкл растворов Amp в диапазоне концентраций 0.1–4.0 нг/мл, 25 мкл растворов синтезированных пероксидазных конъюгатов в подобранном разведении и 25 мкл 0.25 мкг/мл раствора PBP. Проводили инкубацию в течение 1 ч при 20–25°C, промывали лунки моющим буфером, вносили по 100 мкл хромоген-субстратной смеси, инкубировали 15 мин при 20–25°C, затем добавляли по 100 мкл стоп-раствора. Измеряли оптическую плотность растворов в лунках при 450 нм.

Проверка устойчивости бета-лактамного кольца в условиях получения производных аминопенициллинов. В ходе синтеза эфира Amp-*p*Ph-OSu отбирали по 10 мкл реакционной среды, из которой готовили растворы с концентрациями Amp 0.1–4.0 нг/мл. Растворы с такими же концентрациями

Amp готовили из растворов 50 мкг/мл Amp в воде или 0.1 M $NaHCO_3$, предварительно выдержанных в течение 1 месяца при –20°C, 16 ч при 4°C или 16 ч при 37°C. Приготовленные растворы Amp и его производных использовали в рецепторном анализе, описанном выше. Рассчитывали связывающую активность относительно свежеприготовленного раствора Amp по формуле для расчета CR, как описано ниже в подразделе "Аналитические характеристики биоанализа", используя в качестве соединения X ампициллин, подвергнутый воздействию исследуемых условий.

Получение антисыворотки к Amp. Использовали половозрелых самок кроликов породы шиншилла весом 2.5 кг, которых содержали в условиях вивария. Две группы животных по три особи в каждой иммунизировали синтезированными конъюгатами Amp-*p*Ph-TG или Amp-rhLF. В первую иммунизацию подкожно в область шеи вводили по 1.0 мг иммуногена в 1 мл смеси равных объемов 0.15 M NaCl и полного адъюванта Фрейнда. Через 2–3 недели повторно подкожно вводили по 0.5 мг конъюгированного антигена в 0.5 мл смеси равных объемов 0.15 M NaCl и неполного адъюванта Фрейнда. Последующие инъекции конъюгатов в неполном адъюванте Фрейнда проводили с интервалом 4–6 недель, забор крови осуществляли на 7–10-й день после иммунизации. Кровь отбирали из краевой вены уха в пробирки с активаторами свертывания. Сыворотку отделяли центрифугированием. Титр антисыворотки в ELISA определяли как кратность ее разведения, при которой колориметрический сигнал A_{450} составлял 1.2–2.0 о.е.

Система непрямого ELISA. Конъюгат Amp-HSA иммобилизовали на внутренней поверхности лунок полистирольного микропланшета из 100 мкл раствора с концентрацией 0.25 мкг/мл в 0.01 M $NaHCO_3$ путем инкубации в течение 18 ч при 4°C. Затем содержимое лунок планшета удаляли и вносили по 150 мкл блокирующего буфера, инкубировали в течение 18 ч при 4°C. В лунки вносили по 50 мкл раствора Amp в диапазоне концентраций 0.01–1000 нг/мл и по 50 мкл раствора антисыворотки в титре от 1 : 5000 до 1 : 100000. Инкубировали в течение 1 ч при 37°C, затем лунки промывали, вносили в них по 100 мкл пероксидазного конъюгата антител козы к иммуноглобулинам кролика и проводили инкубацию в течение 1 ч при 37°C. После промывки твердой фазы в лунки добавляли по 100 мкл хромоген-субстратной смеси, выдерживали в течение 15 мин при 20–25°C и добавляли 100 мкл стоп-раствора. Измеряли оптическую плотность растворов в лунках при 450 нм.

Система прямого ELISA. В лунки полистирольного планшета вносили по 100 мкл 5 мкг/мл раствора антител овцы к иммуноглобулинам кролика в 0.1 M растворе $NaHCO_3$ и инкубировали в течение 16 ч при 4°C. Затем содержимое лунок планшета удаляли, промывали лунки моющим буфером, вносили по 200 мкл блокирующего буфера и инкубировали в течение 16 ч при 4°C. Далее содержимое лунок удаляли, вносили по 100 мкл антисыворотки кролика к Amp-*p*Ph-TG в титре 1 : 50000 или антисыворотки к Amp-rhLF в титре 1 : 20000, инкубировали в течение 16 ч при 4°C. Лунки планшета промывали, добавляли по 50 мкл растворов Amp в диапазоне концентраций 0.03–1000 нг/мл и 50 мкл растворов синтезированных пероксидазных конъюгатов аминопенициллинов. Инкубировали 1 ч при 20–25°C, затем лунки промывали, вносили в них по 100 мкл хромоген-субстратной смеси, выдерживали в течение 15 мин при 20–25°C и добавляли по 100 мкл стоп-раствора. Измеряли оптическую плотность растворов в лунках при 450 нм.

Аналитические характеристики биоанализа. Аналитическую чувствительность определяли как концентрацию Amp в нг/мл, при которой связывание пероксидазного конъюгата аминопенициллина или твердофазного антигена Amp-HSA с PBP или специфическими поликлональными антителами отличается от 100% на троекратную величину ошибки измерения B_0: (B_0 – 3 SD). Параметр IC_{50} находили как концентрацию раствора Amp, при внесении которого в лунки происходит 50%-ное ингибирование связывания PBP или анти-Amp-антител с конъюгатами Amp или Amox, выражающееся в уменьшении колориметрического сигнала в 2 раза по сравнению с лункой, не содержащей антибиотик. CR вычисляли по следующему уравнению:

$$CR(X) = \frac{IC_{50}(Amp)}{IC_{50}(X)} \times 100\%,$$

где CR(X) – перекрестная реактивность PBP или специфических поликлональных антител к соединению X; IC_{50}(Amp) – концентрация Amp, вызывающая снижение связывания PBP или специфических поликлональных антител с конъюгатом Amp на 50%, нг/мл; IC_{50}(X) – концентрация соединения X, вызывающая снижение связывания PBP или специфических поликлональных антител с конъюгатом Amp на 50%, нг/мл.

Все биоаналитические параметры измеряли не менее чем в трех повторах. Обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Excel. На рис. 2 и 4 планки погрешностей обозначают среднеквадратичное отклонение (SD), $p < 0.05$.

Если у читателей возникнет интерес к конъюгатам или антителам, полученным в данной работе, просим обращаться с запросами о передаче бесплатных образцов к автору для связи.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате реакции ацилирования Amp и Amox ди-OSu-эфирами дикарбоновых кислот получены новые активированные эфиры карбоксипроизводных аминопенициллинов. С их использованием по простой методике с образованием устойчивой амидной связи синтезированы конъюгаты, в которых антибиотик и белок разделены ароматическим или алифатическим фрагментом. Установлено, что в ходе синтеза низкомолекулярных производных аминопенициллинов и в условиях дальнейшего получения белковых конъюгатов по предложенному методу не происходит разрушение бета-лактамного кольца антибиотика.

Проведено сравнение новых пероксидазных конъюгатов с алифатической или ароматической вставкой между антибиотиком и белком Amp-*p*Ph-HRP, Amp-Ad-HRP, Amox-*p*Ph-HRP с конъюгатом, синтезированным в этой же работе путем прямого (безлинкерного) присоединения аминопенициллина непосредственно к остаткам аминокислот полипептидной цепи белка Amp-HRP. Методом рецепторного анализа выявлено, что PBP лучше взаимодействует с линкерными конъюгатами, чем с продуктами прямого присоединения аминопенициллинов к белку-носителю. Модельные рецепторные системы, включающие конъюгаты Amp-*p*Ph-HRP, Amp-Ad-HRP или Amox-*p*Ph-HRP, дают возможность определять пенициллины с большей чувствительностью, чем система с конъюгатом Amp-HRP.

Важно отметить, что системы рецепторного биоанализа на основе PBP и пероксидазных конъюгатов аминопенициллинов в форме готовых наборов реагентов могут применяться на практике для скрининговых исследований содержания широкого спектра бета-лактамов (пенициллинов и цефалоспоринов) в различных продуктах животного происхождения.

Антитела, полученные в результате продолжительной иммунизации кроликов конъюгатом Amp-rhLF (молекулярная масса белка-носителя – 80 кДа), имели низкую чувствительность в ELISA и чрезвычайно высокое сродство к конъюгату Amp-HRP. Для получения высокоаффинной антисыворотки с большим содержанием специфических к пенициллинам антител потребовалась иммунизация в течение такого же промежутка времени синтезированным линкерным конъюгатом Amp-*p*Ph-TG на основе белка с молекулярной массой 660 кДа. Эти поликлональные антитела также проявляли несколько большее сродство к пероксидазному конъюгату, схожему по структуре с иммуногеном, чем к остальным конъюгатам.

Показано, что в системе прямого ELISA с иммунохимически иммобилизованными поликлональными антителами (иммуноген – Amp-*p*Ph-TG) и конъюгатом Amp-Ad-HRP в жидкой фазе Amp достоверно определяется в диапазоне концентраций 0.03–2.00 нг/мл, т.е. на порядок с более высокой чувствительностью, чем в иммуноаналитических системах, описанных в научной литературе.

Разработанная нами система может служить прототипом набора реагентов для ультрачувствительного двухстадийного (биоспецифическое связывание и колориметрическая детекция) прямого ELISA для выявления пенициллинов в пищевых продуктах.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Menkem Z.E., Ngangom B.L., Tamunjoh S.S.A., Boyom F.F.* // Acta Ecol. Sin. 2019. V. 39. P. 411–415. https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2018.10.004
2. Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 13 февраля 2018 г. № 28. http://pravo.by/document/?guid=3871&p0=F91800044
3. Comission Regulation (EU) No. 37/2021 // Off. J. Eur. Union. 2010. V. 5. P. L15/1-72. https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf
4. *Riediker S., Diserens J.-M., Stadler R.H.* // J. Agric. Food Chem. 2001. V. 49. P. 4171–4176. https://doi.org/10.1021/jf010057k
5. *Holstege D.M., Puschner B., Whitehead G., Galey F.D.* // J. Agric. Food Chem. 2002. V. 50. P. 406–411. https://doi.org/10.1021/jf010994s
6. *Chiesa L.M., Nobile M., Panseri S., Biolatti B., Cannizzo F.T., Pavlovic R., Arioli F.* // J. Agric. Food Chem. 2016. V. 64. P. 2635–2640. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00155
7. *Zeng K., Zhangy J., Wang Y., Wang Z.H., Zhang S.X., Wu C.M., Shen J.Z.* // Biomed. Environ. Sci. 2013. V. 26. P. 100–109. https://doi.org/10.3967/0895-3988.2013.02.004
8. *Peng J., Cheng G., Huang L. Wang Y., Hao H., Peng D., Liu Z., Yuan Z.* // Anal. Bioanal. Chem. 2013. V. 405. P. 8925–8933. https://doi.org/10.1007/s00216-013-7311-5
9. *Usleber E., Litz S., Märtlbauer E.* // Food Agric. Immunol. 1998. V. 10. P. 317–324. https://doi.org/10.1080/09540109809354995
10. *Strasser A., Usleber E., Schneider E., Dietrich R., Bürk C., Märtlbauer E.* // Food Agric. Immunol. 2003.

V. 15. P. 135–143.
https://doi.org/10.1080/09540100400003493

11. *Bacigalupo M.A., Meroni G., Secundo F., Lelli R.* // Talanta. 2008. V. 77. P. 126–130.
https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.057

12. *Самсонова Ж.В., Щелокова О.С., Иванова Н.Л., Рубцова М.Ю., Егоров А.М.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. С. 668–675. [*Samsonova Z.V., Shchelokova O.S., Ivanova N.L., Rubtsova M.Y., Egorov A.M.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2005. V. 41. P. 589–595.]
https://doi.org/10.1007/s10438-005-0107-4

13. *Cliquet P., Goddeeris B.M., Okerman L., Cox E.* // Food Agric. Immunol. 2007. V. 18. P. 237–252.
https://doi.org/10.1080/09540100701802908

14. *Cliquet P., Cox E., Van Dorpe C., Schacht E., Goddeeris B.M.* // J. Agric. Food Chem. 2001. V. 49. P. 3349–3355.
https://doi.org/10.1021/jf001428k

15. *Dietrich R., Usleber E., Märtlbauer E.* // Analyst. 1998. P. 123. P. 2749–2754.
https://doi.org/10.1039/a805166f

16. *Jiao S.N., Wang P., Zhao G.X., Zhang H.C., Liu J., Wang J.P.* // J. Environ. Sci. Health. B. 2013. V. 48. P. 486–494.
https://doi.org/10.1080/03601234.2013.761908

17. *Komova N.S., Berlina A.N., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.* // Orient. J. Chem. 2020. V. 36. P. 21–25.
https://doi.org/10.13005/ojc/360103

18. *Li Y., Xu X., Liu L., Kuang H., Xu L., Xu C.* // Analyst. 2020. V. 145. P. 3257–3265.
https://doi.org/10.1039/D0AN00421A

19. *Серченя Т.С., Горбачева И.В., Свиридов О.В.* // Биоорг. химия. 2021. Т. 48. С. 63–74. [*Serchenya T.S., Gorbachyova I.V., Sviridov O.V.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2021. V. 48.]
https://doi.org/10.31857/S0132342322010122

20. *Бызова Н.А., Зверева Е.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. С. 685–693. [*Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2011. V. 47. P. 627–634.]
https://doi.org/10.1134/S0003683811060032

21. *Wang J., Shen X., Zhong P. Zhaodong Li, Tang Q., Huang X., Zherdev A.V., Dzantiev B.B., Eremin S.A., Xiao Z., Lei H., Li X.* // Chem. Biol. Technol. Agric. 2021. V. 8. P. 17.
https://doi.org/10.1186/s40538-021-00211-0

The Conjugates of Aminopenicillins with Proteins: Synthesis, Immunogenic Properties and Binding to a Beta-Lactam Receptor and Antibodies

O. S. Kuprienko*, #, T. S. Serchenya*, I. I. Vashkevich*, I. V. Harbachova*, A. I. Zilberman*, and O. V. Sviridov*

#Phone: +375 (17) 395-92-75; e-mail: kuprienko@iboch.by

**Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, ul. Acad. Kuprevicha 5/2, Minsk, 220141 Belarus*

A new approach to the modification of aminopenicillins and the preparation of their conjugates with proteins using di-*N*-hydroxysuccinimide esters of dicarboxylic acids as cross-linkers has been proposed. Acylation of ampicillin (Amp) and amoxicillin (Amox) with di-*N*-hydroxysuccinimide esters of adipic or terephthalic acids was carried out in an organic solvent. Subsequent conjugation of the obtained aminopenicillin derivatives with proteins proceeded in an aqueous medium at pH 8.3, as a result of which immunogenic and enzymatic conjugates Amp and Amox were synthesized. It was shown that aminopenicillins retained the integrity of their beta-lactam cycle after chemical modification and under conditions of linker conjugates synthesis. In the course of long-term immunization of rabbits with the immunogenic conjugate of Amp with thyroglobulin containing an aromatic linker, polyclonal antibodies capable to bind Amp, Amox and penicillin G with very high sensitivity were obtained. The synthesized conjugates of Amp and Amox with horseradish peroxidase were characterized in a competitive protein-binding (receptor) assay, as well as in a direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Of the model immunoassay systems studied, the heterologous direct ELISA including the obtained polyclonal antibodies and the synthesized Amp peroxidase conjugate with an adipic acid fragment as a linker had the best characteristics: sensitivity to Amp 0.03 ng/mL, IC_{50} = 0.20 ng/mL.

Keywords: penicillins, beta-lactam antibiotics, hapten-protein conjugates, receptor assay, enzyme-linked immunosorbent assay

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2022, том 48, № 1, с. 87–97

УДК 547.735:547.83:547.855

СИНТЕЗ, НЕЙРОТРОПНАЯ АКТИВНОСТЬ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ НОВЫХ КОНДЕНСИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ТИЕНО[2,3-*b*]ПИРИДИНА[1]

© 2022 г. В. В. Дабаева*, М. Р. Багдасарян*, Р. Г. Пароникян*, И. М. Назарян*, А. Г. Акопян*, Л. С. Унанян*, **, Е. Г. Пароникян*, Ш. Ш. Дашян*, #

**Научно-технологический центр органической и фармацевтической химии НАН Республики Армении, Армения, 0014 Ереван, просп. Азатутян, 26*

***Российско-Армянский университет, Институт биомедицины и фармации, Армения, 0051 Ереван, ул. О. Эмина, 123*

Поступила в редакцию 02.05.2021 г.
После доработки 25.05.2021 г.
Принята к публикации 10.06.2021 г.

Разработаны методы получения новых конденсированных производных пиридо[3',2':4,5]тиено[3,2-*d*]пиримидинов на основе 5,6-диметил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-карбонитрила. Осуществлены реакции замещения в 3-м и 4-м положениях 7,8-диметилпиридо[3',2':4,5]тиено[3,2-*d*]пиримидин-4(3*H*)-она. Исследована нейротропная активность 12 полученных соединений *in vivo* на крысах и мышах. У восьми соединений обнаружено противосудорожное действие по антагонизму с коразолом. Четыре отобранные соединения обладали анксиолитическим и активирующим поведение действием. Проведен молекулярный докинг синтезированных соединений для предсказания их взаимодействия с $GABA_A$-рецептором. Выявлено пять соединений, комплексообразование которых с $GABA_A$-рецептором осуществляется в двух местах: бензамидиновом сайте субсайта 1 и субсайте 3 интерфейса ECD, что свидетельствует об ингибирующем действии соединений на мишень.

Ключевые слова: тиено[2,3-b]пиридин, пиридо[3',2':4,5]тиено[3,2-d]пиримидин, реакция Ниментовского, нейротропная активность, молекулярный докинг

DOI: 10.31857/S0132342322010031

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для лечения различных заболеваний широкое применение находят лекарственные препараты, основными биологическими ингредиентами которых выступают конденсированные гетероциклические системы, содержащие пиридиновое кольцо. Это такие известные лекарственные средства, как, например, никотиновая кислота и никотинамид (специфические противопеллагрические препараты), пиридоксин (витамин B_6), изониазид и фтивазид (известные противотуберкулезные средства) и многие другие. В то же время структура пиримидинсодержащих соединений также одна из интересных в биологическом отношении, т.к. диапазон физиологического действия производных пиримидина разнообразен. Так, например, в медицинской практике широкое применение нашли лекарственные средства, созданные на основе конденсированных гетероциклических систем, содержащих пиримидиновое кольцо, обладающие противоопухолевой [1, 2], антимикробной [3–5], противовоспалительной [6], противосудорожной [7, 8] активностью.

Повышенный интерес к химии и фармакологии тиено[2,3-*b*]пиридинов и пиридо[3',2':4,5]тиено[3,2-*d*]пиримидинов как к объектов исследования обусловлен тем, что изучение биологических свойств ранее полученных производных данного ряда выявило множество соединений с высокой нейротропной активностью [9–11].

В настоящее время все применяемые эффективные противосудорожные (противоэпилептические) средства не лишены существенных побочных эффектов. В связи с этим поиск новых, более эффективных и малотоксичных противосудорожных соединений, в том числе с расширен-

[1] Дополнительные материалы к этой статье доступны по doi 10.31857/S0132342322010031 для авторизованных пользователей.

Сокращения: ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт; ECD – внеклеточный домен (extracellular domain); $GABA_A$-рецепторы – рецепторы гамма-аминомасляной кислоты А-типа.

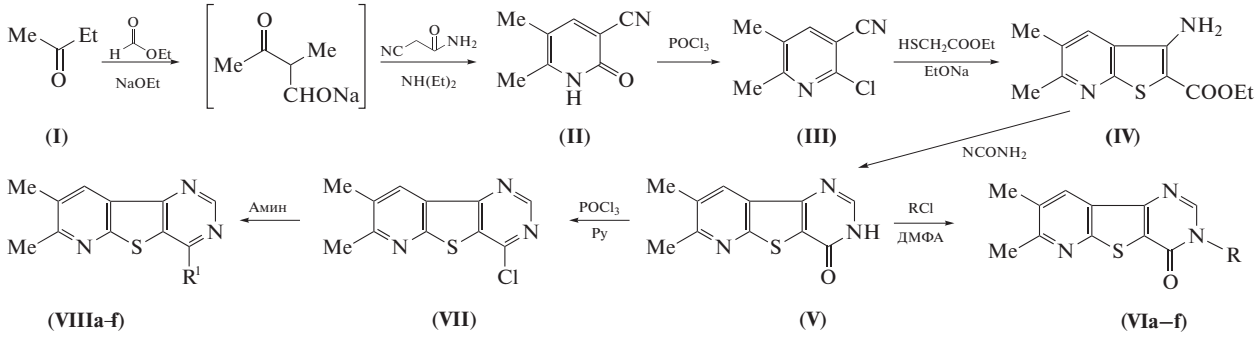
[#] Автор для связи: (тел.: +374 91-260-999; эл. почта: shdashyan@gmail.com).

ными психотропными свойствами, продолжает оставаться весьма актуальным.

Цель данного исследования – синтез новых конденсированных пиридо[3',2':4,5]тиено[3,2-*d*]-пиримидинов на основе тиено[2,3-*b*]пиридинов, изучение их нейротропных свойств *in vivo* и проведение молекулярного докинга.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез новых производных тиено[2,3-*b*]пиридинов и пиридо[3',2':4,5]тиено[3,2-*d*]пиримидинов. В продолжение исследований по синтезу и изучению биологической активности производных тиенопиримидинов синтезированы 3- и 4-замещенные пиридо[3',2':4,5]тиено[3,2-*d*]пиримидины **(VIa–f)** и **(VIIIa–f)** (схема 1).



(VIIIa) R^1 = NH-*i*-C_3H_7
(VIIIb) R^1 = $NH(CH_2)_2OCH_3$
(VIIIc) R^1 = 4-этилпиперазин-1-ил
(VIIId) R^1 = морфолин-4-ил
(VIIIe) R^1 = пиперидин-1-ил
(VIIIf) R^1 = пиперазин-1-ил

(VIa) R = *i*-C_5H_{11}
(VIb) R = $(CH_2)_2C_6H_5$
(VIc) R = CH_2CONH_2
(VId) R = CH_2-2-Cl-C_6H_4
(VIe) R = CH_2-2-F-C_6H_4
(VIf) R = CH_2CONH-3-Cl-C_6H_4

Схема 1. Схема синтеза новых функционально замещенных и конденсированных пиридинов **(VIa–f)** и **(VIIIa–f)**.

В качестве исходного соединения для получения замещенных в пиримидиновом цикле конденсированных производных **(VI)** и **(VIII)** использовали 5,6-диметил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-карбонитрил **(II)**, полученный взаимодействием метилэтилкетона **(I)** с этилформиатом и цианоацетамидом в среде этилата натрия и диэтиламина. При кипячении последнего в хлорокиси фосфора в течение 6 ч получен 2-хлоро-5,6-диметилникотинонитрил **(III)**, который в реакции с этиловым эфиром тиогликолевой кислоты превращается в этил-3-амино-5,6-диметилтиено[2,3-*b*]пиридин-2-карбоксилат **(IV)**. Наличие в тиофеновом кольце последнего удобных функциональных групп позволило осуществить реакцию Ниментовского с получением конденсированного тиено[3,2-*d*]пиримидин-4-она **(V)**. В последнем обращает на себя внимание легкость алкилирования галогенидами, причем установлено, что замещение осуществляется в положении 3 пиримидинового кольца, о чем свидетельствуют данные ИК-спектров (сохраняется полоса, присущая группе C=O при 1670 $см^{-1}$, и отсутствует полоса поглощения, соответствующая сигналу группы NH).

Для установления влияния характера заместителей в положении 4 в пиримидиновом кольце на биологическую активность полученных соединений пиримидинон **(V)** превращен под действием хлорокиси фосфора в хлорпроизводное **(VII)**, причем установлено, что присутствие пиридина значительно повышает выход соответствующего хлорпроизводного **(VII)**. Дальнейшее замещение атома хлора различными аминами позволяет получать целевые продукты **(VIIIa–f)** с высокими выходами.

Биологическая активность полученных соединений. Было проведено экспериментальное исследование нейротропных свойств 12 новых синтезированных производных пиридотиенопиримидинов **(VIa–f)** и **(VIIIa–f)** *in vivo* на двух видах животных, включая изучение противосудорожной активности на мышах и психотропного действия (исследовательская активность в тесте “открытое поле” на крысах, антитревожное действие в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” на мышах и миорелаксантный эффект в тесте “вращающийся стержень” на мышах).

Исследование противосудорожной активности 12 соединений **(VIa–f)** и **(VIIIa–f)** проводили

Таблица 1. Антикоразоловая активность и миорелаксация соединений (**VIa**), (**VIc**), (**VIe**), (**VIf**), (**VIIIa**), (**VIIIc**), (**VIIId**), (**VIIIe**) и препаратов сравнения этосуксимида и диазепама на мышах ($n = 250$)

Соединение	Доза, мг/кг	Антагонизм с коразолом* (ED_{50}, мг/кг)	Миорелаксация (TD_{50}, мг/кг)
(VIa)	50	44 (32.6–59.4)	>500
(VIc)	50	40 (32.0–50.0)	>500
(VIe)	50	34.0 (29.6–39.1)	>500
(VIf)	50	34.5 (28.8–41.4)	>500
(VIIIa)	50	62 (53.9–71.3)	>500
(VIIIc)	50	48 (39.7–58.1)	>500
(VIIId)	50	56 (46.6–67.2)	>500
(VIIIe)	50	36 (23.8–48.2)	>500
Этосуксимид	200	155 (117.5–204.5)	520.0 (426–634)
Диазепам	2	0.5 (0.4–0.7)	2.7 (1.4–5.5)

Примечание: приведены средние значения и доверительные интервалы при $p \le 0.05$. ED_{50} – эффективная доза, вызывающая противосудорожный эффект у 50% животных; TD_{50} – токсическая доза, вызывающая миорелаксацию у 50% животных.

на белых беспородных мышах ($n = 250$). Соединения вводили внутрибрюшинно в объеме 0.2 мл в следующих дозах: 12.5, 25, 50, 75 и 100 мг/кг. Каждую дозу соединений по каждому тесту изучали на шести животных. Препаратами сравнения служили известные препараты этосуксимид (200 мг/кг) и диазепам (2 мг/кг). Противосудорожную и прогностическую транквилизирующую активность изучали по влиянию соединений на клонические подергивания и коразоловые (пентилентетразол, ПТЗ) судороги в тесте “антагонизм с коразолом”.

При анализе данных по антикоразоловому эффекту на мышах было обнаружено, что изучаемые соединения в выявленной оптимальной дозе 50 мг/кг в той или степени проявляют антикоразоловое действие. В табл. 1 представлены ED_{50} (эффективные дозы, вызывающих противосудорожный эффект у 50% животных) активных соединений: (**VIa**), (**VIc**), (**VIe**), (**VIf**), (**VIIIa**), (**VIIIc**), (**VIIId**) и (**VIIIe**). Остальные соединения проявляли слабое противосудорожное действие – 20–40%-ную эффективность. Активные соединения, так же как препараты сравнения этосуксимид и диазепам, предотвращают клонические коразоловые судороги. Соединения по антикоразоловой активности превосходят этосуксимид в несколько раз. Однако, в отличие от диазепама, эта активность проявлялась в более высоких дозах – 34–62 мг/кг (табл. 1). Сравниваемый транквилизатор диазепам обладал антикоразоловой активностью у 50% мышей в дозе 0.5 мг/кг. В изучаемых дозах все соединения и этосуксимид не вызывали миорелаксацию у мышей, тогда как диазепам уже в дозе 2–3 мг/кг вызывает миорелаксацию.

Из всех исследованных соединений были отобраны четыре самые эффективные соединения (имеющие самые низкие значения ED_{50}): соединения (**VIc**), (**VIe**), (**VIf**) и (**VIIIe**).

Были исследованы некоторые психотропные свойства этих соединений – исследовательская активность в тесте “открытое поле” на крысах и антитревожное действие в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ) на мышах. Сравнение проводили только с диазепамом, т.к. в этих тестах этосуксимид неактивен.

В поведенческом тесте “открытое поле” у крыс контрольной группы к диазепаму и к данным соединениям количество горизонтальных перемещений составляло 55.0, вертикальных – 6.4, а количество обследованных ячеек – 8.6 (табл. 2). Исследуемые соединения вызывали некоторое изменение показателей поведения по сравнению с контролем. При введении соединений (**VIc**), (**VIe**), (**VIf**), (**VIIIe**) и диазепама наблюдалось активирующее действие – статистически достоверное увеличение всех показателей (горизонтальные, вертикальные перемещения) по сравнению с контролем. Статистически достоверно увеличивалось также и количество обследованных ячеек после введения отобранных соединений и диазепама, т.е. имеет место выраженное антитревожное действие исследованных соединений, особенно у соединений (**VIc**) (25.5) и (**VIf**) (28.2).

В тесте ПКЛ (экспериментальная модель страха) мыши контрольной группы преимущественно находились в закрытых рукавах (табл. 3). Введение соединений, а также препарата сравнения диазепама привело к статистически значимому снижению времени нахождения животных в закрытых рукавах, а также уменьшению числа заходов в закрытые рукава. Экспериментальные мыши долгое время находились в центре лабиринта, в отличие от животных контрольной группы и животных, которым вводили диазепам, что может свидетельствовать о некой защитной реакции исследованных соединений. В отличие от контроль-

Таблица 2. Исследовательская активность соединений (**VIc**), (**VIe**), (**VIf**), (**VIIIe**) и препарата сравнения диазепама в тесте “открытое поле” на крысах ($n = 30$)

Соединение	Доза, мг/кг	Количество (в абсолютных значениях за 5 мин)		
		горизонтальных перемещений	вертикальных перемещений	обследованных ячеек
Контроль (эмульгатор)	–	55.0 ± 12.5	6.4 ± 2.1	8.6 ± 2.3
(**VIc**)	50	124.3 ± 8.5*	12.0 ± 2.4*	25.5 ± 4.2*
(**VIe**)	50	77.0 ± 5.3*	10.8 ± 2.2*	14.2 ± 3.4*
(**VIf**)	50	126.4 ± 9.6*	11.8 ± 2.7*	28.2 ± 5.5*
(**VIIIe**)	50	102.8 ± 5.6*	9.6 ± 1.8*	22.2 ± 7.6*
Диазепам	2	135.6 ± 4.2*	13.5 ± 3.7*	14.5 ± 3.3*

Примечание: приведены средние значения и стандартная ошибка ($p = 0.05$).

* Статистически достоверные изменения по сравнению с контролем при уровне значимости $p \le 0.05$.

Таблица 3. Влияние соединений (**VIc**), (**VIe**), (**VIf**), (**VIIIe**) и препарата сравнения диазепама в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” (5 мин исследований) на мышах ($n = 30$)

Соединение	Доза, мг/кг	Время нахождения в закрытых рукавах, с	Число заходов в закрытые рукава, с	Время нахождения в центре, с	Время нахождения в открытых рукавах, с
Контроль	–	293.2 (261.8–328.4)	5.8 (5.1–6.67)	3.0 (2.6–3.45)	3.8 (3.17–4.56)
(**VIc**)	50	164.0 (136.7–196.8)*	4.0 (3.3–4.8)*	54 (45–64.8)*	82.0 (72.6–92.7)*
(**VIe**)	50	199.0 (160.1–237.9)*	8.8 (5.0–12.6)	95.0 (79.8–110.2)*	6.0 (2.8–9.2)*
(**VIf**)	50	142.0 (123.5–163.3)*	3.6 (3.1–4.1)*	59 (51.3–67.8)*	99.0 (82.5–110.4)*
(**VIIIe**)	50	248.8 (216.3–286)*	4.8 (4.25–5.4)	34 (29.6–39.1)*	17.2 (14.3–20.6)*
Диазепам	2	213.2 (177.7–255.8)*	5.5 (4.58–6.6)	50.8 (42.3–61)*	36.0 (31.3–41.4)*

Примечание: приведены средние значения и их доверительные интервалы при $p \le 0.05$.

* Различия статистически достоверны по сравнению с контролем.

ной группы, животные под воздействием всех отобранных соединений (**VIc**), (**VIe**), (**VIf**) и (**VIIIe**) в дозе 50 мг/кг, а также диазепама (2 мг/кг) статистически достоверно долгое время находились в открытых рукавах, особенно после введения соединений (**VIc**) (82 с) и (**VIf**) (99 с). Таким образом, у соединений (**VIc**) и (**VIf**) выявлено выраженное анксиолитическое действие.

Молекулярный докинг. В связи с тем, что большинство изученных соединений проявляют антагонизм к коразолу, а механизм судорожного действия коразола обусловлен угнетающим влиянием на $GABA_A$-рецепторы, для прогноза возможных типов и механизмов действия на мишень в данной работе дополнительно был проведен молекулярный докинг с $GABA_A$-рецепторами.

Эксперименты *in silico* проводили для всех 16 полученных соединений с использованием методов молекулярного моделирования и компьютерного анализа (детали приведены в “Эксперим. части”). Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что соединения (**VIb**), (**VId**), (**VIe**), (**VIf**) и (**VIIIe**) (топ-5) показывают высокие значения биофизических показателей комплексообразования по сравнению с остальными соединениями. Необходимо отметить, что взаимодействие соединения (**VIId**) с $GABA_A$-рецептором не наблюдается (рис. 1).

Взаимодействия в системе лиганд–мишень для всех исследуемых соединений с $GABA_A$-рецептором осуществляются в основном за счет гидрофобных связей и электростатических сил, при этом у некоторых соединений наблюдается присутствие водородных связей. Рассчитанные биофизические показатели комплексообразования для соединений топ-5 приведены в табл. 4.

Кластерный анализ мест связывания для соединений, показывающих наилучший результат при комплексообразовании с $GABA_A$-рецептором, свидетельствует о том, что связывание осуществляется в двух местах (рис. 2), оба места находятся во внеклеточном домене интерфейса ECD (extracellular domen) и затрагивают два известных для малых молекул субсайта с вовлечением цепей A, B, C и D [12]. Первый сайт связывания – бензамидиновый сайт субсайта 1 интерфейса ECD, образованный аминокислотными остатками, включенными в цепи B и C, а также C

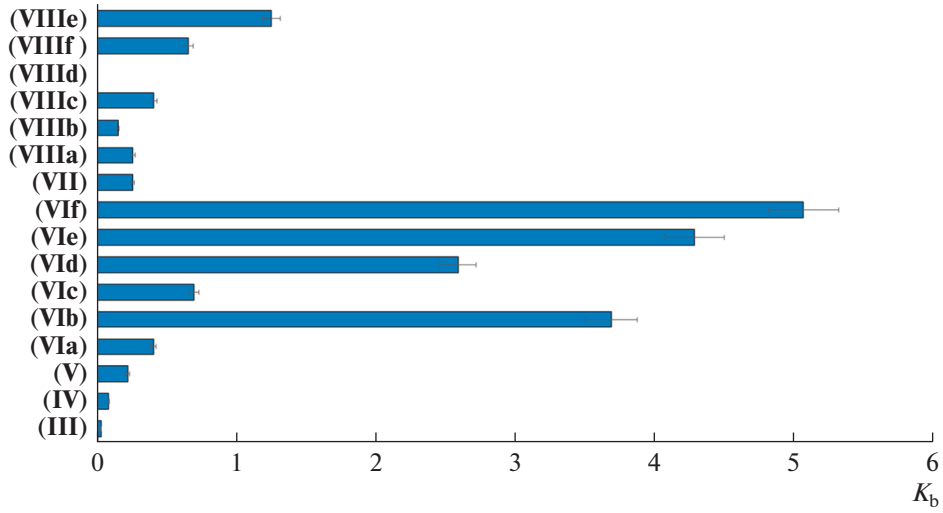


Рис. 1. Рассчитанные константы связывания исследуемых соединений с $GABA_A$-рецептором (PDBID: 4COF).

и D [13]. Второй сайт связывания – субсайт 3 интерфейса ECD, характеризующийся связыванием соединений, которое оказывает ингибирующее действие на мишень. Второй сайт связывания – специфический сайт связывания для катионов, он обычно формируется между α^+/β^- субъединицами цепей с вовлечением аминокислотных остатков в позициях 127, 137 и 184 [14]. Соединения (**VIb**), (**VId**), (**VIe**) и (**VIIIe**) связываются с субсайтом 1. Соединения (**VId**) и (**VIe**) связываются в субсайте 1, образованном цепями B и C. У соединения (**VIe**) наблюдается присутствие возможных водородных связей с расстоянием 2.9 и 3.3 Å. Первый образуется между фтором ароматического кольца (**VIe**) и Gln64 цепи B с углом 51.2°, а второй – между Thr202 цепи C с углом 60.0°. У двух соединений наблюдаются также гидрофобные и электростатические силы при комплексообразовании с аминокислотными остатками Asp43, Tyr62, Thr176, Phe200, Ala201 и Tyr205 (рис. 3).

Таблица 4. Биофизические параметры комплексообразования соединений, показавших наилучший результат при взаимодействии с $GABA_A$-рецептором (PDBID: 4COF)

Соединение	Энергия связывания, ккал/моль	Константа связывания K_b
(VIb)	–9.01 ± 0.45	3.70×10^6
(VId)	–8.80 ± 0.44	2.59×10^6
(VIe)	–9.10 ± 0.45	4.29×10^6
(VIf)	–9.20 ± 0.46	5.08×10^6
(VIIIe)	–8.37 ± 0.41	1.25×10^6

Что касается соединений (**VIb**) и (**VIIIe**), то они связываются в субсайте 1 цепей C и D ECD (рис. 4). У соединения (**VIIIe**) наблюдается как гидрофобный, так и электростатический тип связей, при этом взаимодействия с соединением (**VIb**) имеют исключительно гидрофобный характер. У данных соединений водородных связей при комплексообразовании не наблюдается. Построенные конформационные карты комплексообразования свидетельствуют о том, что аминокислотные остатки, вовлеченные в процесс комплексообразования, отличаются. Соединение (**VIb**) связывается с Thr176 и Tyr205, у соединения (**VIIIe**) такие связи отсутствуют.

Для идентификации механизмов действия соединений, связывающихся с субсайтом 1 интерфейса ECD, были выявлены аминокислотные остатки, входящие в процесс комплексообразования. Результаты свидетельствуют о том, что аминокислотные остатки Asp43, Phe200 и Ala201 у всех четырех лигандов идентичны. С остатками Thr176 и Tyr205 взаимодействие не наблюдается только у соединения (**VIIIe**) (табл. 5). Эти остатки

Таблица 5. Ключевые аминокислотные остатки, входящие в процесс комплексообразования, для соединений (**VIb**), (**VId**), (**VIe**) и (**VIIIe**) при взаимодействии с субсайтом 1 интерфейса ECD

Соединение	Аминокислотный остаток					
	Asp43	Tyr62	Thr176	Phe200	Ala201	Tyr205
(VIb)	+	–	+	+	+	+
(VId)	+	+	+	+	+	+
(VIe)	+	+	+	+	+	+
(VIIIe)	+	+	–	+	+	–

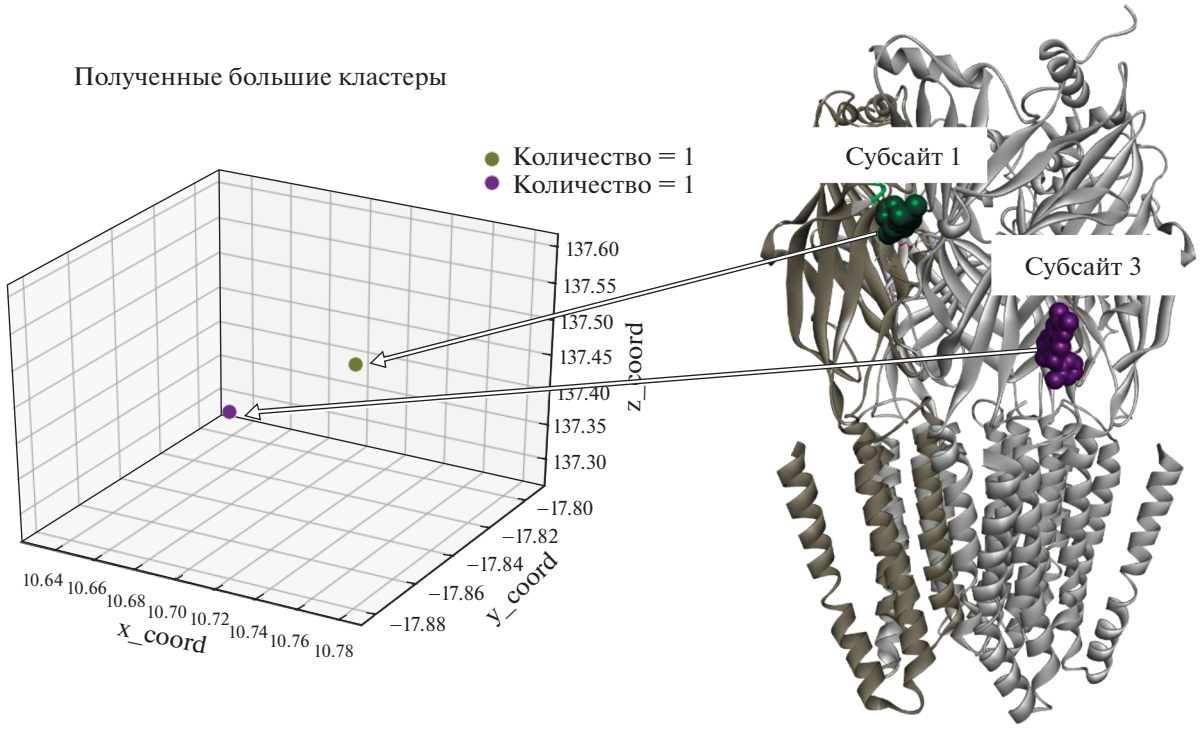


Рис. 2. Кластерный анализ мест связывания топ-5 соединений с $GABA_A$-рецептором.

играют ключевую роль при связывании малых молекул с субсайтом 1 ECD [15].

Взаимодействие соединения (**VIf**) в субсайте 3 осуществляется в основном за счет гидрофобных сил с вовлечением аминокислотных остатков Val50, Met55, Ala135, Met137 и Pro184 (рис. 5). Наблюдается также электростатическое взаимодействие с Pro273 и Lys274.

Необходимо отметить, что из топ-5 соединение (**VIf**) имеет самое высокое значение констант связывания ($K_b = 5.08 \times 10^6$). На основе полученных пространственно-энергетических парамет-

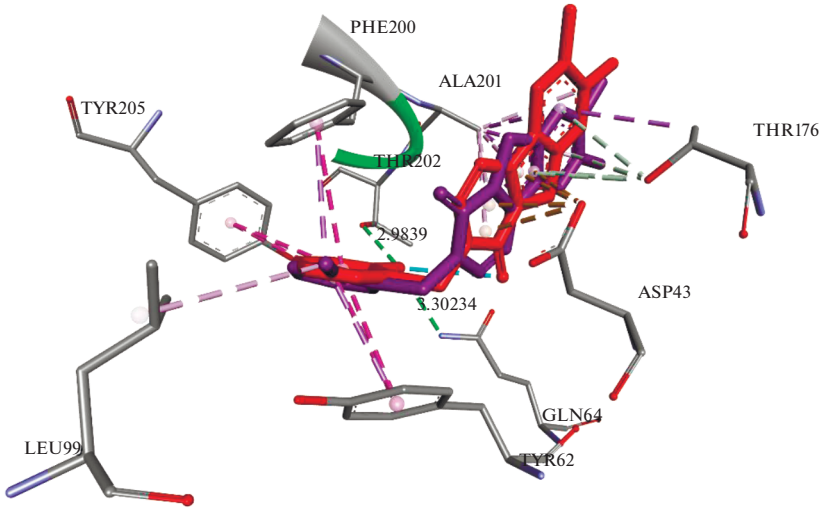


Рис. 3. Суперпозиционирование положений соединений (**VId**) (фиолетовый) и (**VIe**) (красный) в субсайте 1 цепей B и C ECD $GABA_A$-рецептора.

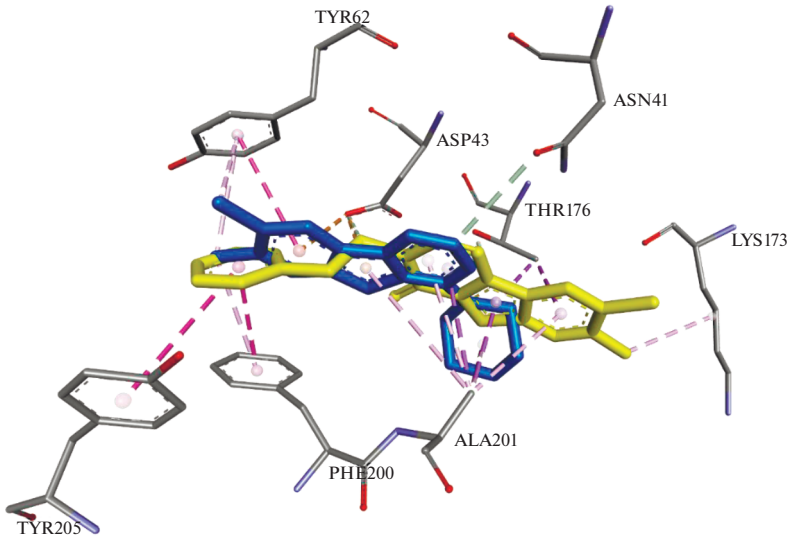


Рис. 4. Суперпозиционирование положений соединений (**VIIb**) (желтый) и (**VIIIe**) (синий) в субсайте 1 цепей C и D ECD $GABA_A$-рецептора.

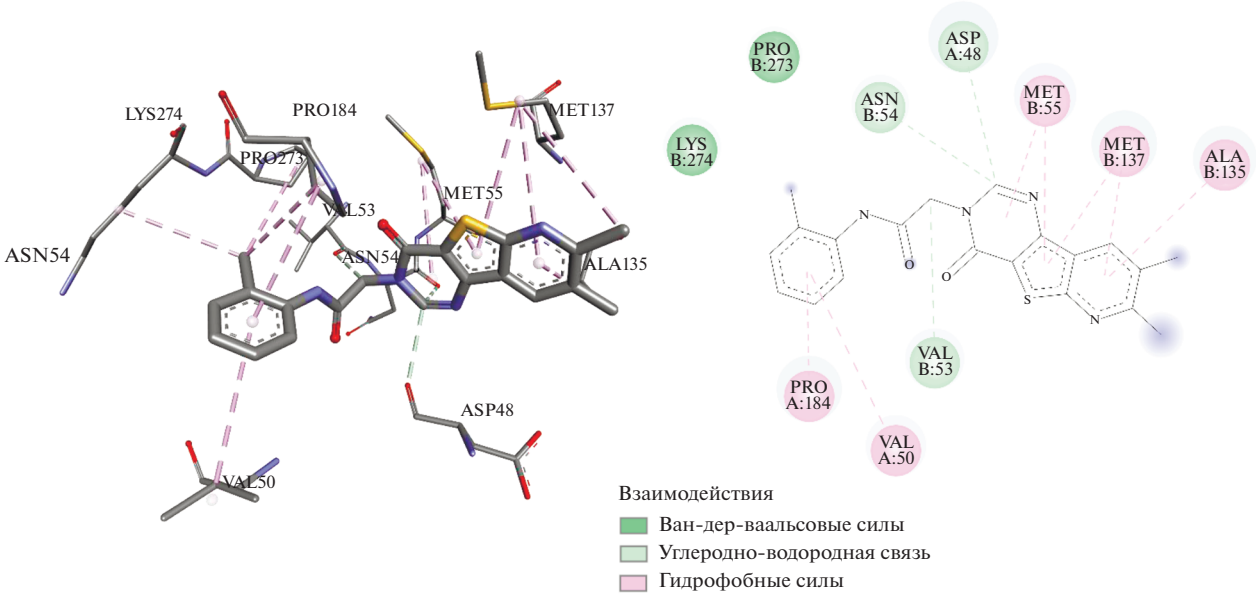


Рис. 5. Пространственное расположение и конформационная карта комплексообразования соединения (**VIIf**) в субсайте 3 ECD $GABA_A$-рецептора.

ров данное соединение можно классифицировать как ингибитор $GABA_A$-рецепторов [16].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали коммерческие реактивы фирм Fluka (Германия) и Sigma-Aldrich (США). Растворители очищали по стандартным методикам. Температуры плавления определяли на микронагревательном столике марки Boetius (Германия). Элементный анализ проводили на приборе Elemental Analyzer Euro EA 3000 (EuroVector, Германия). ИК-спектры регистрировали на спектрометре Nicolet Avatar 330 FT-IR (Thermo Scientific, США) в вазелиновом масле, спектры ЯМР ^{1}H и ^{13}C (δ, м.д.; КССВ *J*, Гц) – на спектрометре Mercury 300 Vx (Varian, США) с частотой 300 и 75.462 МГц соответственно в DMSO-d_6/CCl_4, 1/3, стандарт – тетраметилсилан.

Данные элементного анализа и спектральные данные для всех синтезированных соединений приведены в дополнительных материалах.

5,6-Диметил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-карбонитрил (II). К этилату натрия (2.3 г (0.1 моль) натрия в 50 мл абсолютного этанола, охлажденного до 0°С), при перемешивании добавляли по каплям 7.2 г (0.1 моль) метилэтилкетона (**I**), затем 22.4 г (0.3 моль) этилформиата. Смесь оставляли при комнатной температуре на сутки. На следующий день к смеси при охлаждении (0–5°С) добавляли 50 мл воды и раствор, полученный растворением 8.4 г (0.08 моль) цианоацетамида в 30 мл воды. К полученной реакционной смеси добавляли 2 мл диэтиламина и нагревали в течение 6 ч, поддерживая температуру не выше 35°С. После охлаждения полученные кристаллы отфильтровывали, промывали водой, эфиром, перекристаллизовывали из спирта. Выход 31%, т. пл. 292°С.

5,6-Диметил-2-хлоро-3-цианопиридин (III). Смесь 1.5 г (0.01 моль) соединения (**II**) и 35 мл хлорокиси фосфора нагревали на кипящей водяной бане в течение 8 ч. Затем избыток хлорокиси фосфора отгоняли в вакууме, остаток подщелачивали водным раствором NaOH при охлаждении ледяной водой, выпавшие кристаллы отфильтровывали, промывали водой, перекристаллизовывали из смеси $CHCl_3$–EtOH (3 : 1). Выход 71%, т. пл. 100–101°С.

Этил-3-амино-5,6-диметилтиено[2,3-*b*]пиридин-2-карбоксилат (IV). К этилату натрия, приготовленному из 0.23 г (0.01 моль) металлического натрия и 25 мл абсолютного этанола, при перемешивании добавляли по каплям 1.2 г (0.01 моль) этилового эфира тиогликолевой кислоты и 1.7 г (0.01 моль) соединения (**III**). Реакционную смесь кипятили при перемешивании в течение 6 ч. Затем растворитель отгоняли, добавляли 10 мл воды, выпавшие кристаллы отфильтровывали, промывали водой, эфиром, перекристаллизовывали из смеси $CHCl_3$–EtOH (4 : 1). Выход 75%, т. пл. 249–250°С.

7,8-Диметилпиридо[3',2':4,5]тиено[3,2-*d*]пиримидин-4(3*H*)-он (V). Смесь 2.5 г (0.01 моль) соединения (**IV**) и 20 мл формамида нагревали в течение 2 ч при 190–200°С. После охлаждения к смеси добавляли 20 мл воды, выпавшие кристаллы отфильтровывали, промывали водой, эфиром, перекристаллизовывали из смеси $CHCl_3$–EtOH (5 : 1). Выход 92%, т. пл. >350°С.

Общая методика получения соединений (VIa–f). Смесь 2.3 г (0.01 моль) соединения (**V**), 1.7 г (0.012 моль) поташа и 10 мл абсолютного ДМФА кипятили в течение 1 ч. После охлаждения к смеси добавляли 0.012 моль соответствующего галогенпроизводного и кипятили в течение 2 ч. Затем смесь охлаждали, добавляли ледяную воду, полученные кристаллы отфильтровывали, промывали водой, эфиром, перекристаллизовывали из этанола.

7,8-Диметил-3-(3-метилбутил)пиридо[3',2':4,5]-тиено[3,2-*d*]пиримидин-4(3*H*)-он (**VIa**). Выход 72%, т. пл. 160–161°С.

7,8-Диметил-3-(2-фенилэтил)пиридо[3',2':4,5]-тиено[3,2-*d*]пиримидин-4(3*H*)-он (**VIb**). Выход 73%, т. пл. 184–185°С.

2-(7,8-Диметил-4-оксопиридо[3',2':4,5]тиено-[3,2-*d*]пиримидин-3(4*H*)-ил)ацетамид (**VIc**). Выход 85%, т. пл. >310°С.

3-(2-Хлорбензил)-7,8-диметилпиридо[3',2':4,5]-тиено[3,2-*d*]пиримидин-4(3*H*)-он (**VId**). Выход 69%, т. пл. 206–207°С.

3-(2-Фторбензил)-7,8-диметилпиридо[3',2':4,5]-тиено[3,2-*d*]пиримидин-4(3*H*)-он (**VIe**). Выход 64%, т. пл. 203–204°С.

N-(3-Хлорфенил)-2-(7,8-диметил-4-оксопиридо[3',2':4,5]тиено[3,2-*d*]пиримидин-3(4*H*)-ил)-ацетамид (**VIf**). Выход 70%, т. пл. 302–303°С.

4-Хлоро-7,8-диметилпиридо[3',2':4,5]тиено-[3,2-*d*]пиримидин (VII). Смесь 2.3 г (0.01 моль) соединения (**V**), 2 мл абсолютного пиридина и 30 мл хлорокиси фосфора нагревали в течение 4 ч при 105°С. Избыток хлорокиси фосфора отгоняли в вакууме, к остатку при охлаждении льдом и солью добавляли 20 мл ледяной воды. Затем смесь нейтрализовывали 25%-ным водным раствором аммиака, выпавшие кристаллы отфильтровывали, промывали водой, перекристаллизовывали из этанола. Выход 68%, т. пл. 185–186°С.

Общая методика получения соединений (VIIIa–f). Смесь 2.5 г (0.01 моль) соединения (**VII**) и 0.012 моль соответствующего амина в 10 мл абсолютного этанола кипятили в течение 6 ч. После отгонки растворителя остаток обрабатывали холодной водой, выпавшие кристаллы отфильтровывали, промывали водой, эфиром, перекристаллизовывали из смеси $CHCl_3$–EtOH (3 : 1).

N-Изопропил-7,8-диметилпиридо[3',2':4,5]тиено[3,2-*d*]пиримидин-4-амин (**VIIIa**). Выход 64%, т. пл. 269–270°С.

N-(2-Метоксиэтил)-7,8-диметилпиридо[3',2':4,5]-тиено[3,2-*d*]пиримидин-4-амин (**VIIIb**). Выход 62%, т. пл. 159–160°С.

4-(4-Этилпиперазин-1-ил)-7,8-диметилпиридо[3',2':4,5]тиено[3,2-*d*]пиримидин (**VIIIc**). Выход 58%, т. пл. 109–110°С.

7,8-Диметил-4-морфолин-4-илпиридо[3',2':4,5]-тиено[3,2-*d*]пиримидин (**VIIId**). Выход 73%, т. пл. 174–175°С.

7,8-Диметил-4-пиперидин-1-илпиридо[3',2':4,5]-тиено[3,2-*d*]пиримидин (**VIIIe**). Выход 76%, т. пл. 132–133°С.

7,8-Диметил-4-пиперазин-1-илпиридо[3',2':4,5]-тиено[3,2-*d*]пиримидин (**VIIIf**). Выход 62%, т. пл. 95–96°С.

Экспериментальные животные. Биологические свойства полученных соединений изучали *in vivo* на животных двух видов: белых беспородных мышах (n = 280, масса 18–24 г) и белых беспородных крысах (n = 30, масса 130–140 г) обоего пола, полученных из вивария Института тонкой органической химии им. А.Л. Мнджояна (Армения).

Нейротропные свойства исследуемых соединений. Противосудорожную и прогностическую транквилизирующую активность 12 соединений изучали по влиянию соединений на клонические подергивания и судороги, вызываемые подкожным введением коразола (в дозе 90 мг/кг, 0.2 мл) мышам (пентилентетразол, Acros Organics, США) [17–19]. Соединения вводили внутрибрюшинно в обьеме 0.2 мл в следующих дозах: 12.5, 25, 50, 75 и 100 мг/кг. Каждую дозу соединений по каждому тесту изучали на шести животных. Животным контрольной группы внутрибрюшинно вводили эмульгатор (суспензия Tween-80 с карбоксиметилцеллюлезой, 0.2 мл). Препаратами сравнения служили противосудорожный препарат из группы сукцинимидов этосуксимид (Neuraxpharm Arzneimittel GmbH, Германия) и известный транквилизатор диазепам (Polfa, Польша). Последний препарат был взят для сравнения в связи с тем, что у некоторых производных пиридотиенопиримидинов обнаружено антитревожное действие [20, 21]. Препараты сравнения применялись внутрибрюшинно в том же обьеме и в тех же условиях, как и исследованные соединения. Диазепам вводили в дозах 0.1, 0.2, 0.5 и 1.0 мг/кг, а этосуксимид – в дозах 100, 150, 200 и 300 мг/кг.

Для отобранных соединений изучали также исследовательскую активность при регистрации спонтанного двигательно-исследовательского поведения в модифицированном тесте “открытое поле” на крысах (в каждой группе по шесть животных). Использовали установку, имеющую отверстия (ячейки), дно которой разделено на квадраты. Опыты проводили в дневное время при естественном освещении. Исследуемые соединения вводили крысам внутрибрюшинно в наиболее эффективной противосудорожной дозе – 50 мг/кг, в объеме 0.2 мл. Животным контрольной группы вводили эмульгатор (суспензия Tween-80 с карбоксиметилцеллюлозой) в объеме 0.2 мл. В течение 5 мин эксперимента у животных опытной и контрольной групп определяли количество горизонтальных перемещений (пересечений квадратов), обнюхиваний ячеек и вставания на задние лапки (вертикальные перемещения) [22, 23].

Антитревожное, седативное и антидепрессивное действие изучали в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ) на мышах, разработанном Pellow et al. (1986) [24, 25]. ПКЛ – это приподнятая над полом крестообразная установка, имеющая по паре расположенных друг напротив друга открытых и закрытых рукавов. В норме животные предпочитают большую часть времени проводить в закрытых (темных) рукавах лабиринта. При этом фиксируется время, проведенное в закрытом рукаве, количество попыток зайти в закрытые рукава и время нахождения в центре установки. В вышеуказанной модели исследуемые соединения и сравниваемые препараты вводили внутрибрюшинно до проведения экспериментов. Животным контрольной группы вводили эмульгатор в объеме 0.2 мл. Результаты эксперимента обрабатывали статистически ($p \le 0.05$).

Изучено также побочное нейротоксическое (миорелаксантное) действие соединений на мышах в дозах 50–100 мг/кг при внутрибрюшинном введении, а также препаратов сравнения (этосуксимид и диазепам) в эффективных противосудорожных дозах. Миорелаксацию мышей исследовали в тесте “вращающийся стержень” [17, 26]. Мышей сажали на металлический стержень с гофрированным резиновым покрытием, который вращался со скоростью 5 об/мин. Определяли число животных, не способных удерживаться на нем в течение 2 мин. Для определения ED_{50} (эффективных доз, вызывающих противосудорожный эффект у 50% животных) использовали статистический метод пробит-анализа по Литчфильду и Уилкоксону [27].

Установки для тестов “открытое поле”, “приподнятый крестообразный лабиринт” и “вращающийся стержень” были изготовлены в инженерном отделе Института тонкой органической химии им. А.Л. Мнджояна (Армения).

Молекулярный докинг. Молекулярные модели исследуемых соединений были сконструированы с помощью программного пакета ChemOffice (Cambridgesoft). Энергетическую минимизацию моделей осуществляли с использованием силового поля MM2 [28]. В качестве мишени использовали молекулярную модель $GABA_A$-рецептора из базы данных RCSB с идентификационным номером PDBID: 4COF [29]. Для молекулярного докинга была выбрана программа AutodockVina [30]. В качестве методологии применяли парный докинг с использованием “слепого способа”. *In silico* эксперимент проводили десятикратно с 20 начальными конформерами при континууме исчислений (exhaustiveness) 500, объем пространственного бокса не превышал 27000 Å^3. Отбор наилучших конформеров осуществляли на основе среднеквадратичного отклонения атомов со значением RMSD ≤ 2 Å [31]. Кластеризацию данных проводили на основе алгоритма FOREL в среде Python [32]. Статистический анализ результатов *in silico* экспериментов осуществляли с учетом стандартных отклонений, средних значений, стандартных средних ошибок. Конформационный анализ комплексообразования проводили с использованием BIOVIA Discovery Studio Visualizer [33]. Расчет константы связывания осуществляли с использованием уравнения:

$$\Delta G_{calc} = -RT \ln\left(\frac{1}{K}\right),$$

где ΔG_{calc} – энергия взаимодействия, R – газовая постоянная, T – абсолютная температура, K – константа связывания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработаны методы синтеза новых конденсированных производных пиридо[3',2':4,5]тиено[3,2-*d*]пиримидинов. Осуществлена реакция Ниментовского взаимодействием этил-3-амино-5,6-диметилтиено[2,3-*b*]пиридин-2-карбоксилата с формамидом.

Исследование нейротропных свойств 12 синтезированных производных позволило обнаружить у многих представителей этого ряда (восемь соединений) противосудорожное действие по антагонизму с коразолом. Соединения по противосудорожному действию превосходили этосуксимид, но уступали диазепаму. В противосудорожных дозах соединения не проявляли центральную миорелаксирующую активность, как и этосуксимид, в отличие от транквилизатора диазепама. Все отобранные соединения, как и диазепам, обладали активирующим и анксиолитическим действием в поведенческом тесте "открытое поле". Полученные данные в тесте ПКЛ говорят об антитревожной активности всех отобранных соединений в дозе 50 мг/кг, как и диазепама в дозе 2 мг/кг.

В результате молекулярного докинга был выделен топ-5 соединений с высокими значениями биофизических показателей комплексообразования по сравнению с остальными соединениями. Показано, что взаимодействие соединений с $GABA_A$-рецептором осуществляется в основном за счет гидрофобных связей и электростатических сил. С использованием кластерного анализа также установлено, что связывание соединений при комплексообразовании с $GABA_A$-рецепторами осуществляется в двух местах: бензамидиновом сайте субсайта 1 и субсайте 3 интерфейса ECD. На основе полученных пространственно-энергетических параметров можно сделать вывод об ингибиторном действии исследуемых соединений на $GABA_A$-рецепторы.

При изучении связи между химическим строением и биологической активностью синтезированных соединений было установлено, что наиболее выраженными противосудорожными свойствами обладают пиридо[3',2':4,5]тиено[3,2-*d*]пиримидиноны, в отличие от пиридо[3',2':4,5]тиено[3,2-*d*]пиримидинов, что немаловажно в плане целенаправленного поиска новых биологически активных соединений с нейротропным действием.

Полученные производные пиридо[3',2':4,5]тиено[3,2-*d*]пиримидинов представляются перспективными для разработки новых эффективных нейротропных препаратов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

In silico исследования 16 новых соединений и синтез функционально замещенных пиридинов выполнены при финансовой поддержке Комитета по науке Республики Армения в рамках научного проекта № 20TTWS-1D032.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Биологические эксперименты проведены в полном соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных или других научных целей (ETC № 123, Страсбург, 18.03.1986 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Guetzoyan L.J., Spooner R.A., Michael Lord J., Roberts L.M., Clarkson G.J.* // Eur. J. Med. Chem. 2010. V. 45. P. 275–283. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.10.007
2. *Zhao X.-L., Zhao Y.-F., Guo S.-C., Song H.-S., Wang D., Gong P.* // Molecules. 2007. V. 12. P. 1136–1146. https://doi.org/10.3390/12051136
3. *Holla B.Sh., Mahalinga M., Karthikeyan M.S., Poojary B., Akberali P.M., Kumari N.S.* // Eur. J. Med. Chem. 2005. V. 40. P. 1173–1178. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2005.02.013
4. *Eid F.A., Abd El-Wahab A.H.F., El-Hag Ali G.A.M., Khafagy M.M.* // Acta Pharm. 2004. V. 54. P. 13–26. https://acta.pharmaceutica.farmaceut.org/materials/pdf/1304.pdf
5. *Gami S.P., Vilapara K.V., Khunt H.R., Babariya J.S., Naliapara Y.T.* // Int. Lett. Chem. Phys. Astron. 2014. V. 30. P. 127–134. https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ILCPA. 30.127
6. *Rashad A.E., Heikal O.A., El-Nezhawy A.O., Abdel-Megeid F.M.E.* // Heteroatom. Chem. 2005. V. 16. P. 226–234. https://doi.org/10.1002/hc.20114
7. *Пароникян Е.Г., Акопян Ш.Ф., Норавян А.С., Джагацпанян И.А., Пароникян Р.Г., Назарян И.М., Акопян А.Г.* // Хим.-фарм. журнал. 2012. Т. 46. С. 25–27. [*Paronikyan E.G., Akopyan Sh.F., Noravyan A.S., Dzhagatspanyan I.A., Paronikyan R.G., Nazaryan I.M., Akobyan A.G.* // Pharm. Chem. J. 2012. V. 46. P. 154–156.] https://doi.org/10.1007/s11094-012-0750-z
8. *Wang S.B., Piao G.C., Zhang H.J., Quan Z.S.* // Molecules. 2015. V. 20. P. 6827–6843. https://doi.org/10.3390/molecules20046827
9. *Дабаева В.В., Багдасарян М.Р., Норавян А.С., Джагацпанян И.А., Назарян И.М., Акопян А.Г.* // Хим.-фарм. журнал. 2015. Т. 49. С. 17–21. [*Dabaeva V.V., Bagdasaryan M.R., Noravyan A.S., Dzhagatspanyan I.A., Nazaryan I.M., Akopyan A.G.* // Pharm. Chem. J. 2015. V. 49. P. 587–591.] https://doi.org/10.1007/s11094-015-1334-5
10. *Дабаева В.В., Багдасарян М. Р., Норавян А.С., Казарян Ж.В., Джагацпанян И.А., Назарян И.М., Акопян А.Г.* // Хим.-фарм. журнал. 2015. Т. 49. С. 34–37. [*Dabaeva V.V., Bagdasaryan M.R., Noravyan A.S., Kazaryan Zh.V., Dzhagatspanyan I.A., Nazaryan I.M., Akopyan A.G.* // Pharm. Chem. J. 2016.

V. 49. P. 830–833.]
https://doi.org/10.1007/s11094-016-1381-6

11. *Дабаева В.В., Багдасарян М.Р., Дашян Ш.Ш., Джагацпанян И.А., Назарян И.М., Акопян А.Г., Пароникян Р.Г.* // Хим.-фарм. журнал. 2018. Т. 52. С. 28–33. [*Dabaeva V.V., Bagdasaryan M.R., Dashyan Sh.Sh., Dzhagatspanyan I.A., Nazaryan I.M., Akopyan A.G., Paronikyan R.G.* // Pharm. Chem. J.. 2019. V. 49. P. 844–849.]
https://doi.org/10.1007/s11094-019-1912-z
12. *Kothayer H., Ibrahim S.M., Soltan M.K., Rezq S., Mahmoud S.S.* // Drug Dev. Res. 2018. V. 80. P. 343–352.
https://doi.org/10.1002/ddr.21506
13. *Puthenkalam R., Hieckel M., Simeone X., Suwattanasophon C., Feldbauer R.V., Ecker G.F., Ernst M.* // Front. Mol. Neurosci. 2016. V. 9. P. 1–20.
https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00044
14. *Sieghart W.* // Adv. Pharmacol. 2015. V. 72. P. 53–96.
https://doi.org/10.1016/bs.apha.2014.10.002
15. *Brohan J., Goudra B.G.* // CNS Drugs. 2017. V. 31. P. 845–856.
https://doi.org/10.1007/s40263-017-0463-7
16. *Tomita S.* // Curr. Opin. Neurobiol. 2019. V. 57. P. 81–86.
https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.01.017
17. *Vogel H.G., Vogel W.H.* // In: Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays / Ed. Vogel H.E. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008. P. 569–874.
18. *Loscher W., Schmidt D.* // Epilepsy Res. 1988. V. 2. P. 145–181.
https://doi.org/10.1016/0920-1211(88)90054-X
19. *Swinyard E.A.* // Experimental Models of Epilepsy. Raven Press, New-York, 1992. P. 433–458.
20. *Katzung B.* // Drugs Used in Generalized Seizures. Basic and Clinical Pharmacology. Large Medical Books, McGraw-Hill, 9th edn, 2003.
21. *Машковский М.Д.* // Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2006.
22. *File S.E.* // Behav. Brain. Res. 2001. V. 125. P. 151–157.
https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00292-3
23. *Stanford S.C.* // J. Psycopharmac. 2007. V. 21. P. 134–135.
https://doi.org/10.1177/0269881107073199
24. *Prut C.B.* // Eur. J. Pharmacol. 2003. V. 463. P. 3–33.
https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X
25. *Pelow S., File S.E.* // Pharmacol. Biochem. Behav. 1985. V. 24. P. 525–529.
https://doi.org/10.1016/0091-3057(86)90552-6
26. *Dunham N.W., Miya T.S.* // J. Am. Pharm. Ass. Sci. Ed. 1957. V. 46. P. 208–209.
https://doi.org/10.1002/jps.3030460322
27. *Беленький М.Л.* // Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л.: Медицина, 1961.
28. *Kerwin S.M.* // J. Am. Chem. Soc. 2010. V. 132. P. 2466–2467.
https://doi.org/10.1021/ja1005306
29. *Rose P.W., Prlić A., Altunkaya A., Bi C., Bradley A.R., Christie C.H., Di L., Duarte J.M., Dutta Sh., Feng Z., Green R.K., Goodsell D.S., Hudson B., Kalro T., Lowe R., Peisach E., Randle Ch., Rose A.S., Shao Ch., Tao Yi-Ping Y., Voigt M., Westbrook J.D., Woo J., Yang H., Young J.Y., Zardecki Ch., H.M., Burley S.K.* // Nucleic Acids Res. 2017. V. 45(D1). P. D271–D281.
https://doi.org/10.1093/nar/gkw1000
30. *Trott O., Olson A.J.* // J. Comput. Chem. 2009. V. 31. P. 455–461.
https://doi.org/10.1002/jcc.21334
31. *Hunanyan L., Makichyan A., Ghamaryan V., Hrutyunyan A., Danagulyan G.* // Chemical Journal of Armenia. 2019. V. 72. P. 530–533.
32. *Muthanna M.S.A., Wang P., Wei M., Rafiq A., Josbert N.N.* // Information. 2021. V. 12. 76. P. 1–20.
https://doi.org/10.3390/info12020076
33. *Biovia D.S.* // Discovery Studio Visualizer. San Diego, CA, USA, 2017.

Synthesis, Neurotropic Activity and Molecular Docking of New Condensed Derivatives of Thieno[2,3-*b*]pyridine

V. V. Dabaeva*, M. R. Baghdasaryan*, R. G. Paronikyan*, I. M. Nazaryan*, A. G. Hakobyan*, L. S. Hunanyan, E. G. Paronikyan*, and Sh. Sh. Dashyan*,#**

#Phone: +374 91-260-999; e-mail: shdashyan@gmail.com

**Scientific and Technological Center of Organic and Pharmaceutical Chemistry, National Academy of Science of the Republic of Armenia, prosp. Azatutyan 26, Yerevan, 0014 Armenia*

***Russian-Armenian University, Institute of Biomedicine and Pharmacy, ul. O. Emina 123, Yerevan, 0051 Armenia*

Methods for the preparation of new condensed derivatives of pyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-*d*]pyrimidines based on 5,6-dimethyl-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carbonitrile have been developed. The Niementowski reaction was carried out by the interaction of ethyl 3-amino-5,6-dimethylthieno[2,3-*b*]pyridine-2-carboxylate with formamide. The neurotropic activity of the obtained compounds was studied in *in vivo* studies on outbred animals. At 8 representatives of this series, an anticonvulsant effect of antagonism with corazole was found. Four selected compounds had anxiolytic and behavior-activating effects. Molecular docking of new 16 synthesized compounds was carried out to predict the interaction of the studied compounds with the $GABA_A$ receptor. Five compounds were isolated, the complexation of which with the $GABA_A$ receptor occurs in two places: the benzamidine site of subsite 1 and subsite 3 of the ECD interface, which characterizes new compounds with an inhibitory effect on the target.

Keywords: thieno[2,3-b]pyridine, pyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-d]pyrimidine, Nimentovsky reaction, neurotropic activity, docking analysis

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2022, том 48, № 1, с. 98–108

УДК 577.181.6:577.112.7

ВЛИЯНИЕ МЕТИЛ-β-ЦИКЛОДЕКСТРИНА НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФТОРХИНОЛОНОВ С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ ЧЕЛОВЕКА

© 2022 г. Л. Р. Якупова*, #, Т. Ю. Копнова*, А. А. Скуредина*, Е. В. Кудряшова*

**Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/3*

Поступила в редакцию 09.04.2021 г.
После доработки 08.05.2021 г.
Принята к публикации 18.05.2021 г.

Исследовано влияние природы фторхинолонов (на примере ципрофлоксацина и левофлоксацина) и их комплексообразования с метил-β-циклодекстрином на взаимодействие лекарственного препарата с сывороточным альбумином человека. Установлено, что на связывание лекарственной молекулы с альбумином существенно влияет структура фторхинолона, а также присутствие метил-β-циклодекстрина. С применением методов кругового дихроизма и флуоресцентной спектроскопии было установлено, что из двух фторхинолонов с белком сильнее взаимодействует более гидрофобная молекула ципрофлоксацина. Также было показано, что связывание альбумина с лекарством вызывает тушение флуоресценции белка, причем данный эффект более выражен для ципрофлоксацина. Комплексообразование фторхинолонов с метил-β-циклодекстрином приводит к изменению характера взаимодействия фторхинолонов с белком: в случае комплексов наблюдаются более выраженные взаимодействия для левофлоксацина. Полученные результаты открывают новые перспективы использования фторхинолонов в клинической практике путем разработки высокоэффективных препаратов с усовершенствованными свойствами.

Ключевые слова: сывороточный альбумин человека, фторхинолоны, метил-β-циклодекстрин, флуоресцентная спектроскопия

DOI: 10.31857/S0132342322010146

ВВЕДЕНИЕ

Фторхинолоны (ФХ) – один из крупнейших классов антибактериальных препаратов [1], широко используемых в медицине [2]. ФХ обладают рядом важных физико-химических свойств антибактериального препарата: 1) широким спектром активности, который включает грамотрицательные и грамположительные аэробные и анаэробные бактерии, а также микобактерии; 2) химической и биологической стабильностью; 3) разнообразными способами введения в организм [3].

Действие ФХ основано на избирательном ингибировании ДНК-гиразы (топоизомеразы II типа) и топоизомеразы IV, что позволяет блокировать репликацию ДНК микроорганизмов, при этом ДНК клеток млекопитающих не затрагивается из-за высокой специфичности ФХ к бактериальным ферментам. Блокирование ДНК-гиразы приводит к прекращению деления бактериальных клеток и их гибели [4]. Несмотря на высокую эффективность ФХ, длительная терапия и высокие дозировки препарата могут приводить к ряду побочных эффектов, снижения вероятности появления которых можно добиться созданием высокоэффективных систем доставки. Перспективным вариантом таких систем могут быть комплексы ФХ с циклодекстринами (ЦД) [5].

ЦД и их производные представляют большой интерес для фармацевтической промышленности. Они способствуют увеличению растворимости [6, 7], биодоступности и стабильности лекарственных препаратов, уменьшают токсичность, позволяют варьировать фармакокинетические свойства биологически активных молекул [1, 8]. Несмотря на широкое использование лекарственных формуляций на основе ЦД, взаимодействие комплексов с биологическими веществами требует более детального рассмотрения. Для успешного использования ФХ и их комплексов с ЦД в медицинской практике необходимо изучить их взаимодействие с белками плазмы крови, с которыми формуляции неизбежно взаимодействуют на пути к очагу инфекции при внутривенном введении в организм. Большинство лекарств цир-

Сокращения: ЛВ – левофлоксацин; М-β-ЦД – метил-β-циклодекстрин; ФХ – фторхинолон; ЦД – циклодекстрин; ЦФ – ципрофлоксацин; ЧСА – сывороточный альбумин человека.

Автор для связи: (тел.: +7 (977) 713-21-54; эл. почта: Yakupova.Linara@mail.ru).

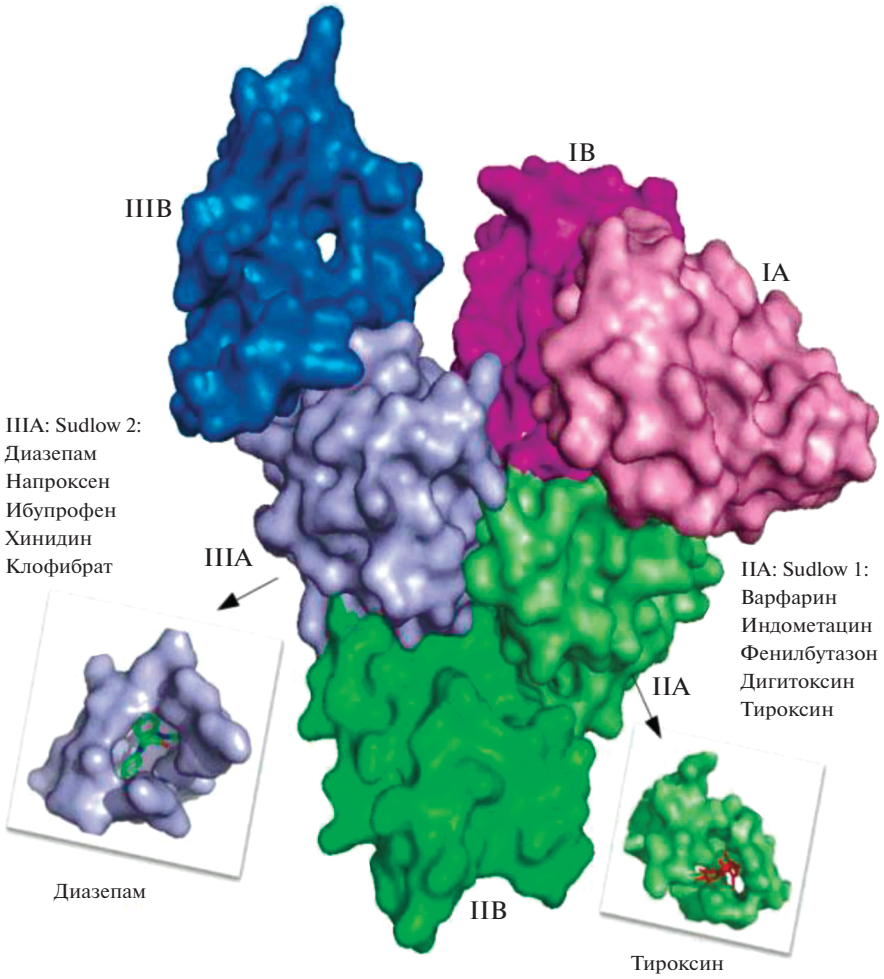


Рис. 1. Структура сывороточного альбумина человека и сайты связывания с лигандами [13].

кулирует в кровотоке, обратимо связываясь с белками плазмы. Связывание лекарств с другими белками плазмы (например, липопротеинами высокой и низкой плотности) происходит в гораздо меньшей степени [9].

Сывороточный альбумин человека (ЧСА) – основной белок в плазме крови. ЧСА представляет собой глобулярный многофункциональный белок, состоящий из трех фрагментов: доменов I (1–195 а.о.), II (196–383 а.о.) и III (384–585 а.о.) (рис. 1). Они топологически идентичны и имеют сходную третичную структуру [10, 11], но каждый фрагмент обеспечивает специфические структурные и функциональные характеристики [12].

ЧСА связывает и переносит различные вещества, такие как гормоны, жирные кислоты, лекарственные молекулы и др. [12]. В основном он связывается с кислотными и нейтральными, анионными лекарствами [9, 13]. В структуре ЧСА на данный момент известны семь сайтов связывания, из них можно выделить два основных, в которых связываются лекарственные молекулы: Sudlow 1 в субдомене IIA и Sudlow 2 в субдомене IIIA [13, 14]. Как правило, для каждого лекарства характерен один или два сайта связывания с ЧСА: так, ацетилсалициловая кислота (аспирин) практически равномерно распределяется между субдоменами IIA и IIIA [15]. Известно, что ФХ связываются с ЧСА в субдомене IIA, вблизи области связывания хлороформа [12]. Для изучения сайта связывания лекарственных молекул с ЧСА применяют различные спектральные методы, например, флуоресцентную спектроскопию с использованием специальных меток, таких как дансил-L-аспарагин, дансил-L-аргинин и дансил-L-глутамат [12].

ЧСА обеспечивает перенос лекарственных молекул к почкам, кишечнику, печени и другим органам [10]. Для многих препаратов описано изменение фармакокинетических и фармакодинамических свойств, а также биораспределения при связывании с ЧСА [9].

Несмотря на то, что взаимодействие ЧСА с ФХ активно изучается, влияние особенностей структуры ФХ, а особенно их комплексов ФХ–ЦД, на

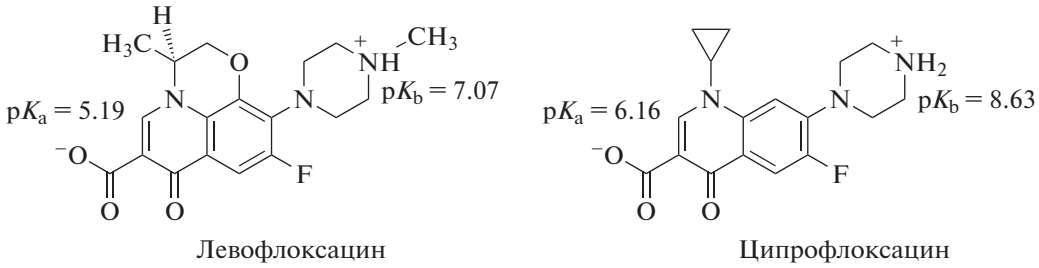


Рис. 2. Структурные формулы фторхинолонов: левофлоксацина и ципрофлоксацина (при pH 7.4) [21].

взаимодействие лекарства с ЧСА – актуальная и пионерская область для исследований.

Цель данной работы – изучение влияния метил-β-циклодекстрина (М-β-ЦД), широко используемого в биомедицине, на связывание ЧСА с ФХ (ципрофлоксацином и левофлоксацином), имеющими различную архитектуру. Для анализа данных взаимодействий был использован комплекс спектроскопических методов, которые позволяют определить основные параметры связывания. Кроме того, важно изучить, как происходит связывание ЧСА с ФХ при различных мольных соотношениях ФХ : белок. Один из способов применения препарата – внутривенное введение, при этом дозировки препарата составляют ~200–400 мг, максимальная концентрация в крови достигает значений ~2.8–6.7 мг/л [16]. Нормальный уровень ЧСА у взрослого человека – 35–50 г/л. Следовательно, мольное соотношение ФХ к ЧСА после полного распределения составляет от 1 : 25 до 1 : 40. Но, поскольку препарат вводится локально, это соотношение может кардинально изменяться, и необходимо рассматривать также и большие избытки ФХ по отношению к ЧСА, при которых механизм взаимодействия лекарственных препаратов с белком может быть другим.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В структурной организации молекул левофлоксацина (ЛВ) и ципрофлоксацина (ЦФ) есть несколько принципиальных отличий, которые обусловливают различия в химических свойствах (рис. 2). Во-первых, ЛВ обладает дополнительным гетероциклом, содержащим атом кислорода, неподеленная электронная пара которого способна вступать в сопряжение со всей ароматической системой молекулы, тем самым увеличивая делокализацию π-электронной плотности и, как следствие, гидрофильность молекулы. Во-вторых, азот, располагающийся в *пара*-положении к атому фтора, в структуре ЛВ имеет зафиксированное циклом окружение, что препятствует его инверсии и увеличивает вероятность вовлечения неподеленной электронной пары в сопряжение ароматического остова, аналогичным образом отражающееся на гидрофильности ФХ. Следует отметить, что более гидрофобные лекарства имеют большее сродство к ЧСА [9], поэтому следует ожидать, что ЦФ будет сильнее взаимодействовать с альбумином. Также важно подчеркнуть, что в условиях, близких к физиологическим (0.01 М натрий-фосфатный буферный раствор, pH 7.4), ФХ находятся в растворе в форме цвиттер-ионов, т.к. имеют на противоположных концах молекул функциональные группы, зависящие от pH среды [17, 18].

Комплексообразование между ФХ и ЦД происходит за счет погружения ароматического остова лекарственной молекулы в полость ЦД, при этом положительно заряженный при pH 7.4 пиперазиновый фрагмент остается снаружи [6], а карбоксильная группа становится менее доступной для взаимодействия с другими лигандами. При комлексообразовании ФХ с ЦД морфолиновый фрагмент в структуре ЛВ способствует более полному погружению лекарственной молекулы в полость ЦД, чем в случае ЦФ. При этом анионная группа ЛВ оказывается снаружи молекулы-хозяина. По этой причине карбоксильные группы в молекулах ФХ экранированы по-разному. Данный факт может оказывать значительное влияние на связывание комплексов ФХ–М-β-ЦД с ЧСА, т.к. именно кислотные, анионные лекарства имеют большее сродство к ЧСА [9, 12, 13].

Взаимодействие ЧСА с фторхинолонами и их комплексами с метил-β-циклодекстринами. Для изучения механизма взаимодействия ЧСА с лекарственными препаратами в работе были исследованы растворы комплексов ФХ с белком (двухкомпонентные системы), а также ФХ–ЦД с ЧСА (трехкомпонентные системы) методом флуоресцентной спектроскопии. Данный метод нашел широкое применение в изучении биологических систем, т.к. он обладает высокой чувствительностью, дает возможность исследовать несколько веществ в одной системе, позволяет работать с живыми клетками, имеет высокую скорость ответа и небольшой расход реагентов [19].

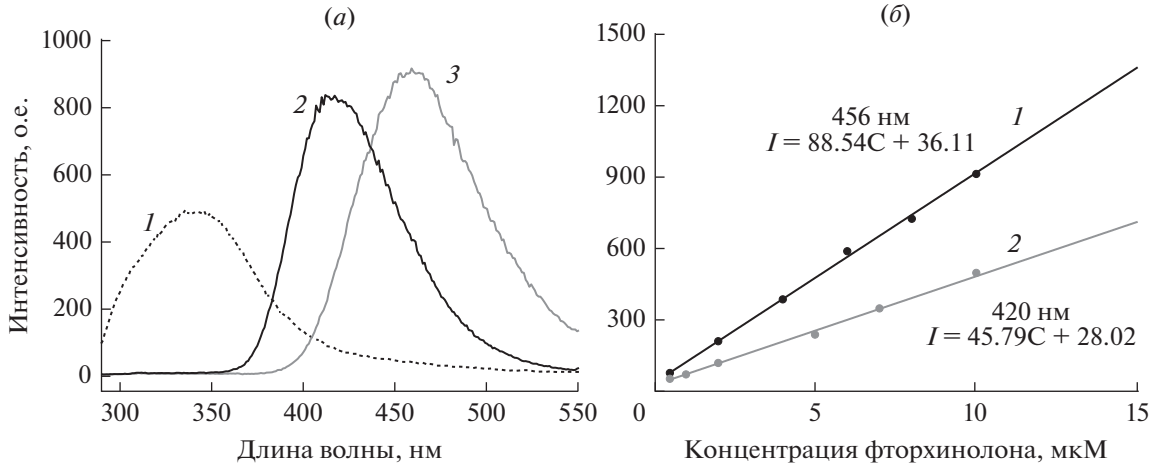


Рис. 3. (*а*) – Спектр эмиссии флуоресценции ЧСА (*1*), ципрофлоксацина (*2*) и левофлоксацина (*3*) в концентрациях 20, 10 и 10 мкМ соответственно (pH 7.4); (*б*) – калибровочные зависимости для левофлоксацина (*1*) и ципрофлоксацина (*2*).

Явление тушения флуоресценции белка может быть использовано для изучения связывания молекулы лекарственного средства с альбумином. В данной работе были изучены процессы взаимодействия ФХ и их комплексов с М-β-ЦД (в мольном соотношении ФХ : М-β-ЦД 1 : 1) с ЧСА.

В спектрах эмиссии флуоресценции ФХ при длине волны возбуждения 280 нм наблюдаются ярко выраженные пики с максимумами интенсивности, приходящимися на 456 и 420 нм для ЛВ и ЦФ соответственно (рис. 3*а*). Приведенные спектры эмиссии флуоресценции обусловлены наличием в структуре лекарственных молекул ароматических фрагментов. Для максимумов эмиссии ЛВ (λ_{max} = 456 нм) и ЦФ (λ_{max} = 420 нм) были получены градуировочные зависимости (рис. 3*б*) [20]. Важно отметить, что при концентрациях ФХ > 50 мкМ наблюдается концентрационное тушение флуоресценции.

Спектр эмиссии флуоресценции ЧСА имеет выраженный максимум интенсивности при длине волны 345 нм, обусловленный наличием ароматических аминокислотных остатков (Trp, Tyr) в белке. Поскольку спектры испускания ФХ и ЧСА практически полностью разрешены, то состояния анализируемых веществ могут быть одновременно изучены в двухкомпонентной системе.

С целью исследования комплексообразования ФХ с ЧСА были получены спектры эмиссии флуоресценции растворов, содержащих изучаемые вещества в широком диапазоне соотношений – от 1 : 0.5 до 1 : 20 (рис. 4*а*). В присутствии антибактериальных препаратов наблюдается снижение интенсивности спектра флуоресценции альбумина, что, вероятно, обусловлено изменениями в микроокружении ароматических остатков белка за счет взаимодействия ЧСА с ФХ. Практически полное исчезновение пика эмиссии флуоресценции альбумина происходит при мольном избытке ЦФ, равном 1, для ЛВ максимальное тушение наблюдается при мольном избытке, равном 5 (рис. 4*б*) [20]. Поскольку более существенные изменения присущи более гидрофобному лекарству – ЦФ, есть основания полагать, что основной механизм взаимодействия ЧСА с ФХ – гидрофобные взаимодействия. Это согласуется с литературными данными о том, что два главных сайта связывания альбумина IIA и IIIA имеют гидрофобные полости, предпочтительные для взаимодействия с гидрофобными молекулами. Например, в работе Ghuman et al. [21] был изучен механизм связывания оксифенбутазона, фенилбутазона, варфарина с ЧСА и установлено, что лекарственные молекулы занимают центр гидрофобной полости в сайте связывания IIA.

Важно отметить, что положение максимума ЧСА смещается в длинноволновую область на 10 нм в присутствии ФХ. Это может свидетельствовать о том, что связывание ФХ в белке приводит к конформационным изменениям в пространственной структуре альбумина и образованию более гидрофильного окружения его поверхности [22], что говорит о наличии электростатических взаимодействий между заряженной поверхностью ЧСА и молекулами ФХ, присутствующими в растворе в виде цвиттер-ионов. Данный механизм взаимодействия с белком превалирует в случае ЛВ, гидрофильные свойства которого выше, чем у ЦФ.

Зависимость тушения эмиссии флуоресценции ЧСА от концентрации ФХ может быть описана с помощью графиков Штерна–Фольмера, которые выражают зависимость F_0/F от концентрации тушителя (рис. 4*в*). Данные уравнения позволяют получить ценную информацию о ко-

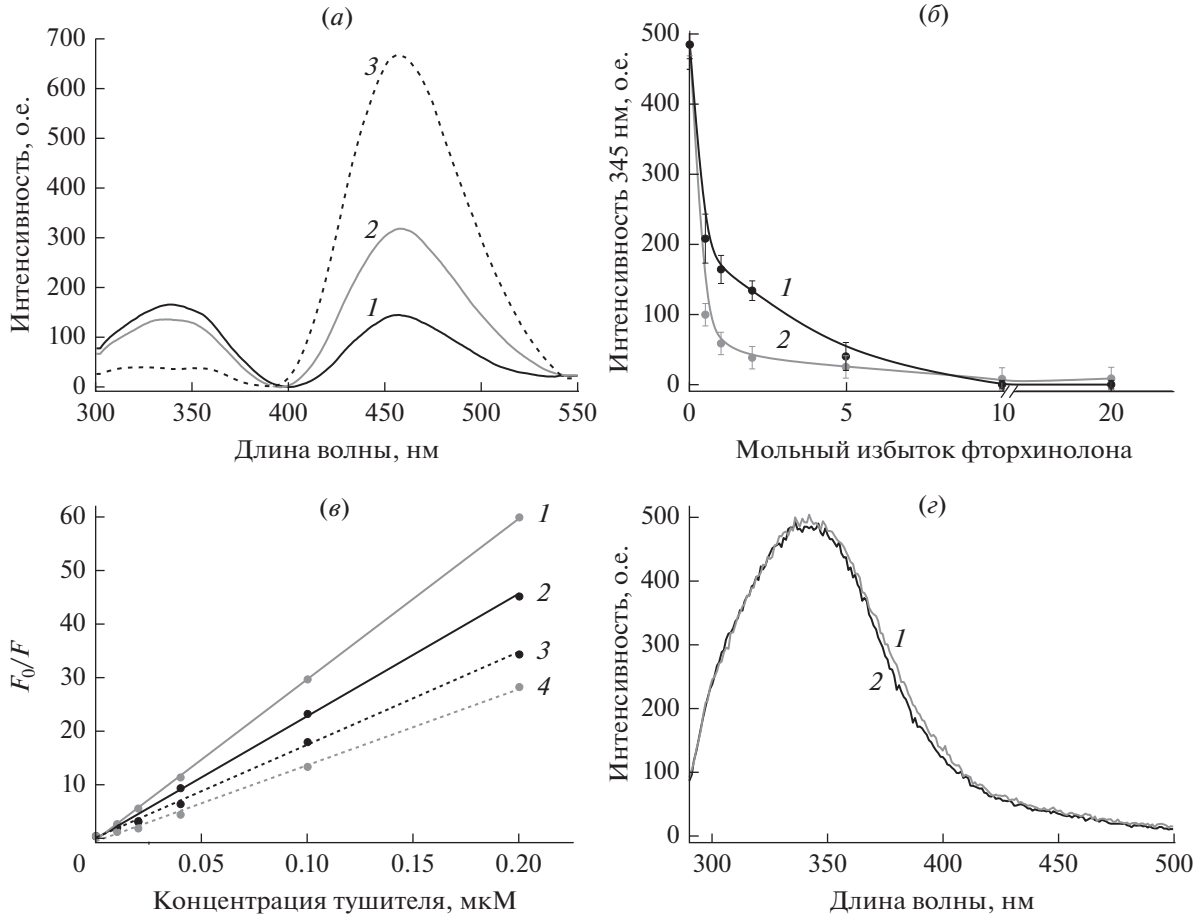


Рис. 4. (*а*) – Спектры флуоресценции системы ЧСА–левофлоксацин при мольном избытке лекарства, равном 0.5 (*1*), 1 (*2*) и 5 (*3*); (*б*) – изменение интенсивности максимума пика флуоресценции ЧСА в присутствии левофлоксацина (*1*) и ципрофлоксацина (*2*), 0.01 М натрий-фосфатный буферный раствор (pH 7.4); (*в*) – зависимости Штерна–Фольмера, выражающие эффект тушения эмиссии ЧСА F_0/F (345 нм) от концентрации ципрофлоксацина (*1*), левофлоксацина (*2*), комплекса левофлоксацина (*3*) и ципрофлоксацина (*4*) с метил-β-циклодекстрином (соотношение 1 : 1); (*г*) – спектр эмиссии флуоресценции системы ЧСА–метил-β-циклодекстрин (20 и 200 мкМ соответственно) (*1*) и ЧСА (20 мкМ, pH 7.4) (*2*).

личественном соотношении эффекта тушения эмиссии белка и концентрации присутствующего тушителя. Поскольку константа Штерна–Фольмера для ЦФ ($(2.9 \pm 0.2) \times 10^5$) больше, чем для ЛВ ($(2.2 \pm 0.2) \times 10^5$), ЦФ – более эффективный комплексообразователь для ЧСА по сравнению с ЛВ.

Комплексообразование М-β-ЦД с ФХ способно существенным образом влиять на эффективность связывания лекарства с белком за счет экранирования части молекулы лекарства, кроме того, в случае комплекса может изменяться сайт связывания ФХ в альбумине за счет изменения полярности молекулы лиганда. В работе Yan et al. [23] было показано, что свободный М-β-ЦД, в отличие от ФХ, незначительно увеличивает интенсивность флуоресценции ЧСА. В независимом эксперименте установлено, что М-β-ЦД практически не оказывает влияния на спектр эмиссии флуоресценции ЧСА (рис. 4*г*). Следовательно, М-β-ЦД не вносит значительных изменений в микроокружение ароматических аминокислотных остатков альбумина, в отличие от ФХ. Таким образом, можно говорить о различных механизмах взаимодействия М-β-ЦД и ФХ с белком.

Также в работе Yan et al. [23] было продемонстрировано, что в трехкомпонентной системе ЧСА–(арипипразол–М-β-ЦД) наблюдалось менее выраженное тушение в спектре эмиссии белка, нежели в двухкомпонентной системе ЧСА–арипипразол. Изучение влияния комплексообразования ФХ с М-β-ЦД на интенсивность флуоресценции ЧСА продемонстрировало следующие результаты: увеличение концентрации комплексов ФХ–М-β-ЦД вызывает тушение флуоресценции альбумина, однако насыщение для обоих ФХ происходит лишь при десятикратном мольном избытке, в отличие от двухкомпонентных систем ФХ–ЧСА, для которых насыщение наблюдается уже при пятикратном моль-

Таблица 1. Значения констант диссоциации (K_d) для комплексов фторхинолонов с метил-β-циклодекстрином и констант Штерна–Фольмера ($K_{ШФ}$) для комплексов фторхинолонов с ЧСА и трехкомпонентных систем (фторхинолон, метил-β-циклодекстрин и белок), pH 7.4

Фторхинолон	K_d (ФХ–М-β-ЦД) [6, 8]	$K_{ШФ}$ (ФХ–ЧСА)	$K_{ШФ}$ (ФХ–М-β-ЦД–ЧСА)
Ципрофлоксацин	$(7.7 \pm 0.3) \times 10^{-4}$	$(2.9 \pm 0.2) \times 10^{5}$	$(1.4 \pm 0.3) \times 10^{5}$
Левофлоксацин	$(1.0 \pm 0.2) \times 10^{-4}$	$(2.2 \pm 0.2) \times 10^{5}$	$(1.8 \pm 0.2) \times 10^{5}$

ном избытке. Количественная характеристика снижения силы взаимодействия ФХ с белком в присутствие М-β-ЦД – уменьшение значений констант Штерна–Фольмера для трехкомпонентных систем. В случае ЦФ происходит значительное снижение константы – $(1.4 \pm 0.3) \times 10^5$ для системы ЧСА–(М-β-ЦД–ЦФ), что в 2 раза меньше по сравнению с аналогичной величиной для свободного ФХ. Для ЛВ изменение значения константы Штерна–Фольмера ($(1.8 \pm 0.4) \times 10^5$ для системы ЧСА–(М-β-ЦД–ЛВ)) не столь существенно (табл. 1). Известно, что комплексообразование ФХ с М-β-ЦД происходит за счет погружения ароматического остова ФХ в гидрофобную полость ЦД, при этом отрицательно заряженная карбоксильная группа ФХ становится недоступной для взаимодействия с альбумином, для которого характерно связывание с кислотными отрицательно заряженными молекулами. Таким образом, можно говорить, что М-β-ЦД может препятствовать взаимодействию ФХ с ЧСА или же приводить к изменению механизма связывания, при этом оказывая более выраженное влияние на ЦФ.

Важно отметить, что в случае систем, содержащих свободный ФХ с белком, более выраженное тушение вызывает ЦФ. При введении в раствор М-β-ЦД картина влияния ФХ на интенсивность флуоресценции ЧСА меняется на противоположную: более ярко эффект тушения можно наблюдать в системе, содержащей ЛВ. Как было отмечено ранее, более полное погружение молекулы ФХ в полость М-β-ЦД реализуется в случае комплексообразования с ЛВ, при этом карбоксильная группа ФХ оказывается доступной для взаимодействия с ЧСА. Напротив, молекула ЦФ не способна настолько глубоко входить в гидрофобную полость М-β-ЦД, что обусловливает меньшую доступность его кислотной группы для внешних взаимодействий и, как следствие, приводит к уменьшению связывания ЦФ с белком.

КД-спектроскопия. Для изучения изменений во вторичной структуре ЧСА, происходящих при взаимодействии альбумина с ФХ и их комплексами с ЦД, был использован метод кругового дихроизма (КД). Поскольку во вторичной структуре альбуминов в основном присутствуют α-спирали [10], то, как и следовало ожидать, негативные максимумы в КД-спектре наблюдаются при 208 и 220 нм, соответствующие π–π*-переходам пептидной связи в α-спиралях [24, 25]. Доля α-спиралей в свободном ЧСА при pH 7.4 составляет ~64%, что согласуется с литературными данными [26, 27]. Спектры свободных ФХ и М-β-ЦД в изучаемом нами диапазоне (200–260 нм) в концентрации 20 мкМ имеют очень низкую интенсивность, следовательно, изменения в спектре ЧСА будут вызваны лишь взаимодействием лекарственных формуляций с белком, а не “суперпозицией” спектров. Это позволяет изучать данную многокомпонентную систему с точки зрения влияния комплексообразования на конформацию ЧСА.

Взаимодействие белка с лекарственными формуляциями приводит к изменениям во вторичной структуре белка. При взаимодействии ФХ с ЧСА доля α-спиралей во вторичной структуре белка уменьшается (на ~9–12%) за счет увеличения доли неупорядоченных структур, а также увеличивается вклад β-листов [26]. Стоит отметить, что такие изменения выражены в большей степени в системе, содержащей более гидрофобную молекулу ЦФ, что согласуется с данными, полученными методом флуоресцентной спектроскопии (табл. 2). Такие результаты позволяют полагать, что взаимодействия между альбумином и ФХ в основном гидрофобные.

Аналогичные изменения происходят в двухкомпонентной системе, содержащей ЧСА и М-β-ЦД, но они менее выражены (доля α-спиралей уменьшается на ~6%), это также согласуется с данными, полученными методом флуоресцентной спектроскопии в работе Yan et al. [23].

В трехкомпонентных системах ЧСА–(ФХ–М-β-ЦД) происходят не столь выраженные изменения во вторичной структуре белка (доля α-спиралей снизилась всего на ~3–5% по сравнению со свободным ЧСА). В этих системах структура белка наиболее приближена к наблюдаемой у свободного ЧСА, т.е. М-β-ЦД стабилизирует исходную конформацию альбумина. К аналогичным выводам приходят Yan et al. [23] и Anand et al. [28], анализируя влияние β-циклодекстринов на взаимодействие лекарственных препаратов с ЧСА и бычьим сывороточным альбумином. Таким образом, можно говорить, что в трехкомпонентной системе М-β-ЦД блокирует связывание ФХ с ЧСА или, что наиболее вероятно, происходит из-

Таблица 2. Влияние фторхинолонов и метил-β-циклодекстрина на вторичную структуру ЧСА (pH 7.4, 25°C)

Система	Способ укладки, %				
	α-спирали	β-повороты	β-параллельные	β-антипараллельные	неупорядоченные
ЧСА	64 ±3	12 ± 1	4.8 ± 0.5	2.3 ± 0.3	16 ± 1
ЧСА–ЛВ (1 : 1)	55 ± 2	15 ± 1	5.2 ± 0.5	4.2 ± 0.5	22 ± 1
ЧСА–ЦФ (1 : 1)	52 ± 2	14 ± 1	5.1 ± 0.5	3.5 ± 0.3	23 ± 1
ЧСА–М-β-ЦД (1 : 1)	57 ± 2	14 ± 1	5.1 ± 0.5	3.6 ± 0.3	20 ± 1
ЧСА–ЦФ–М-β-ЦД (1 : 1 : 1)	61 ± 3	13 ± 1	5.0 ± 0.5	2.9 ± 0.3	18 ± 1
ЧСА–ЛВ–М-β-ЦД (1 : 1 : 1)	58 ± 2	14 ± 1	5.1 ± 0.5	3.5 ± 0.3	20 ± 1

Примечание: согласно литературным данным, содержание α-спиралей в ЧСА составляет 58–67% [24, 27, 31].

менение механизма или сайта связывания в альбумине. Наименьшие изменения во вторичной структуре белка наблюдаются в системе, содержащей ЦФ, что согласуется с данными, полученными методом флуоресцентной спектроскопии, и объясняется менее полным погружением ЦФ в гидрофобную полость ЦД.

Кинетика высвобождения фторхинолонов. Важная характеристика лекарственного средства – его фармакокинетика, а взаимодействие с белком может оказывать существенное влияние на данный параметр препарата. Поэтому была исследована кинетика высвобождения лекарственной молекулы из комплекса с ЧСА методом равновесного диализа с применением УФ-спектроскопии. В эксперименте размер пор мембраны (масса отсечения 3.5 кДа) был подобран таким образом, чтобы происходило высвобождение во внешний раствор только низкомолекулярного ФХ.

Методом УФ-спектроскопии были исследованы растворы индивидуальных веществ (ФХ и ЧСА). Спектры ФХ имеют ярко выраженную полосу поглощения с максимумом интенсивности при длине волны 287 и 271 нм для ЛВ и ЦФ соответственно, что обусловлено π–π*-переходами ароматического остова ФХ (рис. 5). Данные пики аналитически значимы для исследования содержания препаратов в растворе. Основная полоса поглощения ЧСА в УФ-диапазоне имеет максимум при длине волны 278 нм, соответствующий π–π*-переходам [29] остатков ароматических аминокислот белка.

Установлено, что в условиях, близких к физиологическим (pH 7.4, 37°C), более 80% ФХ высвобождается за 45 мин. Комплексообразование ФХ с М-β-ЦД (1 : 1) приводит к незначительному уменьшению скорости высвобождения лекарственных молекул на начальном временном участке.

Поскольку, как было показано ранее, наиболее эффективное связывание ФХ наблюдается при высоких мольных избытках лекарства относительно альбумина (в случае высокой локальной концентрации), то взаимодействие ФХ с белком в данных условиях должно приводить к существенному замедлению высвобождения лекарства. Действительно, при рассмотрении профиля высвобождения ЦФ (рис. 6) обнаружено, что связывание ЦФ с белком приводит к высвобождению 80% ЦФ за 120 мин (в 2.5 раза дольше по сравнению со свободным ЦФ). Менее выраженное влияние ЧСА оказывает на кинетику высвобождения ЛВ: за 60 мин высвобождается менее 80%, вероятная причина этого – меньшее сродство ЧСА к ЛВ в сравнении с ЦФ, что было рассмотрено выше (табл. 2). Поскольку поглощение печенью и клубочковая фильтрация прямо пропорциональны содержанию свободного лекарства, присутствующего в плазме [30], то образование комплексов альбумина с ФХ будет влиять на метаболизм и скорость выведения лекарства, т.к. взаимодействие с белком обусловливает постепенное высвобождение ФХ в плазму крови. Наиболее выраженное проявление данного эффекта будет наблюдаться при больших концентрациях ФХ, т.к.

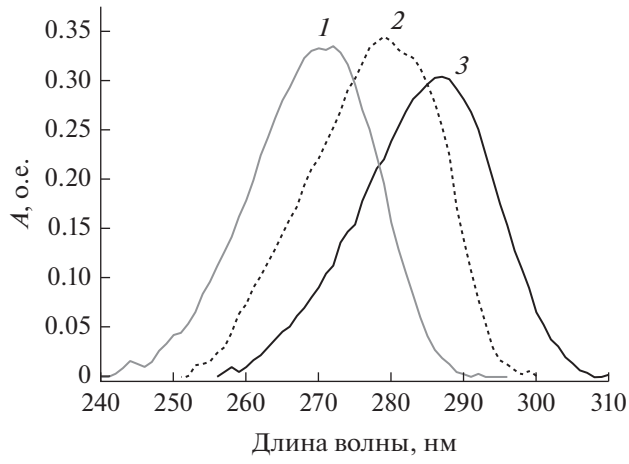


Рис. 5. УФ-спектры ципрофлоксацина (*1*), ЧСА (*2*) и левофлоксацина (*3*) в концентрациях 20 мкМ (pH 7.4).

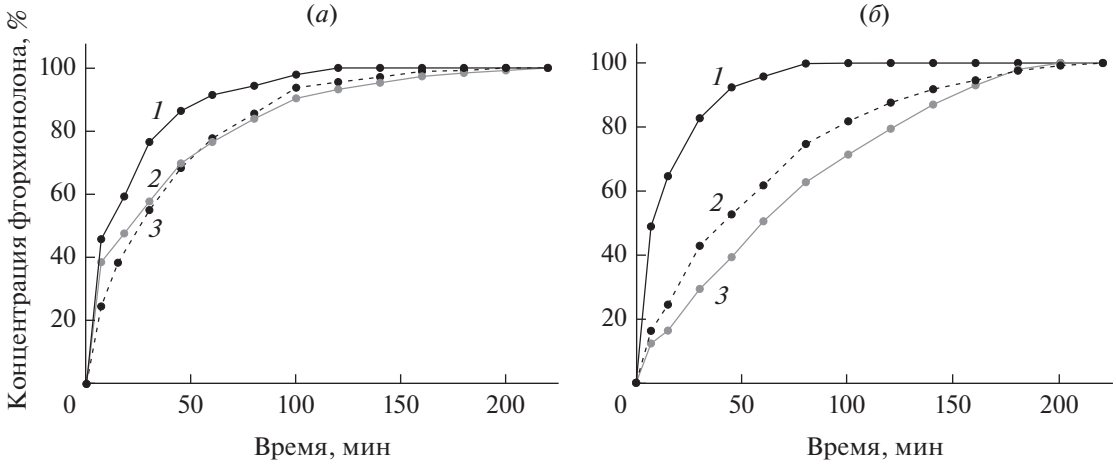


Рис. 6. (*а*) – Кинетика высвобождения левофлоксацина (*1*), левофлоксацина, связанного в комплекс с ЧСА (мольное соотношение ЛФ : белок 10 : 1) (*2*), а также левофлоксацина, связанного в комплекс с М-β-ЦД и ЧСА (мольное соотношение ЛФ : М-β-ЦД : белок 10 : 10 : 1) (*3*); (*б*) – кинетика высвобождения ципрофлоксацина (*1*), ципрофлоксацина, связанного в комплекс с ЧСА (мольное соотношение ЦФ : белок 10 : 1) (*2*), а также ципрофлоксацина, связанного в комплекс с М-β-ЦД и ЧСА (мольное соотношение ЦФ : М-β-ЦД : белок 10 : 10 : 1) (*3*), 0.01 М натрий-фосфатный буферный раствор (pH 7.4), 37°C.

насыщение центров связывания альбумина происходит при мольном избытке лекарства, равном 5. Препараты, связанные с белками плазмы, не могут подвергаться клубочковой фильтрации, в результате чего увеличивается период полувыведения лекарств, которые плохо секретируются почечными канальцами и медленно метаболизируются в печени, что обусловливает пролонгированность действия таких препаратов [9, 30, 31].

Кривые высвобождения ФХ из трехкомпонентных систем (соотношение компонентов ФХ : М-β-ЦД : ЧСА составляет 10 : 10 : 1) имеют профили, аналогичные описанным выше для двухкомпонентных систем (табл. 3). Наблюдается более выраженное влияние белка на ЦФ: по истечении 120 мин высвобождается менее 80% препарата (в 2.75 раза дольше по сравнению со свободным ЦФ). В случае ЛВ комплексообразование с М-β-ЦД в присутствии ЧСА приводит к менее существенному замедлению кинетики высвобождения ФХ, что может быть обусловлено изменением механизма взаимодействия ФХ с ЧСА из-за присутствия М-β-ЦД.

Приведенные результаты подтверждают данные, полученные методом флуоресценции и кругового дихроизма: даже при небольшом мольном избытке ЧСА (1 : 1) наблюдается более сильное изменение физико-химических параметров ЦФ, чем ЛВ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. В работе использовали метил-β-циклодекстрин, ципрофлоксацин, левофлоксацин, сывороточный альбумин человека (Sigma-Aldrich, США); HCl (Реахим, Россия); фосфатный буфер (ЭКО-Сервис, Россия).

Получение комплексов ЧСА с фторхинолонами. К раствору ЧСА в фосфатном буфере (pH 7.4) добавляли требуемое количество раствора ФХ с тем же pH и доводили объем до 1 мл. Концентрацию ЧСА (60 мкМ) поддерживали постоянной во всех образцах, мольный избыток ФХ варьировали в интервале 0.5–20.0. Комплексы инкубировали при постоянном перемешивании и температуре 37°C, с использованием термостатируемого шейкера (Shaker-Incubator ES-20, BioSan, Латвия).

Таблица 3. Значение тангенсов угла наклона кривых высвобождения фторхинолонов (pH 7.4, 37°C)

Система	tg(α)	
	левофлоксацин	ципрофлоксацин
ФХ	3.50 ± 0.04	3.75 ± 0.04
ФХ–ЧСА (10 : 1)	1.55 ± 0.02	1.20 ± 0.01
ФХ–М-β-ЦД–ЧСА (10 : 10 : 1)	1.45 ± 0.02	0.80 ± 0.01

Примечание: значения выражены в процентном количестве свободного фторхинолона (%) от времени (мин).

Для изучения взаимодействия ЧСА и ЦФ с помощью УФ- и флуоресцентной спектроскопии были приготовлены растворы с концентрацией ЧСА 20 мкМ путем разбавления исходных образцов в 3 раза.

Получение комплексов фторхинолонов с метил-β-циклодекстрином. К раствору 34 мМ ФХ (pH 4.0) добавляли требуемое количество 30 мМ раствора М-β-ЦД в HCl (pH 4.0) для получения комплекса 1 : 1. Комплекс инкубировали в течение 1 ч при 37°C. При добавлении комплекса к раствору ЧСА систему переводили в pH 7.4 фосфатным буфером.

Получение систем ЧСА с комплексом ФХ с М-β-ЦД. К раствору ЧСА в фосфатном буфере (pH 7.4) добавляли требуемое количество раствора комплекса ФХ–М-β-ЦД, который разбавляли раствором фосфатного буфера для получения необходимой концентрации. Была приготовлена серия комплексов, концентрацию ЧСА (60 мкМ) поддерживали постоянной во всех образцах, мольный избыток ФХ варьировали в интервале 0.5–20.0 для каждой серии. Комплексы инкубировали при перемешивании при 37°C. Таким же образом была получена аналогичная серия комплексов с концентрацией ЧСА 20 мкМ путем разбавления исходных растворов в 3 раза.

Кинетика высвобождения ципрофлоксацина. Исследуемый образец (1 мл, концентрация комплексов 20 мкМ) помещали в диализный мешок (MWCO 3.5 кДа, Orange Scientific, Бельгия), высвобождение происходило во внешний раствор фосфатного буфера (pH 7.4) объемом 1 мл. Систему инкубировали при температуре 37°C и 150 об/мин, периодически отбирая аликвоты (50 мкл) для регистрации УФ-спектров.

УФ-спектры регистрировали на спектрометре УФ- и видимого диапазона Ultrospec 2100 pro (Amersham Biosciences, США) трижды в интервале 200–400 нм в кварцевой кювете (Hellma Analytics, Германия). Исходные образцы разбавляли буферным раствором (pH 7.4) до концентрации ФХ 20 мкМ.

Флуоресцентная спектроскопия. Измерение флуоресценции проводили на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (Agilent Technologies, США), спектры флуоресценции регистрировали при температуре (25 ± 0.1)°C в кювете длиной 1 см. Спектры эмиссии измеряли при длине волны возбуждения 280 нм в диапазоне 290–555 нм с шагом 1 нм. Концентрацию белка поддерживали постоянной (20 мкМ, фосфатный буфер pH 7.4), концентрацию ФХ варьировали в диапазоне 10–200 мкМ.

Спектры кругового дихроизма регистрировали с помощью спектрометра J-815 (Jasco, Япония), оснащенного термостатируемой ячейкой. Измерения проводили в диапазоне длин волн 200–260 нм при 25°C в кварцевой кювете (длина 1 мм). Спектры получали пятикратным сканированием с шагом 1 нм. Обработку спектров проводили с помощью CD Spectroscopy Deconvolution Software (CDNN program version 2, Dr. Gerald Böhm, Magdeburg), используя для деконволюции и анализа 33 базовых спектра.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые исследовано влияние структуры фторхинолонов и комплексообразования ФХ с М-β-ЦД на взаимодействие лекарственной формуляции с ЧСА. Установлено, что химическая структура ФХ значительным образом влияет на связывание лекарственной молекулы с ЧСА, а также сказывается на различном влиянии М-β-ЦД на эти взаимодействия.

Методами КД и флуоресцентной спектроскопии было показано, что более гидрофобная молекула ЦФ сильнее взаимодействует с ЧСА, чем сходная ей молекула ЛВ, имеющая в своей структуре морфолиновый фрагмент вместо циклопропанила в *пара*-положении атома фтора. Так, методом флуоресцентной спектроскопии было установлено, что присутствие ЦФ обусловливает более выраженное тушение спектра эмиссии белка ($K_{ШФ}$ (ЦФ–ЧСА) = (2.9 ± 0.2) × 10^5), чем ЛВ ($K_{ШФ}$ (ЛВ–ЧСА) = (2.2 ± 0.2) × 10^5). С помощью метода КД-спектроскопии было показано, что ЛВ оказывает меньшее влияние на вторичную структуру белка, чем ЦФ. Это дает основания полагать, что связывание ФХ с ЧСА происходит в том числе и за счет гидрофобных взаимодействий.

Продемонстрировано уменьшение констант Штерна–Фольмера и влияния лекарственных формуляций на вторичную структуру альбумина при взаимодействии ЧСА с ФХ, связанных в комплекс с М-β-ЦД. Данный эффект сильнее проявляется в системе, содержащей ЦФ, что, по всей видимости, объясняется погружением молекулы ФХ в гидрофобную полость М-β-ЦД, приводящим к блокированию карбоксильной группы и ароматического остова ЦФ для взаимодействия с ЧСА. Напротив, в случае комплексообразования М-β-ЦД с ЛВ, благодаря наличию морфолинового фрагмента в структуре ФХ, анионная группа ЛВ оказывается снаружи молекулы-хозяина, что обусловливает ее доступность для связывания с ЧСА. Из этого можно сделать вывод, что именно карбоксильные группы молекул обеспечивают взаимодействие лекарств с альбумином. Данные выводы согласуются с тем, что ЧСА преимущественно взаимодействует с анионными кислотными молекулами [9]. Образование комплекса ФХ–М-β-ЦД приводит к изменению механизма взаимодействия препарата с ЧСА и оказывает

влияние на скорость высвобождения данных систем из модельной диализной мембраны. Следовательно, комплексообразование может приводить к изменению фармакокинетических и фармакодинамических свойств ФХ. Таким образом, впервые была установлена роль М-β-ЦД во взаимодействиях лекарственных молекул с ЧСА.

Данные результаты представляют большой интерес для создания систем доставки лекарственных препаратов с контролируемой скоростью высвобождения. Комплексообразование с ЧСА позволяет варьировать физико-химические свойства молекул, что дает возможность управлять фармакокинетическими и фармакодинамическими свойствами лекарства, способствовать уменьшению проявления побочных эффектов, увеличению активности лекарственных молекул, что крайне важно для планирования грамотной терапии с длительным применением антибактериальных препаратов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Van Bambeke F., Michot J.-M., Van Eldere J., Tulkens P.M.* // Clin. Microbiol. Infect. 2005. V. 11. P. 256–280. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01131.x
2. *Talley J.H.* // Postgrad. Med. 1991. V. 89. P. 101–113. https://doi.org/10.1080/00325481.1991.11700788
3. *Wolfson J.S., Hooper D.C.* // Clin. Microbiol. Rev. 1989. V. 2. P. 378–424. https://doi.org/10.1128/CMR.2.4.378
4. *Campoli-Richards D.M., Monk J.P., Price A., Benfield P., Todd P.A., Ward A.* // Drugs. 1988. V. 35. P. 373–447. https://doi.org/10.2165/00003495-198835040-00003
5. *Скуредина А.А., Ле-Дейген И.М., Упоров И.В., Кудряшова Е.В.* // Коллоидный журнал. 2017. № 5. P. 627–635. https://doi.org/10.7868/s0023291217050135
6. *Skuredina A.A., Kopnova T.Y., Le-Deygen I.M., Kudryashova E.V.* // Moscow Univ. Chem. Bull. 2020. V. 75. P. 218–224. https://doi.org/10.3103/S0027131420040069
7. *Скуредина А.А., Ле-Дейген И.М., Кудряшова Е.В.* // Коллоидный журнал. 2018. № 3. P. 330–337. https://doi.org/10.7868/s0023291218030102
8. *Le-Deygen I.M., Skuredina A.A., Uporov I.V., Kudryashova E.V.* // Anal. Bioanal. Chem. 2017. V. 409. P. 6451–6462. https://doi.org/10.1007/s00216-017-0590-5
9. *Fanali G., di Masi A., Trezza V., Marino M., Fasano M., Ascenzi P.* // Mol. Aspects Med. 2012. V. 33. P. 209–290. https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.12.002
10. *He X.M., Carter D.C.* // Nature. 1992. V. 358. P. 209–215. https://doi.org/10.1038/358209a0
11. *Sugio S., Kashima A., Mochizuki S., Noda M.* // Protein Eng. 1999. V. 12. P. 439–446. https://doi.org/10.1093/protein/12.6.439
12. *Varshney A., Ansari Y., Zaidi N., Ahmad E., Badr G., Alam P., Khan R.H.* // Cell Biochem. Biophys. 2014. V. 70. P. 93–101. https://doi.org/10.1007/s12013-014-9863-1
13. *Varshney A., Sen P., Ahmad E., Rehan M., Subbarao N., Khan R.H.* // Chirality. 2010. V. 22. P. 77–87. https://doi.org/10.1002/chir.20709
14. *Sudlow G., Birkett D.J., Wade D.N.* // Mol. Pharmacol. 1975. V. 11. P. 824–832.
15. *Trynda-Lemiesz L.* // Bioorg. Med. Chem. 2004. V. 12. P. 3269–3275. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.03.073
16. *Davis R., Markham A., Balfour J.A.* // Drugs. 1996. V. 51. P. 1019–1074. https://doi.org/10.2165/00003495-199651060-00010
17. *Blokhina S.V., Sharapova A.V., Ol'khovich M.V., Volkova T.V., Perlovich G.L.* // Eur. J. Pharm. Sci. 2016. V. 93. P. 29–37. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.07.016
18. *Davis R., Bryson H.M.* // Drugs. 1994. V. 47. P. 677–700. https://doi.org/10.2165/00003495-199447040-00008
19. *Valeur B.* // Encyclopedia of Applied Spectroscopy. Publishing GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2009. P. 477–531.
20. *Скуредина А.А., Копнова Т.Ю., Якупова Л.Р., Ле-Дейген И.М., Кудряшова Е.В.* // Биотехнология. 2020. Т. 36. № 6. С. 24–29. https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-6-149-154
21. *Ghuman J., Zunszain P.A., Petitpas I., Bhattacharya A.A., Otagiri M., Curry S.* // J. Mol. Biol. 2005. V. 353. P. 38–52. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.075
22. *Кудряшова Е.В., Гладилин А.К., Левашов А.В.* // Усп. биол. химии. 2002. Т. 42. С. 257–294.
23. *Yan J., Wu D., Ma X., Wang L., Xu K., Li H.* // Carbohydr. Polym. 2015. V. 131. P. 65–74. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.037
24. *Poureshghi F., Ghandforoushan P., Safarnejad A., Soltani S.* // J. Photochem. Photobiol. B Biol. 2017. V. 166. P. 187–192. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.09.046
25. *Zhang G., Ma Y.* // Food Chem. 2013. V. 136. P. 442–449. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.026

26. *Varlan A., Ionescu S., Hillebrand M.* // Luminescence. 2011. V. 26. P. 710–715. https://doi.org/10.1002/bio.1302

27. *Dockal M., Carter D.C., Rüker F.* // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 3042–3050. https://doi.org/10.1074/jbc.275.5.3042

28. *Anand U., Mukherjee S.* // Phys. Chem. Chem. Phys. 2013. V. 15. P. 9375. https://doi.org/10.1039/c3cp50207d

29. *Kaur A., Khan I.A., Banipal P.K., Banipal T.S.* // Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 2018. V. 191. P. 259–270. https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.10.017

30. *Lindup W.E., Orme M.C.* // Br. Med. J. (Clin. Res. Ed). 1981. V. 282. P. 212–214. https://doi.org/10.1136/bmj.282.6277.1707-b

31. *Schmidt S., Gonzalez D., Derendorf H.* // J. Pharm. Sci. 2010. V. 99. P. 1107–1122. https://doi.org/10.1002/jps.21916

The Effect of Methyl-β-Cyclodextrin on the Interaction of Fluoroquinolones with Human Serum Albumin

L. R. Yakupova*, #, T. Yu. Kopnova*, A. A. Skuredina*, and E. V. Kudryashova*

#Phone: +7 (977) 713-21-54; e-mail: Yakupova.Linara@mail.ru

**Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/3, Moscow, 119991 Russia*

The influence of the structure of fluoroquinolones (on the example of ciprofloxacin and levofloxacin) and their complexation with methyl-β-cyclodextrin on the interaction of the drug with human serum albumin was studied. It was found that the binding of the drug molecule with albumin is significantly affected by the structure of fluoroquinolone, as well as the presence of methyl-β-cyclodextrin. It was discovered that of the two fluoroquinolones, the more hydrophobic ciprofloxacin molecule interacts more strongly with the protein, using circular dichroism and fluorescence spectroscopy methods. It has also been shown that binding of albumin to the drug causes quenching of protein fluorescence, and this effect is more pronounced for ciprofloxacin. The complexation of fluoroquinolones with methyl-β-cyclodextrin leads to a change in the mechanism of the interaction of fluoroquinolones with the protein: in the case of complexes, more pronounced interactions are observed for levofloxacin. The results obtained will help to bring the use of fluoroquinolones to a new level in clinical practice, by creating new highly effective drugs with improved properties.

Keywords: human serum albumin, fluoroquinolones, methyl-β-cyclodextrin, fluorescence spectroscopy

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2022, том 48, № 1, с. 109–114

УДК 57.08:578.56

ДИАГНОСТИКА РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОРМЫ ВИРУСА ГЕПАТИТА С RF1_2k/1b С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОЧИПА, ФУНКЦИОНИРУЮЩЕГО ПО ПРИНЦИПУ “МНОГО ЗОНДОВ/ОДИН СПОТ”

© 2022 г. В. А. Рябинин*, #, И. А. Акимов, А. Н. Синяков*, Н. П. Пичко*, М. К. Иванов**, *****

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

***АО “Вектор-Бест”, 630117 Новосибирск, Россия*

****Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8/2*

Поступила в редакцию 18.03.2021 г.
После доработки 10.04.2021 г.
Принята к публикации 19.04.2021 г.

Используемый в рутинной практике генотипический анализ, основанный только на одном локусе генома, не позволяет детектировать рекомбинантные формы вирусов с высокой степенью вариабельности генома в районе точки рекомбинации. На примере рекомбинантной формы RF1_2k/1b вируса гепатита С нами показана возможность ее определения с использованием подхода “много зондов/один спот”. Анализ клинических образцов сыворотки крови показал, что данный подход дает возможность провести однозначное отнесение выявленного в этих образцах вируса гепатита С к субтипам 2k, 1b или их рекомбинанту RF1_2k/1b.

Ключевые слова: вирус гепатита С, рекомбинант RF1_2k/1b, “много зондов/один спот”, микрочип, POC-диагностика

DOI: 10.31857/S0132342322010092

ВВЕДЕНИЕ

По данным ВОЗ, в мире ~71 млн человек инфицировано вирусом гепатита С (ВГС). Ежегодно регистрируют ~2 млн новых случаев заражения, а от осложнений хронического гепатита С ежегодно умирают почти 400 тыс. человек [1]. С момента открытия ВГС его генетическое разнообразие ученые связывали лишь с высокой частотой возникновения мутаций, накапливаемых в геноме. Однако в 2002 г. в России впервые была обнаружена циркулирующая рекомбинантная форма ВГС, названная RF1_2k/1b [2]. Установлено, что данная форма возникла на территории бывшего СССР (по одним данным, в период с 1923 по 1956 гг. [3], а по другим – с 1957 по 1970 гг. [4]) в результате индивидуального рекомбинационного события. Все структурные гены этого рекомбинанта относятся к субтипу 2k, а неструктурные, начиная с точки рекомбинации и далее в направлении области 3'-UTR – к субтипу 1b. Циркулирующая рекомбинантная форма ВГС RF1_2k/1b была впоследствии обнаружена в Грузии, Узбекистане, Ирландии, Франции, Германии, Кипре, Израиле и Греции [5–9]. Правильное и своевременное выявление рекомбинантной формы ВГС RF1_2k/1b – необходимое условие для назначения эффективной терапии [10–13].

Определение рекомбинантной формы ВГС RF1_2k/1b, базирующееся только на анализе локусов 5'-UTR или *Core* генома ВГС, – недостаточно и требует либо внедрения двухлокусного анализа с добавлением в исследование неструктурных генов (например, *NS5b*), либо их секвенирования по методу Сэнгера [14–16]. Это подтверждается анализом образцов сыворотки крови пациентов (республика Башкортостан), инфицированных ВГС. При использовании коммерческих тест-систем ВГС, выявленный в этих образцах, был отнесен к генотипу 2. В действительности ~20% из них – рекомби-

Сокращения: ВГС – вирус гепатита С; MPOS – “много зондов/один спот” (many probes/one spot); UTR – нетранслируемая область (untranslated region).

Автор для связи (тел.: (3832) 363-51-73, эл. почта: ryabinin@niboch.nsc.ru).

нантная форма RF1_2k/1b [17]. Подобрать на район точки рекомбинации общий для всех изолятов олигонуклеотидный TaqMan-зонд для детекции рекомбинанта RF1_2k/1b методом ОТ-ПЦР в реальном времени не представляется возможным из-за высокой вариабельности этих последовательностей [17].

Ранее нами на примере типирования с применением микрочипов вируса гриппа А [18, 19], вируса оспы [20] и ряда урогенитальных инфекций [21] была показана эффективность использования подхода "много зондов/один спот" (MPOS-подход). Сущность его заключается в том, что при одновременном наличии в пределах одного спота нескольких типирующих зондов существенно повышается как специфичность, так и чувствительность метода. Это обусловлено связыванием анализируемой ДНК со всеми или большей частью зондов спота с высокой степенью кооперативности [20]. Мы предположили, что MPOS-подход на микрочипе или более простой в техническом отношении его вариант (например, биосенсор) позволит определить рекомбинантную форму ВГС RF1_2k/1b. Полагая, что выбрав два набора характерных зондов (один для 2k-области, а второй для 1b-области), можно определить, к какому субтипу относится анализируемый изолят – 2k, 1b или рекомбинанту RF1_2k/1b.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе были использованы ампликоны, полученные ранее в результате ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием РНК, выделенной из образцов сыворотки крови пациентов, инфицированных вирусом гепатита С субтипов 1b, 2k и рекомбинантом RF1_2k/1b [17]. Для расчета зондов были использованы олигонуклеотидные последовательности 47 ампликонов, отнесенных Акимовым с соавт. [17] к рекомбинанту RF1_2k/1b. Расчет и отбор зондов проводили с использованием компьютерной программы, созданной ранее для расчета зондов для типирования вируса гриппа А [22]. Протяженность зондов составляла 14 оснований, т.к. таковая оказалась оптимальной при использовании MPOS-подхода [20]. Вариабельность олигонуклеотидных последовательностей секвенированных ампликонов весьма высока, и найти даже небольшое число зондов, характерных для большинства изолятов, затруднительно [17]. Поэтому отбор проводили таким образом, чтобы зонд был характерен не менее чем для 15% ампликонов. В итоге для 2k-региона было отобрано 13 зондов, а для 1b-региона – 11 зондов. В табл. 1 приведены структуры зондов и их встречаемость в проанализированных ампликонах. На 3'-конце эти зонды содержали необходимый для иммобилизации аминогексильный линкер.

Для каждого из 47 рассмотренных ампликонов есть от 3 до 6 характерных последовательностей как для 1b-, так и для 2k-региона. Каждый из рассчитанных зондов содержится в 15–78% анализируемых последовательностей (табл. 1). Ниже в качестве примера приведена одна из последовательностей (Sample_14_Rec). Левее точки рекомбинации (отмечена подчеркиванием) серым выделены последовательности, характерные для субтипа 2k (пять последовательностей), правее – характерные для субтипа 1b (пять последовательностей).

Таблица 1. Типирующие зонды и их встречаемость в проанализированных ампликонах

2k-зонды		1b-зонды	
последовательность (5'-3')	встречаемость, %	последовательность (5'-3')	встречаемость, %
GCTGTAAGACATCT	52	CTGCGGGACTGGGC	78
AGGTGGCAAGTACG	44	CCCGTCTCCGCCCG	22
TGCTGTAAGACATC	44	ACTGCGGGACTGGG	75
CAGGTGGCAAGTAC	48	GAAGGGCAGGGGTG	22
CAAGCTCTGTTGAG	70	CACTGCGGGACTGG	75
GCGCAAGCTCTGTT	74	TCTGACATGGAGAC	22
GACTGGCACCTACA	67	TCTGACATGGAGAC	75
GAGTGTCCTGACAA	59	GGGAGGGAGATACT	22
TGCTAACCCTTGGT	52	TACTCCCAACAGAC	75
GTCAGAGCGCAAGC	74	ACCGCGGCGTGTGG	26
GGACTGGCACCTAC	66	GGGGAGGGAGATAG	66
CGTCAGAGCGCAAG	70		
CCTGACAAGAACGC	15		

TGTCCTGACAAGAACGCCATACTTCGTCAGAGCGCAAGCCCTGTTGAGGATATGTGCC
GCTGTTAAACATCTCTCAGGTGGCAAGTACGCCCAGATGATGCTGCTAACCCTTGGTAA
ATGGACTGGCACCTACATT**TATGAC**CATCTCACTCCACTGCGGGACTGGGCTCACGTG
GGCCTACGAGACCTTGCGGTGGCAGTCGAGCCTGTTGTCTTCTCTGACATGGAGACCA
AGATCATCACCTGGGGGGCAGACACCGCGGCGTGTGGGGACRTCATCCTGGGCTTGCC
CGTCTCCGCCCGAAGGGGGAGGGAGATACTTCTGGGCCCGGCCGATAGCTTTGAAGGG
CAGGGGTGGCGGCTCCTTGCACCTATCACGGCTTACTCCCAACAGACGCGGGGTCTAC
TTGGCTGCATCATCACTAGCCTCACAGGCC

Следует отметить, что данный набор зондов пригоден и для характеризации рекомбинантов, не использованных при расчете, а взятых из базы данных GenBank по рекомбинантам, выявленным не только в России, но и других странах: Узбекистане, Австрии, Ирландии, Кипре, Израиле, Греции и др. Например, изолят, описанный в 2011 г. на Кипре (GenBank: HQ537005.1), характеризуется пятью 2k-зондами и шестью 1b-зондами. Первый из обнаруженных рекомбинантов, выделенный в Санкт-Петербурге (Россия) в 2001 г. (GenBank: AY070215.1), определяется тремя и пятью зондами соответственно. Аналогичная картина наблюдается и для других изолятов рекомбинанта ВГС RF1_2k/1b, представленных в базе данных NCBI. Поэтому можно полагать, что этот набор зондов может быть использован для выявления рекомбинантов ВГС RF1_2k/1b из других географических источников и в достаточно широком временном интервале. Для экспериментальной проверки рассчитанного набора зондов (табл. 1) был сформирован микрочип (рис. 1), в котором споты для определения генотипа 2k содержали все 13 зондов, относящихся к генотипу 2k, а споты для определения генотипа 1b – все 11 зондов, относящихся к генотипу 1b.

При гибридизация ампликона генотипа 1b наблюдается флуоресценция спотов, содержащих смесь зондов для определения этого генотипа (рис. 1*б*). Флуоресценция спотов, содержащих смесь зондов для определения генотипа 2k, невелика и близка к таковой для контроля неспецифического связывания и буферного раствора. Соотношение уровней флуоресценции спотов, соответствующих генотипам 1b и 2k, составляет ~93 : 1. Для других образцов это соотношение варьируется от 29 до 210 раз (среднее значение 90 для 18 образцов).

Вирус гепатита С субтипа 2k встречается существенно реже, и нам был доступен лишь один изолят. Следует отметить, что и в литературе, и в базе NCBI данных по нуклеотидным последовательностям гена *NS2* для субтипа 2k гораздо меньше, чем для субтипа 1b и рекомбинанта RF1_2k/1b. Чуб с соавт. [4] полагают, что это обусловлено приобретением рекомбинантом RF1_2k/1b неструктурной части генома, содержащей гены, кодирующие репликативный комплекс, от родительского субтипа 1b, что дало ему преимущество в распространении по сравнению с субтипом 2k. На рис. 1*в* приведена картина гибридизации для ампликона, полученного из изолята ВГС субтипа 2k. Соотношение уровней флуоресценции спотов, соответствующих субтипам 2k и 1b, составляет ~8 : 1.

Полученные результаты гибридизации по индивидуальным субтипам 1b и 2k показывают, что выбранные наборы олигонуклеотидных зондов позволяют проводить однозначное определение этих субтипов ВГС.

На рис. 1*г* приведена картина гибридизации ампликона ВГС рекомбинанта RF1_2k/1b (Sample_14_Rec). Значения флуоресценции типирующих спотов на субтипы 1b и 2k близки, что позволяет провести однозначное отнесение этого изолята к рекомбинанту RF1_2k/1b. Для других рекомбинантных изолятов наблюдается аналогичная картина. Соотношение флуоресценции спотов, соответствующих генотипам 2k и 1b, варьируется от образца к образцу в интервале 0.56–1.44 (среднее значение 0.94 для 47 образцов) и определяется количеством зондов, комплементарных анализируемой последовательности, прочностью дуплекса, образованного этими зондами, и последовательностью ампликона, что отмечалось в работе Kostina et al. [20].

Таким образом, близкие по значению уровни флуоресценции спотов, содержащих смесь типирующих зондов на субтипы 2k и 1b, указывают на наличие в анализируемом образце рекомбинантной формы ВГС RF1_2k/1b. Если же уровни флуоресценции типирующих спотов на субтипы 2k и 1b весьма существенно различаются, то ВГС относится либо к субтипу 2k, либо к субтипу1b.

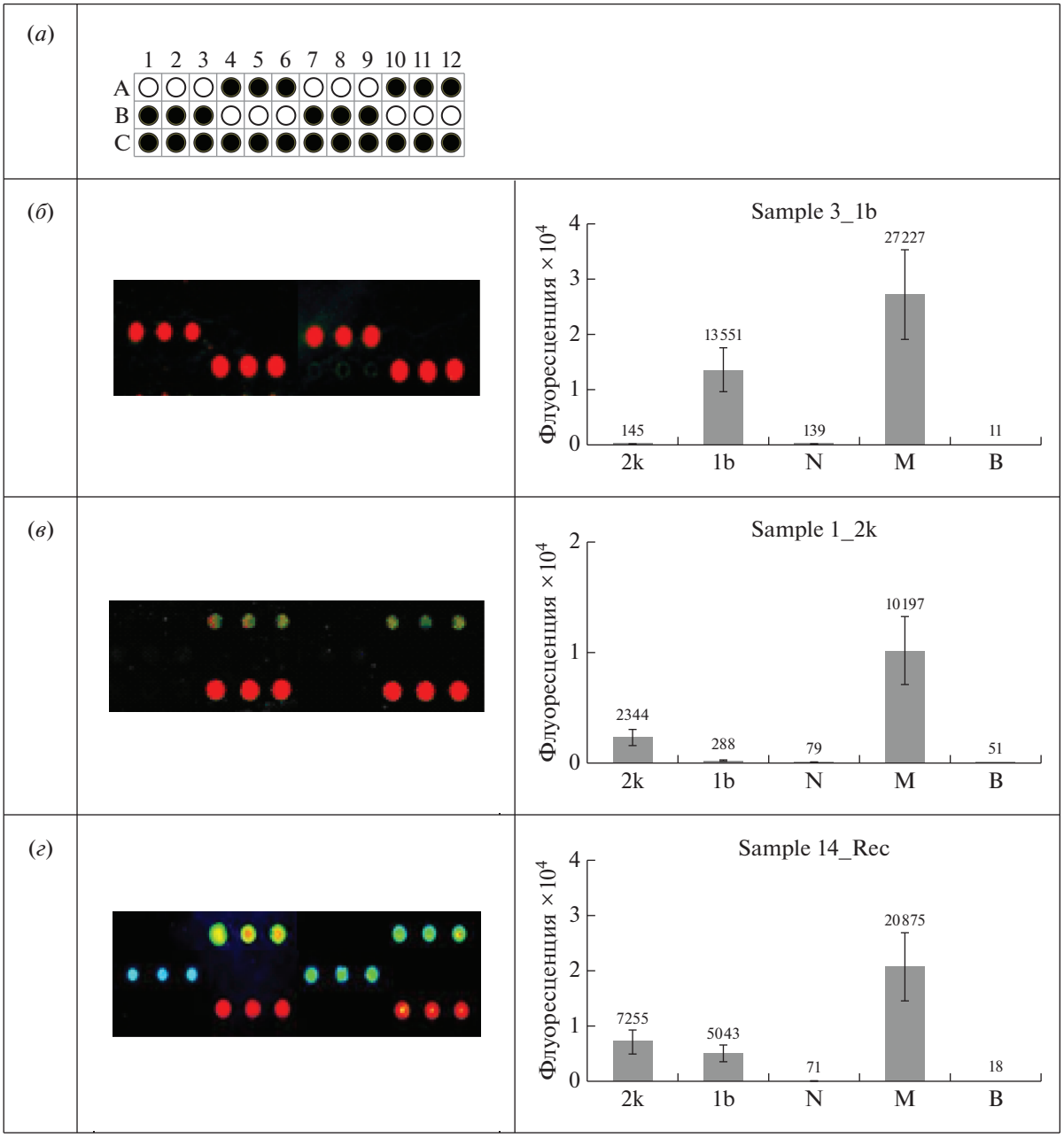


Рис. 1. (*а*) – Дизайн микрочипа: A4–A6, A10–A12 – смесь 2k-зондов (2k); B1–B3, B7–B9 – смесь 1b-зондов (1b); C1–C3, C7–C9 – 5'-AGAGAGAGAGAGAG-3' (контроль неспецифического связывания [23]) (N); C4–C6, C10–C12 – маркер ($(dC)_{30}$-биотин) (M); A1–A3, A7–A9, B4–B6, B10–B12 – буфер для печати (B); картина гибридизации ампликонов вируса гепатита С генотипа 1b (*б*); генотипа 2k (*в*) и рекомбинанта RF1_2k/1b (*г*).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Олигонуклеотидные зонды были синтезированы в ИХБФМ СО РАН на автоматическом восьмиколоночном синтезаторе ASM-800 (ООО "Биоссет", Новосибирск) по стандартной методике с введением по 3'-концу олигонуклеотида С6-аминолинкера, необходимого для иммобилизации зондов. Печать микрочипов осуществляли на стеклянных эпокси-слайдах (Tekdon, США) методом контактной печати на споттере Odissey Calligrapher (Bio-Rad, США) пином 360 мкм. При печати микрочипов смесевые споты содержали все 13 зондов, относящихся к генотипу 2k, и все 11 зондов, относящихся к генотипу 1b. Печать осуществляли по методике, описанной в работе Kostina et al. [20], с использованием эквимолярных количеств зондов с одинаковой конечной суммарной концентрацией 80 нм/мл. Смесевые споты, а также споты буфера для печати, контро-

Таблица 2. Праймеры, использованные для наработки ампликонов

Субтип вируса гепатита С	Последовательность праймера (5'-3')
1b	F: TCTTTGACATCACCAAACTYYT
	F: ATCTTTGCCATCACCAAAATYYT
	R: Биотин-TCGACCTGGTTCYTGTCC
	R: Биотин-CCTCAACCTGGTTTTTGTCC
2k	F: GTTTGACATAACCAAGTGGCT
	R: Биотин-GCCTGTTCTGTCTTGTCG
	R: Биотин-GCTTGTTCCGTCTTGTCA
	R: Биотин-GCCTGTTCTGTCCTGTCA
2k/1b	F: GTTTGACATAACCAAGTGGCT
	R: Биотин-TCGACCTGGTTCYTGTCC

ля неспецифического связывания и маркера печатали в шести повторах (рис. 1).

В настоящей работе исследовали образцы сыворотки крови пациентов, инфицированных вирусом гепатита С, субтип которых был подтвержден секвенированием Акимовым с соавт. [17]. Всего было проанализировано 18 образцов ВГС субтипа 1b, 1 образец субтипа 2k и 47 образцов рекомбинанта RF1_2k/1b. Наработку ампликонов для гибридизации проводили по методикам, описанным в работе Акимова с соавт. [17], с использованием праймеров, последовательности которых приведены в табл. 2. Для получения преимущественно одноцепочечной ДНК, содержащей биотиновую метку, проводили ПЦР в асимметричном режиме [20].

Процедура гибридизации ампликонов и обработки слайда конъюгатом стрептавидин-Cy5, связывающимся с биотиновой меткой ампликона, была аналогична описанной в работе Kostina et al. [20]. После отмывки слайда флуоресценцию спотов регистрировали на сканере ScanArray Express 2.0 (PerkinElmer, США) при длине волны возбуждающего лазера 633 нм. Изображение анализировали с использованием программы ScanArray Express, входящей в математическое обеспечение сканера. Уровень флуоресценции определяли как среднее значение флуоресценции шести спотов микрочипа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере рекомбинантной формы RF1_2k/1b вируса гепатита С нами изучена возможность использования подхода “много зондов/один спот” для ее выявления. Анализ клинических образцов сыворотки крови показал, что данный подход дает возможность провести однозначное отнесение выявленного в этих образцах вируса гепатита С к субтипам 2k, 1b или их рекомбинанту RF1_2k/1b. Результаты, полученные с использованием микрочипов, при соответствующем техническом решении могут быть использованы для создания биосенсора для типирования различных субтипов вируса гепатита С.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hepatitis C. World Health Organization. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c
2. *Kalinina O., Norder H., Mukomolov S., Magnius L.O.* // J. Virol. 2002. V. 76. P. 4034–4043. https://doi.org/10.1128/JVI.76.8.4034-4043.2002
3. *Raghwani J., Thomas X.V., Koekkoek S.M., Schinkel J., Molenkamp R., van de Laar T.J., Takebe Y., Tanaka Y., Mizokami M., Rambaut A., Pybus O.G.* // J. Virol. 2012. V. 86. P. 2212–2220. https://doi.org/10.1128/JVI.06184-11
4. *Чуб Е.В., Сиволобова Г.Ф., Нетесов С.В., Кочнева Г.В.* // Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2019. Т. 37. С. 64–75. https://doi.org/10.17116/molgen20193702164
5. *Morel V., Fournier C., Francois C., Brochot E., Helle F., Duverlie G., Castelain S.* // J. Viral Hepat. 2011. V. 18. P. 77–83. https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2010.01367.x
6. *Susser S., Dietz J., Schlevogt B., Zuckerman E., Barak M., Piazzolla V., Howe A., Hinrichsen H., Passmann S., Daniel R., Cornberg M., Mangia A., Zeuzem S., Sarrazin C.* // J. Hepatol. 2017. V. 67. P. 680–686. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.05.027
7. *Gonzalez-Candelas F., Lopez-Labrador F.X., Bracho M.A.* // Viruses. 2011. V. 3. P. 2006–2024. https://doi.org/10.3390/v3102006
8. *Kurbanov F., Tanaka Y., Avazova D., Khan A., Sugauchi F., Kan N., Kurbanova-Khudayberganova D., Khikmatullaeva A., Musabaev E., Mizokami M.* // Hepatol. Res. 2008. V. 38. P. 457–464. https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2007.00293.x
9. *Kassela K., Karakasiliotis I., Kokkiou E., Souvalidou F., Mimidis P., Veletza S., Panopoulou M., Koskinas J., Mimidis K., Mavromara P.* // Ann. Gastroenterol. 2019. V. 32. P. 88–92. https://doi.org/10.20524/aog.2018.0322
10. *Hedskog C., Doehle B., Chodavarapu K., Gontcharova V., Crespo G.J., De Knegt R., Drenth J.P., McHutchison J.G., Brainard D., Stamm L.M., Miller M.D., Svarovskaia E.,*

Mo H. // Hepatology. 2015. V. 61. P. 471–480. https://doi.org/10.1002/hep.27361

11. *Karchava M., Chkhartishvili N., Sharvadze L., Abutidze A., Dvali N., Gatserelia L., Dzigua L., Bolokadze N., Dolmazashvili E., Kotorashvili A., Imnadze P., Gamkrelidze A., Tsertsvadze T.* // Hepatol. Res. 2018. V. 48. P. 36–44. https://doi.org/10.1111/hepr.12890
12. *Peiffer K.H., Kuhnhenn L., Stelzl E., Dietz J., Susser S., Tal A.O., Finkelmeier F., Zuckerman E., Cornberg M., Barak M., Piazzolla V., Mangia A., Zeuzem S., Kessler H.H., Vermehren J., Sarrazin C.* // J. Clin. Microbiol. 2019. V. 57. P. e00060-19. https://doi.org/10.1128/JCM.00060-19
13. *Mourez T., Decroos A., Goria O., Montialoux H., De Oliveira F., Larrat S., Plantier J.-S., Riachi G.* // J. Med. Virol. 2018. V. 90. P. 994–997. https://doi.org/10.1002/jmv.25035
14. *Schuermans W., Orlent H., Desombere I., Descheemaeker P., Van V.H., Geerts A., Verhelst X., Marijke Reynders M., Padalko E.* // Int. J. Mol. Sci. 2016. V. 17. P. 1384. https://doi.org/10.3390/ijms17091384
15. *De Keukeleire S., Descheemaeker P., Reynders M.* // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2015. V. 82. P. 201–202. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.04.001
16. *De Keukeleire S., Descheemaeker P., Reynders M.* // Int. J. Infect. Dis. 2015. V. 41. P. 1–2. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.10.010
17. *Акимов И.А., Тимофеев Д.И., Мавзютов А.Р., Иванов М.К.* // Клин. лаб. диагностика. 2021. Т. 66. С. 122–128. https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-122-128
18. *Костина Е.В., Рябинин В.А., Максакова Г.А., Синяков А.Н.* // Биоорг. химия. 2012. Т. 38. С. 676–682. [*Kostina E.V., Ryabinin V.A., Maksakova G.A., Sinyakov A.N.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2012. V. 38. P. 599–604.] https://doi.org/10.1134/s1068162012060052
19. *Рябинин В.А., Костина Е.В., Синяков А.Н.* // Биоорг. химия. 2013. Т. 39. С. 378–380. [*Ryabinin V.A., Kostina E.V., Sinyakov A.N.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2013. V. 39. P. 338–340.] https://doi.org/10.1134/S1068162013030126
20. *Kostina E.V., Sinyakov A.N., Ryabinin V.A.* // Anal. Bioanal. Chem. 2018. V. 410. P. 5817–5823. https://doi.org/10.1007/s00216-018-1190-8
21. *Kostina E.V., Sinyakov A.N., Ryabinin V.A.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 842–844. https://doi.org/10.1134/S1068162019060244
22. *Ryabinin V.A., Kostina E.V., Maksakova G.A., Neverov A.A., Chumakov K.M., Sinyakov A.N.* // PLoS One. 2011. V. 6. P. e17529. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017529
23. *Franke-Whittle I.H., Klammer S.H., Insam H.* // J. Microbiol. Methods. 2005. V. 62. P. 37–56. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.01.008

Hepatitis C Virus RF1_2k/1b Chimeras and a "Many Probes/One Spot" Approach to Their Identification

V. A. Ryabinin*, #, I. A. Akimov, A. N. Sinyakov*, N. P. Pichko*, and M. K. Ivanov**, *****

#Phone: +7 (3832) 363-51-73; e-mail: ryabinin@niboch.nsc.ru

**Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, prosp. Akad. Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

***Vector-Best, PO Box 492, Novosibirsk, 630117 Russia*

****Institute of Molecular and Cellular Biology, prosp. Akad. Lavrentieva 8/2, Novosibirsk, 630090 Russia*

The routinely used genotyping procedure, which is based on only one genomic locus, does not allow to identify recombinant strains of viruses that have high genome variability in the region of a recombination point. Using recombinant strain RF1_2k/1b of hepatitis C virus as an example, we demonstrated the feasibility of its identification via a many probes/one spot approach. The proposed scheme was employed for subtyping of hepatitis C virus clinical samples of blood serum and was found to enable unambiguous assignment of these isolates to subtype 2k or 1b or their recombinant RF1_2k/1b.

Keywords: hepatitis C virus, RF1_2k/1b chimera, many probes/one spot, microarray, point-of-care diagnostics

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2022, том 48, № 1, с. 115–126

УДК 577.125.54:616.832:543.51

ИЗМЕНЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА СФИНГОМИЕЛИНА И ЦЕРАМИДА В СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО И СПИННОГО МОЗГА ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ ЛИНИИ FUS (FUS(1-359)), МОДЕЛИРУЮЩИХ БОКОВОЙ АМИОТРОФИЧЕСКИЙ СКЛЕРОЗ

© 2022 г. М. А. Шупик*, У. А. Гутнер*, А. А. Устюгов, А. П. Резвых***, С. Ю. Фуников***, О. А. Малошицкая****, С. А. Соколов****, А. Т. Лебедев****, А. В. Алесенко*, #**

**Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Косыгина, 4*

***Институт физиологически активных веществ РАН, Россия 142432 Черноголовка, Северный проезд, 1*

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

*****Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва, Ленинские горы, 3*

Поступила в редакцию 11.03.2021 г.
После доработки 22.03.2021 г.
Принята к публикации 26.03.2021 г.

Обнаружены изменения экспрессии генов ферментов метаболизма сфинголипидов у трансгенных мышей линии FUS (FUS(1-359)), моделирующих боковой амиотрофический склероз (БАС). Проанализированы профили молекулярных видов сфингомиелинов (СМ) и церамидов (ЦЕР) в структурах головного мозга и в спинном мозге. В процессе развития БАС изменения в спектре молекулярных видов ЦЕР отмечены только в спинном мозге, где уровни практически всех ЦЕР снижаются по отношению к контролю через 2 и 3 месяца течения заболевания. Через 4 месяца развития патологии наблюдается повышение экспрессии гена кислой церамидазы, в результате чего может образовываться сфингозин, обладающий выраженными проапоптотическими свойствами. Анализ экспрессии генов ферментов обмена ЦЕР и галактозилцерамида (ГалЦер) указывает на возможность участия ГалЦЕР в качестве источника для поддержания уровня ЦЕР на терминальной стадии БАС. Таким образом, метаболизм сфинголипидов представляет собой перспективную область исследования процессов, связанных с БАС, как в контексте поиска потенциальных диагностических маркеров и эффективных лекарственных средств, так и для объяснения патогенеза БАС.

Ключевые слова: боковой амиотрофический склероз, трансгенные мыши линии FUS(1-359), сфингомиелин, церамид, церамидазы, галактозилцерамидаза, галактозилцерамидсинтаза

DOI: 10.31857/S0132342322010134

ВВЕДЕНИЕ

Боковой амиотрофический склероз (БАС) – неизлечимое мультисистемное нейродегенеративное заболевание, поражающее главным образом верхние и нижние двигательные нейроны центральной нервной системы. Потеря этих групп нейронов приводит к неуклонно нарастающей мышечной слабости и атрофии, а в конечном итоге – к гибели пациента в течение 3–5 лет после постановки диагноза, в основном вследствие паралича дыхательных путей. Около 90% всех случаев БАС имеют неизвестную этиологию и классифицируются как спорадические, остальные 10% – наследственные формы БАС [1]. Число больных БАС в мире неуклонно растет из-за старения населения (характерный возраст начала заболевания – 50–75 лет) и к 2040 г. предположительно составит ~400 тыс. человек [2].

Генетический фон БАС исключительно разнообразен. С БАС ассоциированы ~30 генов [3]. Наиболее распространены мутации в генах *C9orf72*, *SOD1*, *TDP-43* и *FUS*. В европейских популяциях чаще встречаются мутации *C9orf72* (наследственная форма БАС – 33.7% и спорадическая –

Сокращения: БАС – боковой амиотрофический склероз; ГалЦЕР – галактозилцерамид; ГлюЦЕР – глюкозилцерамид; СФЛ – сфинголипиды; СМ – сфингомиелин; ЦЕР – церамид; 3-KSR – 3-кетодигидросфингозинредуктаза; Asah – церамидаза; Asah1 – кислая церамидаза; aSMase – кислая сфингомиелиназа; CerS – церамидсинтаза; DES – дигидроцерамиддесатураза; FUS(1-359) – FUS-трансгенные мыши; GALC – галактозилцерамидазы; nSMase – нейтральная сфингомиелиназа; SMase – сфингомиелиназа; SMS – сфингомиелинсинтаза; SOD1 – супероксиддисмутаза; SPT – серинпальмитоилтрансфераза.

Автор для связи: (тел. +7 (905) 588-50-66; эл. почта: mariashupik@gmail.com; alicealessenko@gmail.com).

5.1%), затем *SOD1* (14.8 и 1.2% соответственно), *TDP-43* (4.2 и 0.8%) и *FUS* (2.8 и 0.3%), а в азиатских – *SOD1* (30.0 и 1.5%), затем *FUS* (6.4 и 0.9%), *C9orf72* (2.3 и 0.3%) и *TDP-43* (1.5 и 0.2%) [4].

Мутации генов проявляются в многообразных патологических механизмах БАС, которые выражаются в нарушении гомеостаза белков, метаболизма липидов и РНК, репарации ДНК, функций митохондрий и эндоплазматического ретикулума, нуклеоцитоплазматического, эндосомального и везикулярного транспорта, аутофагии, а также эксайтотоксичности, нейровоспалительных реакциях и др. [5–10]. Успехи в изучении генетических основ БАС привели к созданию многочисленных моделей этого заболевания [11]. Наиболее изучены SOD-мутантные модели, т.к. мутации в гене *SOD* были открыты первыми, как причинные для БАС, еще в 1993 г. Последние 10 лет наблюдается неуклонный интерес к созданию и изучению моделей БАС, экспрессирующих аберрантные формы РНК-связывающих белков, в первую очередь TDP-43 и FUS, потому что нарушение экспрессии, дисфункция и агрегация этих белков – основная отличительная черта БАС [12–16].

И наследственные, и спорадические формы БАС характеризуются дислипидемией, изменением обмена липидов следующих классов: фосфолипидов [17], триглицеридов, жирных кислот [18], а также сфинголипидов (СФЛ), которые необходимы для развития и поддержания функциональной целостности нервной ткани [19–22]. Класс СФЛ чрезвычайно разнообразен и включает сотни молекул, которые служат как основными компонентами мембран, так и ключевыми регуляторами ряда важнейших клеточных процессов: пролиферации и дифференцировки, адгезии и миграции, межклеточного взаимодействия, вне- и внутриклеточной передачи сигналов, воспаления и старения, мито- и аутофагии, апоптоза, некроптоза и др. [23–27]. Особую роль в метаболизме СФЛ играет церамид (ЦЕР) [28], выступающий гидрофобной основой для других подклассов СФЛ: сфингомиелинов (СМ), цереброзидов, ганглиозидов, сульфатидов и др. Образование и деградация ЦЕР строго регулируется несколькими десятками ферментов, каждый из которых обладает уникальными свойствами и разнообразным распределением в тканях и органеллах [19, 28, 29] (рис. 1).

Согласно большинству данных литературы, в том числе нашим ранее полученным данным, повышение уровня ЦЕР в основном рассматривается как ключевое цитотоксическое и/или проапоптотическое событие [30]. О возможности изменений спектра ЦЕР и СМ при БАС впервые сообщили Cutler et al. в 2002 г., которые продемонстрировали повышенное содержание двух молекулярных видов ЦЕР и одного молекулярного вида СМ в поясничном отделе спинного мозга больных спорадической формой БАС и у трансгенных мышей линии $SOD1^{G93A}$ – модели семейной формы БАС [31]. Затем Dodge et al. показали, что уровень ЦЕР и СМ и активность ферментов их метаболизма у мышей $SOD1^{G93A}$ может определяться стадией развития БАС [20].

Участие СФЛ в патогенезе БАС в настоящее время изучается только несколькими группами исследователей и только на моделях мышей, несущих мутации в гене *SOD* [20, 31–33]. В наших экспериментах использовалась принципиально другая модель, в которой ключевые признаки патогенеза БАС человека имитировались мутациями в гене *FUS* (так называемая FUSопатия [34]).

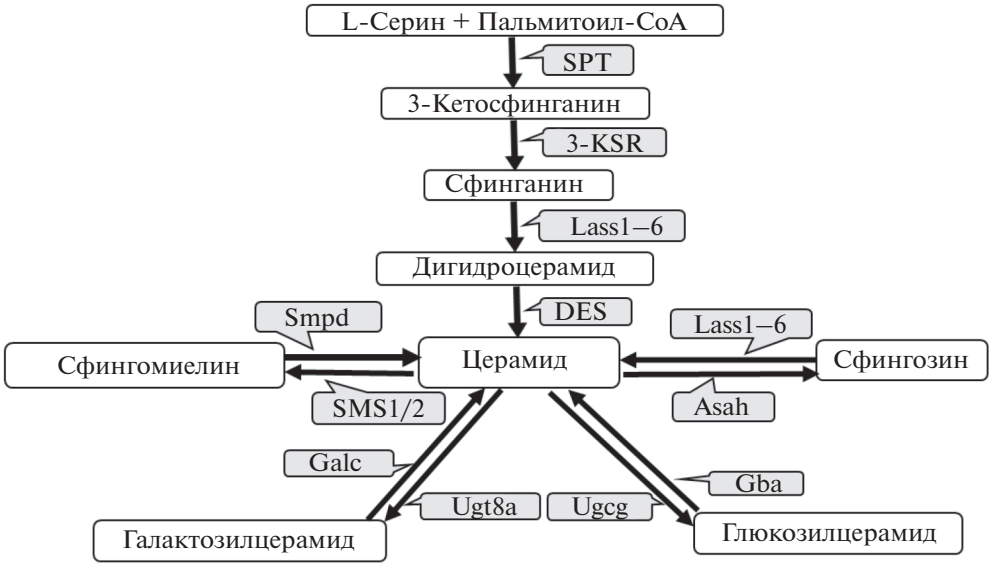


Рис. 1. Метаболизм сфингомиелина и церамида у млекопитающих.

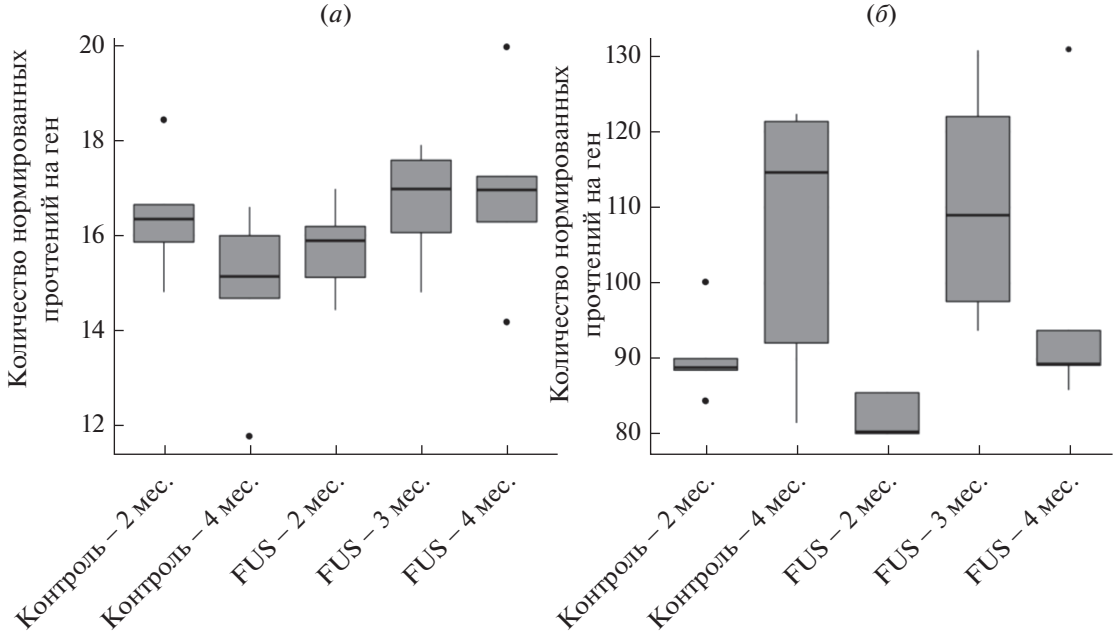


Рис. 2. Экспрессия генов нейтральной (*Smpd3*) (*а*) и кислой (*б*) сфингомиелиназ (*Smpd1*) у мышей линии FUS(1-359) и мышей контрольной группы. Стандартное отклонение обозначено верхними и нижними границами усов графика, интерквартильный размах – верхней и нижней границами ящика, черными точками обозначены "выбросы".

Цель данного исследования – определение изменений метаболизма сфингомиелина и церамида в структурах головного мозга (гиппокампе, коре и мозжечке) и в спинном мозге трансгенных мышей линии FUS(1-359), моделирующих боковой амиотрофический склероз.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уровни СФЛ особенно высоки в нервной системе [35, 36], и изменения сфинголипидного профиля и активности ферментов метаболизма ЦЕР и СМ проявляются в патогенезе многих нейродегенеративных заболеваний: при болезнях Паркинсона [36–38], Хантингтона [35], Альцгеймера [36, 37, 39], рассеянном склерозе [26] и др. [28]. Не исключение и БАС. Дисрегуляция метаболизма СФЛ, включая СМ и ЦЕР, показана с использованием наиболее изученных моделей БАС на мышах – линиях $SOD1^{G86R}$ [33] и $SOD1^{G93A}$ [20, 31]. Мы в своей работе использовали трансгенных мышей линии FUS(1-359), моделирующих характеристики БАС человека [34]. Данный вид FUSопатии приводит к повреждению аксонов мотонейронов, нейровоспалению и снижению численности мотонейронов и периферических нервных волокон. Клиническая картина характеризуется относительно ранней манифестацией и быстрым летальным исходом заболевания. Аберрантный метаболизм ЦЕР может приводить к гибели нейронов в результате окислительного стресса и апоптоза, как у животных моделей, так и у пациентов, страдающих нейродегенеративными заболеваниями [38–41]. Структуры головного мозга мышей (гиппокамп, кора и мозжечок) и спинной мозг были выделены на разных стадиях развития БАС на сроках 2, 3 и 4 месяца у трансгенных мышей линии FUS(1-359) и у контрольных животных соответствующего возраста.

Анализ экспрессии генов метаболизма ЦЕР и СМ в спинном мозге мышей при развитии БАС. В спинном мозге трансгенных мышей линии FUS(1-359), моделирующих характеристики БАС человека, и в контрольной группе методом РНК-секвенирования нами был изучен уровень экспрессии генов ферментов, участвующих в метаболизме ЦЕР: кислой сфингомиелиназы (aSMase) – *Smpd1*, нейтральной сфингомиелиназы (nSMase) – *Smpd3*, сфингомиелинсинтазы-1 (SMS1) – *Sgms1*, сфингомиелинсинтазы-2 (SMS2) – *Sgms2*, кислой церамидазы (aCDase) – *Asah1*, нейтральной церамидазы (nCDase) – *Asah2*, галактозилцерамидазы (GALC) – *Galc*, галактозилцерамидсинтазы (GalCS) – *Ugt8a* и церамидсинтаз (CerS) – *Lass1–6*. На рис. 2–4 представлены данные по уровню экспрессии генов наиболее значимых изоформ изученных ферментов.

Анализ экспрессии генов SMase (кодируют ферменты, генерирующие ЦЕР из СМ) показывает, что уровень экспрессии гена *Smpd3*, кодирующего nSMase, практически не меняется в ходе развития БАС у мышей, а экспрессия гена *Smpd1*, кодирующего aSMase, через 2 мес. была ниже, чем в контроле (рис. 2). Через 3 и 4 мес. достоверных отличий от контроля не обнаружено. Из представленных данных следует, что, вероятно, в

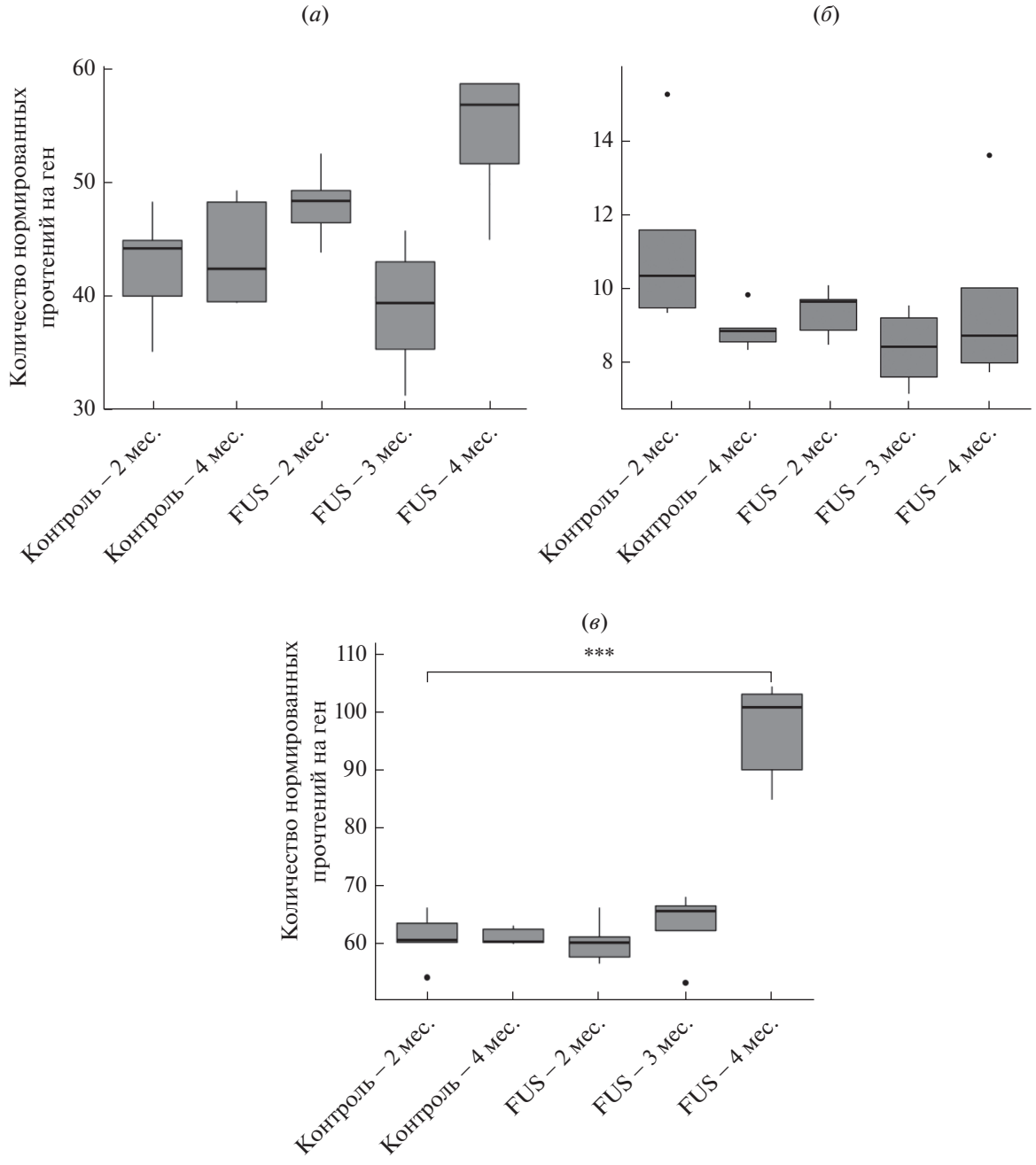


Рис. 3. Экспрессия генов сфингомиелинсинтазы 1 (*Sgms1*) (*а*), сфингомиелинсинтазы 2 (*Sgms2*) (*б*) и кислой цераминдазы (*Asah1*) (*в*) у мышей линии FUS(1-359) и мышей контрольной группы. Стандартное отклонение обозначено верхними и нижними границами усов графика, интерквартильный размах – верхней и нижней границами ящика, черными точками обозначены “выбросы”. *** Статистически достоверное различие с контролем, $p < 0.01$.

ходе развития модели БАС интенсивная генерация ЦЕР из СМ не осуществляется. Пониженная экспрессия гена фермента кислой изоформы SMase, активность которой в первую очередь связывают с реализацией цитотоксического действия ЦЕР, может указывать на запуск защитных механизмов в ЦНС трансгенных животных на досимптоматической стадии БАС.

Изменение экспрессии генов *Sgms1* и *Sgms2*, которые кодируют ферменты SMS1 и SMS2, синтезирующие СМ из ЦЕР, идет разнонаправленно. Уровень экспрессии гена изоформы SMS1, локализованной в аппарате Гольджи, повышается через 4 мес. развития БАС по сравнению с показателями нормы, а уровень экспрессии SMS2, расположенной на плазматической мембране, напротив, понижается (рис. 3*а* и 3*б*), что может

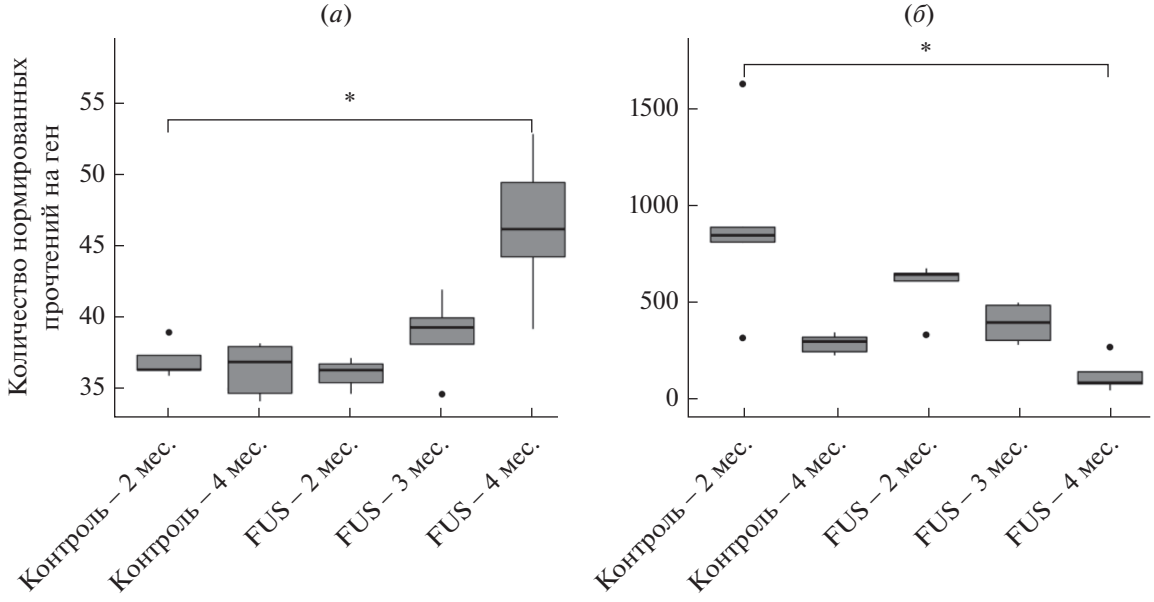


Рис. 4. Экспрессия генов галактозилцерамидазы (*Galc*) (*а*) и галактозилтрансферазы (*Ugt8a*) (*б*) у мышей линии FUS(1-359) и мышей контрольной группы. Стандартное отклонение обозначено верхними и нижними границами усов графика, интерквартильный размах – верхней и нижней границами ящика, черными точками обозначены "выбросы". * Статистически достоверное различие с контролем, $p < 0.05$.

указывать на специфическую роль отдельных пулов СМ и ЦЕР в ходе развития БАС.

При анализе экспрессии генов, кодирующих различные изоформы CerS, которые отвечают за синтез ЦЕР *de novo*, мы не обнаружили отличий в уровнях экспрессии по сравнению с соответствующими контрольными уровнями (данные не представлены).

Наиболее интересные результаты получены для генов ферментов Asah1 (образует сфингозин из ЦЕР), GALC (ЦЕР из ГалЦЕР) и Ugt8a (ГалЦЕР из ЦЕР). Повышение экспрессии гена *Asah1* через 4 мес. развития FUS-опосредованной протеинопатии (рис. 3*в*) указывает на то, что ЦЕР под действием Asah1 может превращаться в сфингозин на терминальной стадии БАС, когда интенсивно гибнут клетки спинного мозга от апоптоза, индуцируемого сфингозином. Это предположение находит подтверждение в нашей недавней работе, в которой был проведен масс-спектрометрический анализ сфингоидных оснований на разных стадиях развития FUSопатии и обнаружено повышенное в несколько раз по сравнению с показателями контрольных животных содержание сфингозина в тканях спинного мозга [42]. Кроме того, активация экспрессии гена *Galc*, кодирующего GALC (фермент, ответственный за образование ЦЕР из ГалЦЕР), на этом же сроке (рис. 4*а*) дает основание полагать, что в процессе развития БАС происходит генерация дополнительных количеств ЦЕР в результате ферментативной деградации ГалЦЕР этим ферментом, т.е. активируется так называемый "путь спасения" для образования ЦЕР. Важно отметить, что при этом есть указания на ингибирование обратного процесса, а именно образование ГалЦЕР из ЦЕР синтазой ГалЦЕР, поскольку экспрессия гена *Ugt8a* снижается (рис. 4*б*). Таким образом, можно предположить, что сфингозин на поздней симптоматической стадии БАС, скорее всего, образуется из ЦЕР, в том числе возникающего при гидролизе ГалЦЕР.

Анализ спектра молекулярных видов сфингомиелинов в гиппокампе, коре головного мозга, мозжечке и в спинном мозге в процессе развития БАС. Мы изучили уровни суммарных СМ и наиболее распространенных молекулярных видов СМ d18:1 с длиной жирной кислоты от C16 до C24 (d18:1/16:0, d18:1/18:0, d18:1/18:1, d18:1/20:0, d18:1/20:1, d18:1/22:0, d18:1/22:1, d18:1/24:0, d18:1/24:1) в гиппокампе, коре головного мозга, мозжечке и спинном мозге трансгенных мышей линии FUS(1-359), моделирующих характеристики БАС человека, и мышей контрольной группы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ/МС). Анализ суммарных СМ показал их практическую неизменность во всех изученных структурах ЦНС в процессе развития протеинопатии по сравнению с соответствующими показателями контроля (рис. 5). Общее содержание СМ практически одинаково в гиппокампе и коре головного мозга, несколько выше в мозжечке, а в спинном мозге – в несколько раз выше, чем в

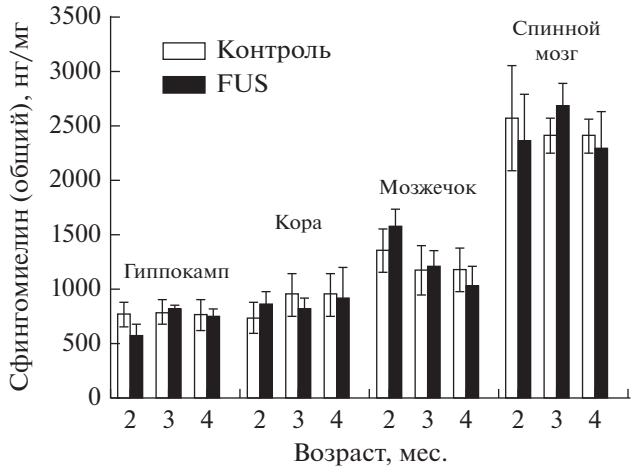


Рис. 5. Общее содержание сфингомиелина в структурах ЦНС мышей линии FUS(1-359) и мышей контрольной группы. Приведены средние значения и стандартная ошибка среднего.

структурах головного мозга (рис. 5). Данное наблюдение согласуется с имеющимися представлениями о том, что миелиновые оболочки (основным компонентом которых выступает СМ) спинного мозга значительнее обогащены липидами, чем ткани головного мозга.

Среди отдельных молекулярных видов СМ в гиппокампе, коре головного мозга и мозжечке преобладает СМ d18:1/18:0 (рис. 6*а*–6*в*), что согласуется с имеющимися данными литературы о сфинголипидном составе структур головного мозга. Спинной мозг характеризуется более разнообразным в количественном выражении спектром СМ. Преобладает СМ d18:1/24:1, далее в равных соотношениях представлены СМ d18:1/18:0 и d18:1/24:0, затем d18:1/20:0 и d18:1/22:0, d18:1/16:0 и d18:1/22:1 (рис. 6*г*).

Изменение содержания молекулярных видов церамидов в гиппокампе, коре головного мозга, мозжечке и в спинном мозге в процессе развития БАС. В наших экспериментах показано, что у мышей линии FUS(1-359) отсутствуют достоверные изменения суммарного уровня всех изученных нами молекулярных видов ЦЕР в отделах головного мозга (гиппокампе, коре и мозжечке) по сравнению с соответствующим значениями у мышей контрольной группы (рис. 7). Однако в спинном мозге наблюдается понижение уровня суммарных ЦЕР через 2 мес. после индукции БАС по сравнению с показателями контроля (рис. 7). Подобно СМ, мы исследовали изменения в уровнях молекулярных видов ЦЕР с аналогичными жирными кислотами в их составе: d18:1/16:0, d18:1/18:0, d18:1/18:1, d18:1/20:0, d18:1/20:1, d18:1/22:0, d18:1/22:1, d18:1/24:0, d18:1/24:1 (рис. 8*а*–8*г*).

В структурах головного мозга наблюдается преобладание ЦЕР d18:1/18:0 – основного молекулярного вида, характерного для нейронов. В спинном мозге, где более выражено содержание миелина, преобладает также ЦЕР d18:1/24:1 и выше процентное содержание остальных молекулярных видов ЦЕР. В процессе развития заболевания изменения в спектре молекулярных видов ЦЕР отмечены только в спинном мозге, где уровень практически всех ЦЕР снижается по отношению к контролю через 2 и 3 мес. течения заболевания. На четвертый месяц, так же как и для суммарных ЦЕР на этот срок, их уровень соответствует контрольному (рис. 8*г*).

Подобное поведение ЦЕР может определять его превращение в сфингозин путем гидролиза ЦЕР Asah1. Сфингозин обладает более выраженными проапоптотическими свойствами по сравнению с ЦЕР, его появление в клетках ЦНС способствует более активной их гибели.

Обсуждение результатов. Эксперименты по определению уровня экспрессии генов ферментов, катализирующих как образование, так и расщепление СМ, не показали существенных изменений, что согласуется с неизменным содержанием СМ и спектра его индивидуальных молекулярных видов на всех изученных нами сроках БАС. Также при FUSопатии не отмечено изменений уровня мРНК ни одной из изоформ CerS (*Lass1–6*). Ранее мы показали неизменность экспрессии гена еще одного фермента, вовлеченного в процесс синтез ЦЕР *de novo*, – 3-кетодигидросфингозинредуктазы – у FUS-трансгенных мышей на всех изученных сроках [43]. Полученные нами данные указывают на то, что синтез ЦЕР при БАС происходит не за счет образования *de novo*, а по катаболическим путям. К аналогичному заключению пришли Dodge et al., продемонстрировавшие это на модели БАС $SOD1^{G93A}$ у мышей [20]. Образование ЦЕР может происходить в результате повышения экспрессии гена фермента GALC, генерирующего ЦЕР из ГалЦЕР, т.к. изученные нами образцы характеризуются повышенной экспрессией гена *Galc*. На этом фоне ингибируется обратный процесс, а именно образование ГалЦЕР из ЦЕР синтазой ГалЦЕР, поскольку экспрессия гена *Ugt8a* снижается. Предположение о роли ГалЦЕР в качестве источника для поддержания уровня ЦЕР согласуется и с некоторыми результатами работы Dodge et al. в части, проведенной на образцах серого вещества спинного мозга пациентов с БАС, у которых обнаруживается повышение активности ферментов, генерирующих ЦЕР из гексозилцерамидов, GALC и GBA2 [20].

Также нами обнаружено увеличение экспрессии гена *Asah1*, кодирующего фермент, который превращает ЦЕР в еще более активный проапо-

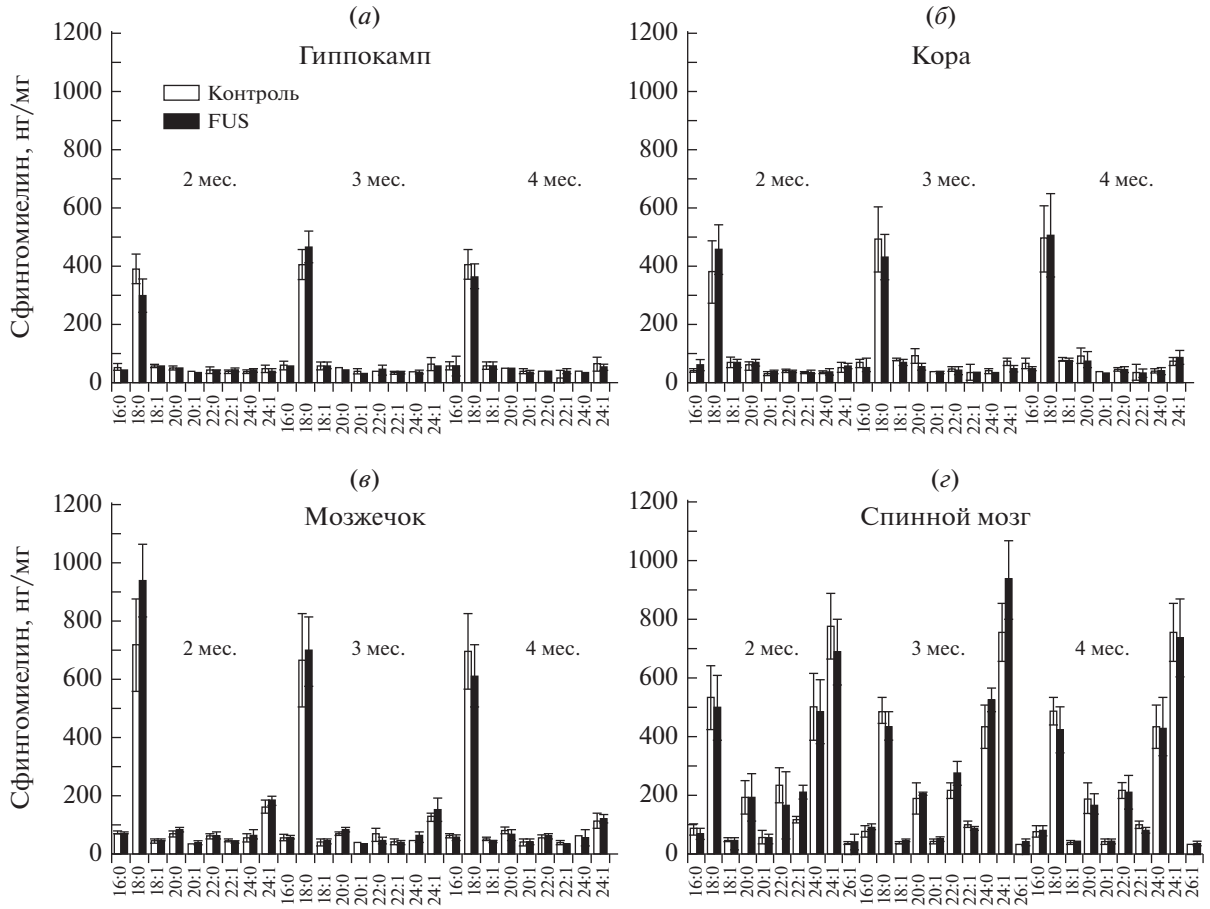


Рис. 6. Содержание молекулярных видов сфингомиелина в структурах ЦНС мышей линии FUS(1-359) и мышей контрольной группы: (*а*) – гиппокамп, (*б*) – кора головного мозга, (*в*) – мозжечок, (*г*) – спинной мозг. Приведены средние значения и стандартная ошибка среднего.

птотический агент – сфингозин. В своей недавней работе, проведенной на той же модели мышей линии FUS(1-359), мы исследовали аспекты метаболизма сфингоидных оснований при БАС и показали, что активация экспрессии генов ферментов обмена сфингозина и повышенное содержание этого проапоптотического метаболита сфингомиелинового цикла обнаруживаются на терминальной стадии FUSопатии в спинном мозге мышей [43]. Таким образом, можно предположить, что ЦЕР, образующийся вследствие ферментативной деградации ГалЦЕР, не накапливается при патологии БАС у мышей, а превращается в сфингозин, который приводит к гибели клеток спинного мозга.

Один из аспектов передачи сигналов ЦЕР в клетках – регуляция гибели клеток посредством формирования каналов ЦЕР во внешних мембранах митохондрий [44]. Различие метаболических профилей митохондрий в спинном и головном мозге может объяснять различия в характере изменений сфинголипидного профиля в головном и спинном мозге. Различие метаболических профилей митохондрий в спинном и головном мозге проявляется в том, что митохондрии в спинном мозге производят больше АФК и имеют более выраженные окислительные повреждения по сравнению с митохондриями головного мозга. Эти тканеспецифические отличия могут быть причиной того, что определенные области ЦНС особенно уязвимы, а также могут играть важную роль в специфических возрастных и нейродегенеративных заболеваниях, таких как БАС [45]. Более того, митохондриальная функция, по-видимому, неодинакова не только в клетках разных типов тканей, но даже в разных областях клеток одного типа, например, в синаптических и несинаптических митохондриях [46], а с возрастом эти различия увеличиваются еще больше [45, 47]. Также в спинном мозге значительно выше повреждения митохондриальной ДНК, чем в головном мозге [48]. Это может усиливать характерные для БАС нарушения в работе митохондрий из-за повышения вероятности мутаций белков, кодируемых митохондриальной ДНК и, как следствие, их дисфункции [45].

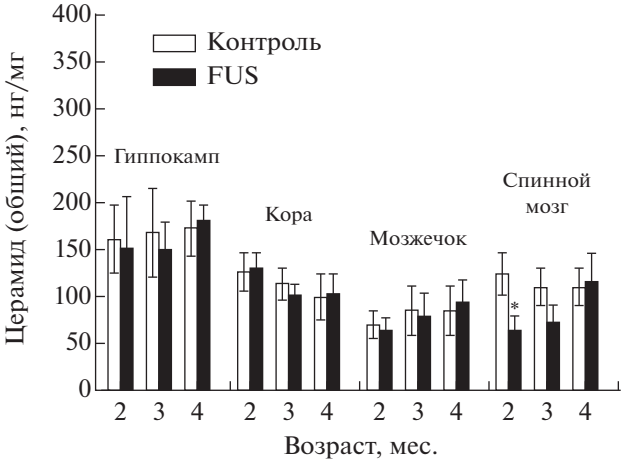


Рис. 7. Общее содержание церамида в структурах ЦНС мышей линии FUS(1-359) и мышей контрольной группы. Приведены средние значения и стандартная ошибка среднего. * Статистически достоверное различие с контролем, $p < 0.05$.

Изменения уровня СФЛ могут различаться в зависимости от области отдела мозга. Так, при болезни Паркинсона показано, что в передней части поясной извилины коры головного мозга содержание СМ понижено, а в затылочной коре изменений нет. Кроме этого, в поясной коре уровни СМ C23:0, C24:1 и C26:1 снижены, а концентрации C18:1 и C20:0 увеличены [49]. Таким образом, наблюдаемое нами отсутствие принципиальных изменений в исследованных структурах головного мозга может отражать как принципиальное отличие в их метаболизме от спинного мозга, так и необходимость более детального разделения тканей для выявления изменений, которые могут быть характерны для более локальных участков и нивелируются при анализе липидов, выделенных из более крупных образцов. При анализе данных следует также принимать во внимание тот факт, что сфинголипидный состав как отдельных органов, так и биологических жидкостей различен, и он отличается у разных организмов [20]. С учетом роли СФЛ в патогенезе БАС

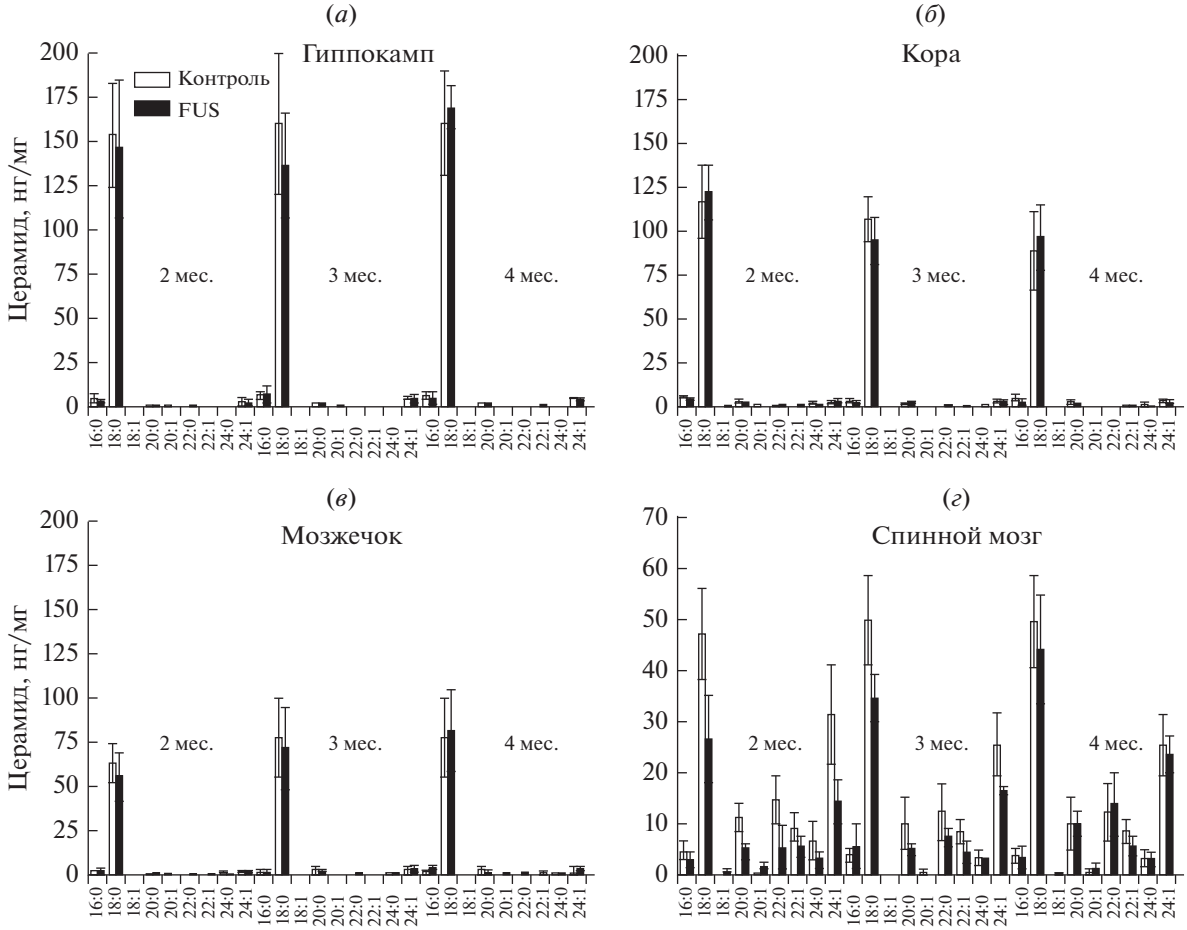


Рис. 8. Содержание молекулярных видов ЦЕР в структурах ЦНС мышей линии FUS(1-359) и мышей контрольной группы: (*а*) – гиппокамп, (*б*) – кора головного мозга, (*в*) – мозжечок, (*г*) – спинной мозг. Приведены средние значения и стандартная ошибка среднего.

ведется поиск новых препаратов, влияющих на метаболизм СФЛ. В настоящее время клинические испытания безопасности фазы IIa для лечения БАС проходит единственный препарат из класса СФЛ – Fingolimod [50], эффективность которого доказана у мышей $SOD1^{G93A}$ на симптоматической стадии БАС при диагностируемой двигательной дисфункции [32].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Модель БАС. В качестве модели БАС использовали линию трансгенных мышей FUS(1-359) (Биоресурсная коллекция Института физиологически активных веществ РАН, Россия), проявляющих характеристики БАС. В нервной системе животных экспрессируется трансгенная последовательность, кодирующая аберрантную форму белка FUS человека с удаленным сигналом ядерной локализации под нейрон-специфичным промотором Thy1. Линию стабильно поддерживали в гемизиготном состоянии согласно ранее описанному протоколу с переводом животных на генетический фон CD1 [34]. Гетерозиготных животных определяли методом конвенционной ПЦР с использованием праймеров (5'-TCTTTGTGCAAGGCCTGGGT-3' и 3'-AGAAGCAAGACCTCTGCAGAG-5') при следующих условиях: 2 мин предварительной денатурации при 94°C, далее 30 циклов: 94°C – 15 с, 58°C – 30 с, 72°C – 40 с, детектируя фрагмент размером 255 п.н. [34]. У трансгенных мышей накапливаются белковые агрегаты в цитоплазме нервных клеток. Данный вид FUS-протеинопатии приводит к повреждению аксонов мотонейронов, нейровоспалительным реакциям и снижению числа тел мотонейронов. Такая клиническая картина характеризуется относительно ранней манифестацией заболевания (2.5–4.5 мес.) и быстрым летальным исходом (в течение нескольких дней с момента манифестации). Изменения метаболического и стрессового ответа предшествуют началу открытого моторного заболевания БАС [51]. Поэтому у модельных мышей выделяли структуры головного мозга (гиппокамп, кору, мозжечок) и спинной мозг в 2, 3 и 4 мес. жизни, что соответствует досимптомной, ранней симптоматической и симптоматической стадиям БАС. Для одной экспериментальной точки использовали семь мышей-самцов. В контрольную группу входили не содержащие трансгенную кассету однопометные особи того же возраста, что и модельные мыши.

Анализ экспрессии генов. Анализ экспрессии генов ферментов метаболизма сфинголипидов в спинном мозге мышей проводили методом РНК-секвенирования. Библиотеки мРНК для секвенирования получали с помощью набора для выделения полиA(+)-фракции мРНК и набора для создания библиотек NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, США) по методике, предложенной производителем [52]. Секвенирование полиA(+)-обогащенной фракции РНК проводили на платформе Illumina NextSeq 500 (Illumina, США) в Центре коллективного пользования “Геном” Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

Обработку данных проводили при помощи программного обеспечения PPLine [53]. Она включала триммирование коротких прочтений по качеству и длине при помощи программы Trimmomatic [54], выравнивание прочтений на референсный геном версии GRCm38 программой STAR [55] и подсчет прочтений, выравненных на гены, программой htseq-count [56].

Статистическую обработку данных и вычисление дифференциальной экспрессии генов производили при помощи пакета edgeR [57], используемого в среде статистической обработки данных языка R [58]. В ходе парного сравнения экспериментальных групп для определения достоверности дифференциальной экспрессии использовали стандартный F-тест Фишера с применением метода Беньямини–Хохберга для внесения поправки на множественное тестирование [59]. Для визуализации полученных данных применяли пакет ggplot2 [60].

Анализ сфинголипидов. Липиды отделов головного (кора, мозжечок и гиппокам) и спинного мозга экстрагировали по методу Bligh и Dyer [61]. Церамиды и сфингомиелины анализировали методом хромато-масс-спектрометрии [62]. Выделенные липиды упаривали под током азота и растворяли в смеси хлороформ/метанол в соотношении 2 : 1 (*v*/*v*). Анализ липидов проводили методом ВЭЖХ/МС на приборе TSQ Endura (Thermo Scientific, США), снабженном ВЭЖХ-колонкой EclipsePlusC8 (Agilent, США), в режиме мониторинга множественных реакции (ММР) при давлении в ячейке соударений 1.5 мТорр, разрешение на Q1 и Q3 1.2 Да. Для ЦЕР проводили фрагментацию исходных протонированных и дегидратированных молекул при энергии 25 В до иона с *m*/*z* 264.4, dwell time 25 мс. Для СМ проводили фрагментацию исходных протонированных молекул при энергии 25 В до иона с *m*/*z* 184.1, dwell time 25 мс. Параметры источника ионизации: температура нагревателя 300°C, температура капилляра 340°C, поток sheath gas 45 arb, поток aux gas 13 arb, поток sweep gas 1 arb. Для построения калибровочных зависимостей использовали СМ и ЦЕР d18:1/16:0, d18:1/18:0, d18:1/18:1, d18:1/20:0, d18:1/22:0, d18:1/24:0 и d18:1/24 (Avanti, США). Для каждого липида вычисляли отношение площади под хроматографическим пиком этой молекулы к площади хроматографического пика молекулы стандарта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые охарактеризован профиль молекулярных видов СМ и ЦЕР, а также уровни экспрессии генов ферментов их метаболизма в ЦНС трансгенных мышей линии FUS(1-359), моделирующих характеристики БАС на разных сроках развития FUS-протеинопатии. Показано, что изменения содержания ЦЕР и экспрессии генов ферментов его обмена происходят в спинном мозге животных на всех стадиях БАС. Таким образом, метаболизм СФЛ представляет собой перспективную область исследования процессов, связанных с БАС, как в контексте поиска потенциальных диагностических маркеров и эффективных лекарственных средств, так и для объяснения патогенеза БАС.

БЛАГОДАРНОСТИ

Содержание животных обеспечено Программой поддержки биоресурсных коллекций Института физиологически активных веществ РАН и проведено на оборудовании Центра коллективного пользования Института физиологически активных веществ РАН.

Анализ данных высокопроизводительного секвенирования выполнен на оборудовании Центра коллективного пользования “Геном” Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (http://www.eimb.ru/rus/ckp/ccu_genome_c.php).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование нейродегенеративных процессов у модельных животных линии FUS(1-359) выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-13-00378).

Содержание животных осуществлялось в рамках государственного задания Института физиологически активных веществ РАН № 0090-2017-0019.

Исследования свойств липидов в нейропатологиях выполнены в рамках государственного задания Института физиологически активных веществ РАН (тема № 44.4, номер государственной регистрации 01201253310).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Talbott E.O., Malek A.M., Lacomis D.* // Handb. Clin. Neurol. 2016. V. 138. P. 225–238. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802973-2.00013-6
2. *Arthur K.C., Calvo A., Price T.R., Geiger J.T., Chiò A., Traynor B.J.* // Nat. Commun. 2016. V. 7. P. 12408. https://doi.org/10.1038/ncomms12408
3. *Chia R., Chiò A., Traynor B.J.* // Lancet Neurol. 2018. V. 17. P. 94–102. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30401-5
4. *Zou Z.Y., Zhou Z.R., Che C.H., Liu C.Y., He R.L., Huang H.P.J.* // Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 2017. V. 88. P. 540–549. https://doi.org/10.1136/jnnp-2016-315018
5. *Shi P., Gal J., Kwinter D.M., Liu X., Zhu H.* // Biochim. Biophys. Acta. 2010. V. 1802. P. 45–51. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.08.012
6. *Peters O.M., Ghasemi M., Brown R.H., Jr.* // J. Clin. Invest. 2015. V. 125. P. 1767–1779. https://doi.org/10.1172/JCI71601
7. *Van Damme P., Dewil M., Robberecht W., Van Den Bosch L.* // Neurodegener Dis. 2005. V. 2. P. 147–159. https://doi.org/10.1159/000089620
8. *Chitnis T., Weiner H.L.* // J. Clin. Invest. 2017. V. 127. P. 3577–3587. https://doi.org/10.1172/JCI90609
9. *Hardiman O., Al-Chalabi A., Chio A., Corr E.M., Logroscino G., Robberecht W., Shaw P.J., Simmons Z., van den Berg L.H.* // Nat. Rev. Dis. Primers. 2017. V. 3. P. 17085. https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.85
10. *van Damme P., Robberecht W., Van Den Bosch L.* // Dis. Model Mech. 2017. V. 10. P. 537–549. https://doi.org/10.1242/dmm.029058
11. *Van Den Bosch L.* // J. Biomed. Biotechnol. 2011. V. 2011. P. 348765. https://doi.org/10.1155/2011/348765
12. *Naumann M., Pal A., Goswami A., Lojewski X., Japtok J., Vehlow A., Naujock M., Günther R., Jin M., Stanslowsky N., Reinhardt P., Sterneckert J., Frickenhaus M., Pan-Montojo F., Storkebaum E., Poser I., Freischmidt A., Weishaupt J.H., Holzmann K., Troost D., Ludolph A.C., Boeckers T.M., Liebau S., Petri S., Cordes N., Hyman A.A., Wegner F., Grill S.W., Weis J., Storch A., Hermann A.* // Nat. Commun. 2018. V. 9. P. 335. https://doi.org/10.1038/s41467-017-02299-1
13. *Vance C., Rogelj B., Hortobágyi T., De Vos K.J., Nishimura A.L., Sreedharan J., Hu X., Smith B., Ruddy D., Wright P., Ganesalingam J., Williams K.L., Tripathi V., Al-Saraj S., Al-Chalabi A., Leigh P.N., Blair I.P., Nicholson G., de Belleroche J., Gallo J.M., Miller C.C., Shaw C.E.* // Science. 2009. V. 323. P. 1208–1211. https://doi.org/10.1126/science.1165942
14. *Kwiatkowski T.J., Jr., Bosco D.A., Leclerc A.L., Tamrazian E., Vanderburg C.R., Russ C., Davis A., Gilchrist J., Kasarskis E.J., Munsat T., Valdmanis P., Rouleau G.A., Hosler B.A., Cortelli P., de Jong P.J., Yoshinaga Y., Haines J.L., Pericak-Vance M.A., Yan J., Ticozzi N., Siddique T., McKenna-Yasek D., Sapp P.C., Horvitz H.R., Landers J.E., Brown R.H., Jr.* // Science. 2009. V. 323. P. 1205–1208. https://doi.org/10.1126/science.1166066

15. *Conlon E.G., Manley J.L.* // Genes Dev. 2017. V. 31. P. 1509–1528. https://doi.org/10.1101/gad.304055.117
16. *Скворцова В.И., Мальцев А.В., Григорьев В.В., Овчинников Р.К., Роман А.Ю., Ефимова А.Д., Ковражкина Е.А.* // Мол. биология. 2017. Т. 51. С. 387–399. https://doi.org/10.7868/S0026898417020094
17. *Arima H., Omura T., Hayasaka T., Masaki N., Hanada M., Xu D., Banno T., Kobayashi K., Takeuchi H., Kadomatsu K., Matsuyama Y., Setou M.* // Neuroscience. 2015. V. 297. P. 127–136. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.03.060
18. *Fitzgerald K.C., O'Reilly É.J., Falcone G.J., McCullough M.L., Park Y., Kolonel L.N., Ascherio A.* // JAMA Neurol. 2014. V. 71. P. 1102–1110. https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.1214
19. *Blasco H., Veyrat-Durebex C., Bocca C., Patin F., Vourc'h P., Kouassi Nzoughet J., Lenaers G., Andres C.R., Simard G., Corcia P., Reynier P.* // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 17652. https://doi.org/10.1038/s41598-017-17389-9
20. *Dodge J.C., Treleaven C.M., Pacheco J., Cooper S., Bao C., Abraham M., Cromwell M., Sardi S.P., Chuang W.L., Sidman R.L., Cheng S.H., Shihabuddin L.S.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. P. 8100–8105. https://doi.org/10.1042/bst0320144
21. *van Echten-Deckert G., Herget T.* // Biochim. Biophys. Acta. 2006. V. 1758. P. 1978–1994. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.06.009
22. *Piccinini M., Scandroglio F., Prioni S., Buccinnà B., Loberto N., Aureli M., Chigorno V., Lupino E., DeMarco G., Lomartire A., Rinaudo M.T., Sonnino S., Prinetti A.* // Mol. Neurobiol. 2010. V. 41. P. 314–340. https://doi.org/10.1007/s12035-009-8096-6
23. *Hannun Y.A., Obeid L.M.* // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2008. V. 9. P. 139–150. https://doi.org/10.1038/nrm2329
24. *Hannun Y.A., Obeid L.M.* // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2018. V. 19. P. 175–191. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.107
25. *Nganga R., Oleinik N., Ogretmen B.* // Adv. Cancer Res. 2018. V. 140. P. 1–25. https://doi.org/10.1016/bs.acr.2018.04.007
26. *Chaurasia B., Summers S.A.* // Annu. Rev. Physiol. 2021. V. 83. P. 303–330. https://doi.org/.org/10.1146/annurev-physiol-031620-093815
27. *Zhang X., Matsuda M., Yaegashi N., Nabe T., Kitatani K.* // Cells. 2020. V. 9. P. 627. https://doi.org/10.3390/cells9030627
28. *Mullen T.D., Hannun Y.A., Obeid L.M.* // Biochem. J. 2012. V. 441. P. 789–802. https://doi.org/10.1042/bj20111626
29. *Zelnik I.D., Ventura A.E., Kim J.L., Silva L.C., Futerman A.H.* // Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids. 2020. V. 1865. P. 158489. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.06.015
30. *Futerman A.H., Hannun Y.A.* // EMBO Rep. 2004. V. 5. P. 777–782. https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400208
31. *Cutler R.G., Pedersen W.A., Camandola S., Rothstein J.D., Mattson M.P.* // Ann. Neurol. 2002. V. 52. P. 448–457. https://doi.org/10.1002/ana.10312
32. *Potenza R.L., De Simone R., Armida M., Mazziotti V., Pèzzola A., Popoli P., Minghetti L.* // Neurotherapeutics. 2016. V. 13. P. 918–927. https://doi.org/10.1007/s13311-016-0462-2
33. *Henriques A., Croixmarie V., Priestman D.A., Rosenbohm A., Dirrig-Grosch S., D'Ambra E., Huebecker M., Hussain G., Boursier-Neyret C., Echaniz-Laguna A., Ludolph A.C., Platt F.M., Walther B., Spedding M., Loeffler J.P., Gonzalez De Aguilar J.L.* // Hum. Mol. Genet. 2015. V. 24. P. 7390–7405. https://doi.org/10.1093/hmg/ddv439
34. *Дейкин А.В., Ковражкина Е.А., Овчинников Р.К., Броновицкий Е.В., Разинская О.Д., Смирнов А.П., Ермолкевич Т.Г., Еляков А.Б., Попов А.Н., Федоров Е.Н., Лыткина О.А., Кухарский М.С., Тарасова Т.В., Шелковникова Т.А., Устюгов А.А., Нинкина Н.Н., Гольдман И.Л., Садчиков Е.Р., Бачурин С.О., Скворцова В.И.* // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2014. Т. 114. С. 63–70.
35. *Giusto N.M., Roque M.E., Ilincheta De Boschero M.G.* // Lipids. 1992. V. 27. P. 835–839. https://doi.org/10.1007/BF02535859
36. *Di Pardo A., Basit A., Armirotti A., Amico E., Castaldo S., Pepe G., Marracino F., Buttari F., Digilio A.F., Maglione V.* // Front Neurosci. 2017. V. 11. P. 698. https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00698
37. *Lin G., Wang L., Marcogliese P.C., Bellen H.J.* // Trends Endocrinol. Metab. 2019. V. 30. P. 106–117. https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.11.003
38. *Czubowicz K., Jęśko H., Wencel P., Lukiw W.J., Strosznajder R.P.* // Mol. Neurobiol. 2019. V. 56. P. 5436–5455. https://doi.org/10.1007/s12035-018-1448-3
39. *Brugg B., Michel P.P., Agid Y., Ruberg M.* // J. Neurochem. 1996. V. 66. P. 733–739. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.66020733.x
40. *France-Lanord V., Brugg B., Michel P.P., Agid Y., Ruberg M.* // J. Neurochem. 1997. V. 69. P. 1612–1621. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69041612.x
41. *Bras J., Singleton A., Cookson M.R., Hardy J.* // FEBS J. 2008. V. 275. P. 5767–5773. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06709.x
42. *Гутнер У.А., Шупик М.А., Малошицкая О.А., Соколов С.А., Резвых А.П., Фуников С.Ю., Лебедев А.Т., Устюгов А.А., Алесенко А.В.* // Биохимия. 2019. Т. 84. С. 1437–1449. https://doi.org/10.1134/S0320972519100063
43. *Filippov V., Song M.A., Zhang K., Vinters H.V., Tung S., Kirsch W.M., Yang J., Duerksen-Hughes P.J.* // J. Alzheimer's Dis. 2012. V. 29. P. 537–547. https://doi.org/10.3233/JAD-2011-111202
44. *Siskind L.J., Kolesnick R.N., Colombini M.* // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 26796–267803. https://doi.org/10.1074/jbc.M200754200
45. *Yonutas H.M., Pandya J.D., Sullivan P.G.* // J. Bioenerg. Biomembr. 2015. V. 47. P. 149–154. https://doi.org/10.1007/s10863-014-9593-5
46. *Brown M.R., Sullivan P.G., Geddes J.W.* // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. P. 11658–11668. https://doi.org/10.1074/jbc.M510303200
47. *Brown M.R., Geddes J.W., Sullivan P.G.* // J. Bioenerg. Biomembr. 2004. V. 36. P. 401–406. https://doi.org/10.1023/B:JOBB.0000041775.10388.23
48. *Sullivan P.G., Rabchevsky A.G., Keller J.N., Lovell M., Sodhi A., Hart R.P., Scheff S.W.* // J. Comp. Neurol. 2004. V. 474. P. 524–534. https://doi.org/10.1002/cne.20130

49. *Bienias K., Fiedorowicz A., Sadowska A., Prokopiuk S., Car H.* // Pharmacol. Rep. 2016. V. 668. P. 570–581. https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.12.008

50. *Berry J.D., Paganoni S., Atassi N., Macklin E.A., Goyal N., Rivner M., Simpson E., Appel S., Grasso D.L., Mejia N.I., Mateen F., Gill A., Vieira F., Tassinari V., Perrin S.* // Muscle Nerve. 2017. V. 56. P. 1077–1084. https://doi.org/10.1002/mus.25733

51. *Pharaoh G., Sataranatarajan K., Street K., Hill S., Gregston J., Ahn B., Kinter C., Kinter M., Van Remmen H.* // Front. Neurosci. 2019. V. 13. P. 487. https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00487

52. *Funikov S.Y., Rezvykh A.P., Mazin P.V., Morozov A.V., Maltsev A.V., Chicheva M.M., Vikhareva E.A., Evgen'ev M.B., Ustyugov A.A.* // Neurogenetics. 2018. V. 19. P. 189–204. https://doi.org/10.1007/s10048-018-0553-9

53. *Krasnov G.S., Dmitriev A.A., Kudryavtseva A.V., Shargunov A.V., Karpov D.S., Uroshlev L.A., Melnikova N.V., Blinov V.M., Poverennaya E.V., Archacov A.I., Lisitsa A.V., Ponomarenko E.A.* // J. Proteome Res. 2015. V. 14. P. 3729–3737. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00490

54. *Bolger A.M., Lohse M., Usadel B.* // Bioinformatics. 2014. V. 30. P. 2114–2120. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170

55. *Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras T.R.* // Bioinformatics. 2013. V. 29. P. 15–21. https://doi.org/10.1093/bioinfor-matics/bts635

56. *Anders S., Pyl P.T., Huber W.* // Bioinformatics. 2015. V. 31. P. 166–169. https://doi.org/10.1101/002824

57. *Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K.* // Bioinformatics. 2010. V. 26. P. 139–140. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616

58. RC Team // R Language Definition, R Foundation for Statistical Computing, 2000. Vienna, Austria.

59. *Thissen D., Steinberg L., Kuang D.* // J. Educ. Behav. Stat. 2002. V. 27. P. 77–83. https://doi.org/10.3102/10769986027001077

60. *Wickham H.* // Wiley Interdisciplinary Reviews. Comput. Statistics. 2011. V. 3. P. 180–185. https://doi.org/10.1002/wics.147

61. *Bligh T.G., Dyer W.J.* // Can. J. Biochem. Physiol. 1959. V. 37. P. 911–917. https://doi.org/10.1139/o59-099

62. *Sullards M.C.* // Methods Enzymol. 2000. V. 312. P. 32–45. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)12898-8

Changes in the Metabolism of Sphingomyelin and Ceramide in the Brain Structures and Spinal Cord of the Transgenic Mice (FUS(1-359), Modeling Amyotrophic Lateral Sclerosis

M. A. Shupik*, U. A. Gutner*, A. A. Ustyugov, A. P. Rezvykh***, S. Yu. Funikov***, O. A. Maloshitskaya****, S. A. Sokolov****, A. T. Lebedev****, and A. V. Alessenko*, #**

#Phone: +7 (905) 588-50-66; e-mail: mariashupik@gmail.com; alicealessenko@gmail.com

**N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia*

***Institute of Physiologically Active Substances of the Russian Academy of Sciences, Severnii proezd 1, Chernogolovka, 142432 Russia*

****Engelgardt Istitute of Molecular Biology, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia*

*****Moscow State University, Leninskie gory 3, Moscow, 119999 Russia*

Changes in the expression of genes for enzymes of sphingolipid metabolism in transgenic FUS mice (FUS (1-359)) simulating amyotrophic lateral sclerosis (ALS) were found. The profiles of molecular species of sphingomyelins (SM) and ceramides (CER) in the structure of the brain and in the spinal cord were analyzed. During the development of ALS, changes in the spectrum of molecular types of CER were noted only in the spinal cord, where almost all CER decreased in relation to the control after 2 and 3 months of the course of the disease. After 4 months of the development of the pathology, an increase in the expression of the acid ceramidase gene is observed, as a result of which sphingosine can be formed, which has pronounced proapoptotic properties. Analysis of gene expression of CER metabolism enzymes and galactosylceramide (GalCER) indicates the possibility of GalCER involvement as a source for maintaining CER levels at the terminal stage of ALS. Thus, the metabolism of sphingolipids is a promising field of study of the processes associated with ALS, both in the context of the search for potential diagnostic markers and effective drugs, and for explaining the pathogenesis of ALS.

Keywords: amyotrophic lateral sclerosis (ALS), FUS(1-359) transgenic mice, sphingomyelin, ceramide, ceramidases, galactosylceramidase, galactosylceramide synthase