СОДЕРЖАНИЕ

Том 47, номер 4, 2021

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

IgA1-протеаза как основа вакцины для профилактики бактериальных менингитов (Обзорная статья)	
Л. С. Жигис, О. В. Котельникова, А. А. Зинченко, Д. М. Карлинский, Ю. А. Прокопенко, Л. Д. Румш	419
Современные подходы к поиску анксиолитических средств	
Д. В. Мальцев, А. А. Спасов, М. В. Мирошников, М. О. Скрипка	431
Фосфолипазы с бактерий рода <i>Bacillus</i> : биологическая роль, свойства и области применения	
Ю. А. Меркульева, Д. Н. Щербаков, Е. А. Шарлаева, В. Ю. Чиркова	464
Рецепторы вазопрессина в кровеносных сосудах и пролиферация эндотелиоцитов	
И. И. Хегай	472
Получение модифицированной гиалуроновой кислоты с контролируемым содержанием винильных групп с целью создания скаффолдов методом фотоиндуцируемой реакции сшивки	
А. В. Сочилина, А. Г. Савельев, Р. А. Акасов, В. П. Зубов, Е. В. Хайдуков, А. Н. Генералова	486
Производное нейротоксина скорпиона BeM9, селективное в отношении потенциал-чувствительных натриевых каналов насекомых	
М. А. Черных, Н. А. Кульдюшев, С. Пеньёр, А. А. Беркут, Я. Титгат, Р. Г. Ефремов, А. А. Василевский, А. О. Чугунов	495
Синтез, противовоспалительные свойства и молекулярный докинг 2-(5-арилтетразол-2-ил)- и 2-(1 <i>H</i> -тетразол-5-илсульфанил)- <i>N</i> -тиазол-2-илацетамидов	
Т. И. Чабан, В. Т. Фолюш, В. В. Огурцов, В. С. Матийчук	506
Синтез и цитотоксическая активность продуктов присоединения тиофенола к сесквитерпеновым лактонам	
А. В. Семаков, Л. В. Аникина, С. Г. Клочков	513
Синтез изонитрильных производных диглицеридов и углеводов для многокомпонентной реакции Уги	
А. И. Ничуговский, А. А. Хрулёв, К. А. Перевощикова, Д. А. Чешков, Н. Г. Морозова, М. А. Маслов	526



УДК 577.152.342*172

IgA1-ПРОТЕАЗА КАК ОСНОВА ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕНИНГИТОВ

© 2021 г. Л. С. Жигис^{*, #}, О. В. Котельникова^{*}, А. А. Зинченко^{*}, Д. М. Карлинский^{*}, Ю. А. Прокопенко^{*}, Л. Д. Румш^{*}

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

> Поступила в редакцию 17.08.2020 г. После доработки 15.11.2020 г. Принята к публикации 20.11.2020 г.

Обзор посвящен изучению протективных свойств IgA1-протеазы и возможности создания вакцинного препарата для профилактики бактериальных менингитов различного происхождения на ее основе. Бактериальный менингит относится к группе социально опасных заболеваний и характеризуется тяжелым течением, многочисленными осложнениями и высокой смертностью. Используемые в настоящее время в мировой практике подходы к созданию антимикробных вакцин основаны на узкой направленности против конкретного возбудителя. Разработка однокомпонентной вакцины против широкого спектра бактериальных возбудителей с общим фактором вирулентности по-прежнему остается актуальной. Таким антигеном может служить IgA1-протеаза — белок, выступающий одним из основных факторов вирулентности ряда грамотрицательных и грамположительных бактерий. Бактериальная IgA1-протеаза характеризуется уникальной специфичностью в отношении иммуноглобулинов A1 (IgA1), расшепляя пептилные связи в шарнирных участках IgA1 человека и высших приматов. Бактерии, попадая на слизистую оболочку, разрушают IgA1, выступающий первым барьером защиты организма от инфекций. Нейтрализация IgA1-протеазы на этой стадии может стать препятствием к развитию инфекции, затрудняя адгезию целого ряда патогенов, продуцирующих этот белок. Имеющиеся в литературе данные о механизме противобактериальной защиты носят разрозненный и неоднозначный характер. В обзоре рассматриваются литературные данные и результаты собственных экспериментов по протективной активности IgA1-протеазы. Нами было показано, что рекомбинантная IgA1-протеаза менингококка и некоторые ее фрагменты защищают мышей от заражения живой вирулентной культурой не только менингококков основных эпидемических серогрупп (A, B, C и W135), но и некоторых наиболее распространенных вирулентных серотипов пневмококка. Полученные данные говорят о возможности создания однокомпонентной вакцины против этих и, возможно, других бактериальных инфекций. В настоящее время достигнут значительный прогресс в изучении структуры и функций секретируемых белков у бактерий Neisseria meningitidis и Haemophilus influenzae. Описаны системы транслокации белков N. meningitidis, имеющие отношение к секреции белков у этих бактерий, и представлены современные данные о функциях этих белков. Анализ экспериментальных данных о структуре IgA1-протеазы N. meningitidis и формировании иммунитета при вакцинации имеет ключевое значение при создании профилактических препаратов.

Ключевые слова: IgA1-npomeasa, Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae, вакцина

DOI: 10.31857/S0132342321040217

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время эффективность вакцинации для защиты от инфекционных заболеваний общепризнана во всем мире. За последние 30 лет резко возросло число вновь создаваемых вакцин, благодаря которым были ликвидированы или сведены до минимума более десятка тяжелых инфекций (дифтерия, столбняк, краснуха, полиомиелит и др.).

Используемые в настоящее время в мировой практике подходы к созданию антимикробных вакцин основаны на узкой направленности против конкретного возбудителя. Для защиты от всего многообразия циркулирующих и непрерывно

Сокращения: IgA1 – иммуноглобулин A1; sIgA1 – секреторный иммуноглобулин; OMV – белки наружной мембраны; Hib – *H. influenzae* типа b; ECM – внеклеточный матрикс.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (916) 388-90-55; эл. почта: zhigis@ibch.ru).

мутирующих штаммов этих микробов требуется комплексная вакцинация, включающая в себя многократное введение каждого компонента. Разработка, испытания и производство таких препаратов требуют огромных расходов, что существенно сказывается на себестоимости вакцинных препаратов. Высокая стоимость производимых вакцин делает их труднодоступными для многих развивающихся стран и осложняет процесс вакцинопрофилактики широких слоев населения.

Разработка однокомпонентной вакцины против широкого спектра бактериальных возбудителей с общим фактором вирулентности по-прежнему остается актуальной, а поиск соответствующих иммунологически безвредных протективных антигенов — важная научно-исследовательская задача.

Одним из перспективных протективных антигенов с точки зрения создания такой вакцины может служить бактериальная IgA1-протеаза, которая секретируется рядом грамотрицательных (Neisseria meningitidis, N. gonorrhoeae, Haemophilus influenzae) и грамположительных (Streptococcus pneumoniae, S. sanguis, S. oralis) бактерий [1-6]. IgA1-протеазы представляют собой семейство сериновых (Е.С. 3.4.21.72) и металло-(Е.С. 3.4.24.13) эндопептидаз. Эти ферменты характеризуются уникальной специфичностью в отношении иммуноглобулинов А1, обладая способностью расщеплять пептидные связи в шарнирных участках сывороточного (IgA1) и секреторного (sIgA1) иммуноглобулинов A1 человека и высших приматов [4, 7]. Бактерии, заселяя слизистую оболочку, разрушают sIgA1, который присутствует на слизистой оболочке в значительном количестве и служит первым барьером защиты организма от инфекций. Нейтрализация IgA1протеазы на этой стадии инвазии может стать препятствием для развития инфекции, затрудняя адгезию бактерий на поверхности слизистой оболочки.

В данном обзоре обсуждаются проблемы создания монокомпонентной поливакцины для профилактики бактериальных менингитов, возбудителями которых выступает широкий спектр грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов, патогенность которых обусловлена IgA1-протеазой.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ МЕНИНГИТЫ

Бактериальный менингит — заболевание с высоким эпидемическим потенциалом, которое характеризуется тяжелым течением и часто носит молниеносный характер. Между появлением первых симптомов, сходных с таковыми при ОРВИ и других инфекционных заболеваниях, и развитием токсического шока с высоким летальным исходом может пройти менее 24 ч, что затрудняет возможность оказания своевременной специализированной помощи. До 19% переболевших имеют серьезные отдаленные последствия, включая неврологические нарушения, судороги, потерю слуха или зрения, психологические нарушения, потерю конечностей и др. [8–10].

К возбудителям бактериального менингита относится широкий круг патогенов различной этиологии. Основные возбудители — *N. meningitidis, H. influenzae* и *S. pneumoniae*, вызывающие более 90% от всех случаев заболевания менингитом после младенческого возраста [11].

Neisseria meningitidis. Хотя клиническое описание менингита как заболевания появилось в начале 1880-х гг. [12], первые данные о его возбудителе, выделенном из спинномозговой жидкости больного, были опубликованы в статье Marchiafava et al. в 1884 г. [13]. Три года спустя были описаны идентификация и культивирование этой бактерии [14]. Патогенный микроорганизм *N. meningitidis*, проникая через эпителиальный барьер носоглотки и достигая кровотока, вызывает сепсис, а преодолевая гематоэнцефалический барьер, вызывает токсический отек головного мозга – менингит [15, 16].

Показатель заболеваемости, вызванной менингококком, может варьировать от <1 до 1000 случаев на 100 тыс. населения в зависимости от региона, времени года, демографических данных и других факторов [17].

N. meningitidis остается одной из наиболее распространенных причин менингита во многих географических районах, включая США, и выступает единственной бактерией, способной вызывать крупные вспышки этого заболевания [18–20]. В развитых странах уровень смертности составляет 10–15%, а в развивающихся странах – до 20% [12].

На основе структуры капсульного полисахарида *N. meningitidis* разделяют на 13 серогрупп, пять из которых (A, B, C, W и Y) ответственны за большинство менингококковых заболеваний.

Учитывая способность менингококка быстро вызывать смертельные и эпидемические заболевания во всем мире, понимание превентивных стратегий против этого патогена — глобальный приоритет для здравоохранения.

Первые менингококковые вакцины были созданы на основе капсульных полисахаридов *N. meningitidis* соответствующих серогрупп, однако эти вакцины оказались эффективными только для взрослого населения. У детей до одного года иммунитет на эти вакцины не формировался. Кроме того, полисахаридные вакцины – тимуснезависимые и не затрагивают механизмы клеточного иммунитета. Их действие основано на формировании специфических антител только к капсульному полисахариду данной серогруппы менингококка.

Толерантность детей раннего возраста к полисахаридным вакцинам удалось преодолеть только с конца 1990 г. после создания вакцин на основе капсульных полисахаридов, конъюгированных с различными белковыми носителями.

Преимуществом конъюгированных вакцин выступает их способность под влиянием антигенаносителя генерировать тимус-зависимый ответ и вызывать формирование иммунологической памяти, а также снижать бактерионосительство и, следовательно, предотвращать распространение инфекции. Наибольший интерес представляют 4-валентные вакцины против *N. meningitidis* серогрупп A, C, W и Y на основе их капсульных полисахаридов, конъюгированных с дифтерийным анатоксином, предназначенные для вакцинации людей всех возрастов, включая детей от двух месяцев [18].

Проблематичной оказалась разработка эффективной вакцины против менингококка серогруппы В на основе его капсульного полисахарида в связи с высоким сродством этого антигена с ганглиозидами эмбриональных тканей человека, что чревато возникновением аутоиммунного процесса [21]. В то же время заболеваемость менингитом, вызванным менингококком серогруппы В, в некоторых европейских странах достигает 64% [22]. В конце 2012 г. появилось сообщение о клинических испытаниях многокомпонентной вакцины 4CMenB против менингококка серогруппы В на основе белков, характерных для недавно возникшего эпидемического штамма, а также трех поверхностных белков, обнаруженных при секвенировании бактериального генома [23-25].

Вакцины против менингококка серогруппы В на основе белков наружной мембраны (OMV) применяли во многих странах (Куба, Южная Америка, Норвегия и Новая Зеландия). Вакцина MeNZB, использованная в Новой Зеландии, была эффективна в снижении показателей заболеваемости и в борьбе с эпидемией, вызванной менингококком серогруппы В [26]. Создание полноценной вакцины на основе белков наружной мембраны менингококка было затруднено из-за высокой вариабельности этих белков.

Вакцины MenB-4C (Bexsero; Novartis Vaccines, Италия) и MenB-FHbp (Trumenba; Wyeth Pharmaceuticals, США) с более широким спектром действия, чем вакцины на основе OMV, были одобрены для использования в США, причем первая также одобрена к применению в странах Европы, Канаде и Австралии [18, 23]. К настоящему моменту в практике здравоохранения имеется широкий набор вакцин против различных серогрупп менингококка. Однако эти вакцины — многокомпонентные и требуют проведения нескольких повторных инъекций, что значительно увеличивает антигенную нагрузку на организм человека, в особенности детей младших возрастов.

Наеторhilus influenzae. Данный патоген – грамотрицательная факультативная аэробная палочка. На основе структуры полисахаридной капсулы выделяют 6 серотипов *H. influenzae* (a, b, c, d, e, f), вызывающих инвазивные формы, в 95% случаев обусловленные серотипом b.

Н. influenzae типа b (Hib) — возбудитель тяжелых инфекций у детей до 5 лет — в разных странах Европы в период до вакцинации вызывал 5–46 случаев на 100 тыс. детей и до 200 случаев в странах Африки с летальностью до 40% [27]. В мире в 2000 г. эта инфекция охватила 8.1 млн детей в возрасте 0–5 лет, при этом менингит был диагностирован в 60% случаев, из которых было зарегистрировано 363 тыс. летальных исходов. В России в 2005–2007 гг., в зависимости от региона, было выявлено 5–57% случаев гнойных менингитов, обусловленных Hib, с летальностью 5–15%. До 35% переболевших детей страдают стойкими дефектами ЦНС, до 5–10% — плевропневмонией, до 80% — эпиглоттитом [28].

Первая вакцина против Нів на основе капсульного полисахарида была лицензирована в США в 1985 г., но оказалась неэффективной для детей до 18 месяцев.

Капсульные полисахариды Hib, конъюгированные со столбнячным анатоксином, нетоксичным вариантом дифтерийного токсина, белком внешней мембраны *N. meningitidis* серогруппы B, – основа комбинированных препаратов Пентаксим (Санофи Пастер, Франция) и Инфанрикс-Гекса (Глаксо Смит Кляйн, Бельгия) [29]. Вакцинация этими препаратами приводит к снижению заболеваемости тяжелой пневмонией на 20–25%. Однако у 18% вакцинированных наблюдались различные осложнения, а у 33% отмечались низкие уровни защитных антител.

С 2013 г. конъюгированные вакцины стали применять в 184 странах мира. Несмотря на это, в мире ежегодно регистрировалось до 199 тыс. летальных исходов, что поставило Hib на третье место по летальности после пневмококковой и ротавирусной инфекций [29, 30].

В настоящее время в реестре ВОЗ зарегистрированы три вакцины на основе капсульного полисахарида Hib, конъюгированного со столбнячным анатоксином: вакцина гемофильная тип В (ФБУН "Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии", Россия), Акт-Хиб (Санофи Пастер, Франция) и Хиберикс (Глаксо Смит Кляйн, Бельгия) [29]. Эффективность этих вакцин составляет 95–100%, а защитный титр антител сохраняется не менее 4 лет.

Streptococcus pneumoniae. Заболевания, вызываемые у человека этим возбудителем — самые частые во всем мире: ежегодно умирает более 1 млн человек, из которых больше половины — дети до 5 лет. В отсутствие вакцинации в России фиксируют 300—700 случаев заболевания на 100 тыс. населения, что согласуется с результатами зарубежных исследований [31—33]. Особой тяжестью отличается пневмококковый менингит [28].

В настоящее время для профилактики пневмококковой инфекции применяют как полисахаридные вакцины Пневмо 23 (Санофи Пастер, Франция) и Пневмовакс 23 (Мерк, Шарп и Доум, США), представляющие собой смесь очищенных капсульных полисахаридов 23 наиболее часто встречающихся серотипов пневмококка, так и вакцины на основе капсульных полисахаридов, конъюгированных с белком-носителем: Превенар 13 (Пфайзер, США) и Синфлорикс-10 (Глаксо Смит-Кляйн, Бельгия).

Применение этих вакцин в значительной степени ограничено из-за изменчивости серотипа и геномной пластичности, выступающими характерными чертами этой бактерии, а все возрастающая частота лекарственной устойчивости штаммов подчеркивает важность разработки противопневмококковых вакцин нового поколения, охватывающих многие серотипы [7, 18].

Несмотря на появление новых антибиотиков и вакцин, пневмококки продолжают вызывать по всему миру заболевания детей раннего возраста, пожилых людей и людей с ослабленным иммунитетом. Высокая заболеваемость и смертность от этой инфекции в последние десятилетия привели к необходимости разработки новых вакцин. Таким образом, замена всего огромного арсенала противобактериальных вакцин на одну монокомпонентную представляется целесообразным.

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ СЕРИНОВЫХ IgA1-ПРОТЕА3

В настоящее время достигнут значительный прогресс в изучении структуры и функций белков бактерий *N. meningitidis*. В обзоре Tommassen et al. [34] описаны системы транслокации, механизмы секреции и функции ряда белков *N. meningitidis*, в том числе IgA1-протеазы, классического аутотранспортера грамотрицательных бактерий.

Аутотранспортеры содержат три основных участка: сигнальный пептид, транспортируемый домен и транслокаторный домен (TD) [6, 35, 36] (рис. 1). Транспортируемый домен IgA1-протеазы расположен между сигнальным пептидом и транслокаторным доменом и состоит из двух субдоменов: *N*-концевого протеазного домена и α-пептида, связанных между собой небольшим у-пептидом. Транслокаторный домен расположен в С-концевом участке IgA1-протеазы и содержит линкерный пептид и **β**-кор. *N*-Концевой сигнальный пептид принимает участие в транспорте белка через цитоплазматическую мембрану. TD формирует во внешней мембране канал, через который транспортируемый домен переносится во внеклеточное пространство. На внешней мембране бактерии IgA1-протеаза подвергается аутокаталитическому расщеплению в сайтах (PAPSP, PPSP или PPAP), расположенных между протеазным доменом и ү-пептидом, между ү-пептидом и α-пептидом и между α-пептидом и линкерным пептидом. Наличие последнего участка процессинга зависит от штамма [6]. В некоторых случаях весь транспортируемый домен, включая линкерный пептид, может высвобождаться после расщепления аутотранспортерной протеазой NalP (рис. 1) [6, 37].

IgA1-протеаза расщепляет иммуноглобулин А1 человека в сайте TPPTPSPS, который гомологичен сайтам аутокаталитического процессинга и находится в шарнирной области между доменами Fab и Fc [38]. IgA1-протеаза не расщепляет иммуноглобулин IgA2, в котором отсутствует такой сайт расщепления (рис. 2) [39, 40]. Расщепление IgA1 может ингибировать IgA-опосредованную агглютинацию и последующий механический клиренс бактерий в носоглотке. Также было показано, что IgA1-протеаза расщепляет ассоциированный с лизосомами мембранный белок LAMP1 [41], который, как сообщалось ранее, способствует выживанию бактерий в эпителиальных клетках [42], и трансцитозу через поляризованный эпителий [43]. Кроме того, IgA1-протеаза расщепляет везикулярный мембранный белок синаптобревин II в хром-аффинных клетках [44] и хорионический гонадотропный гормон человека [45], но физиологические последствия такого расщепления не ясны. Все эти альтернативные субстраты содержат мишень, гомологичную сайтам аутокаталитического расщепления.

Идентификация бактериальных IgA1-протеаз, их протеазная активность, специфичность и структура подробно описаны в обзоре Nicole et al. [36]. IgA1-протеазы *H. influenzae*, *N. meningitidis* и *N. gonorrhoeae* обладают значительной гомологией, имеют структуры, характерные для аутотранспортеров, и подвергаются аутопротеолитическо-



Рис. 1. Доменная структура IgA1-протеазы *H. influenzae* [6]. Представлено схематическое строение полноразмерной IgA1-протеазы с положениями участков аутокаталитического процессинга и их последовательностями, а также с положением участка расшепления протеазой NaIP.



Рис. 2. Последовательности шарнирных пептидов IgA1 и IgA2 человека и расположение сайтов расщепления различными членами семейства IgA-протеаз [38, 39].

му расщеплению, что приводит к высвобождению транспортируемого домена из встроенного в мембрану β -цилиндрического домена [35, 46— 48]. IgA1-протеазы большинства штаммов *H. influenzae*, *N. meningitidis* и *N. gonorrhoeae* способны расщеплять сывороточный IgA1 и в меньшей степени – димерную секреторную форму IgA1. В работе Kilian et al. [49] была исследована эффективность расщепления иммуноглобулинов внеклеточными штаммами *Haemophilus* и *S. pneumoniae* и показано, что *H. influenzae* и *S. pneumoniae* вырабатывают фермент, селективно расщепляющий белки миеломы IgA1 человека, но не активный в отношении ряда других белков, включая IgA2, IgG и IgM человека, секреторный белок свиней и крупного рогатого скота. Ни один из непатогенных штаммов *Haemophilus* не продуцировал протеазу IgA1. Следовательно, продукция IgA1-протеазы — важный фактор в патогенезе этого заболевания.

Как отражение структуры клональной популяции инкапсулированных изолятов *H. influenzae*, типируемые штаммы характеризуются IgA1-протеазами с аналогичной расщепляющей способностью. Напротив, нетипируемые IgA1-протеазы *H. influenzae* (NTHi) характеризуются высокой вариабельностью в отношении антигенности, предположительно из-за горизонтального переноса гена и рекомбинации между несколькими колонизирующими штаммами, чтобы уклоняться от защиты иммунной системой [50, 51]. Эта вариабельность приводит к изменению протеолитической активности от штамма к штамму для изолятов NTHi от больных пациентов с более высоким уровнем активности по сравнению с колонизирующими NTHi [52].

В работе Nicole et al. [36] показано, что IgA1протеазы, аутотранспортеры Нар, Ніа и Hsf *H. influenzae* — факторы вирулентности, способствующие колонизации и выживаемости бактерий в организме человека. Адгезия к респираторному эпителию, формирование микроколоний, приводящее к образованию биопленки, и протеазная активность, способствующая распространению бактерий и уклонению от иммунитета — важные патогенные механизмы, которые опосредуются этими белками. Описаны механизмы, с помощью которых эти факторы вирулентности могут действовать совместно для ускорения инфицирования бактериями *H. influenzae*.

Ніа-опосредуемая адгезия к эпителиальным клеткам и Нар-опосредованная адгезия как к эпителиальным клеткам, так и к внеклеточному матриксу (ECM) могут быть ответственны за пер-

воначальный контакт с организмом хозяина, в то время как IgA1-протеаза расшепляет IgA1, зашищая бактерии от врожденного иммунного ответа. По мере прогрессирования инфекции взаимодействия белков Нар-Нар приводят к формированию микроколоний и могут в конечном итоге привести к формированию биопленки, что представляет собой еще один механизм уклонения от иммунитета. За счет аутопротеолитической активности Нар некоторые бактерии могут высвобождаться из биопленки для колонизации на другом участке. Наконец, бактериальная инвазия, опосредованная Нар, может привести к формированию внутриклеточного бактериального резервуара, который может быть ответственным за рецидивирующие инфекции, наблюдаемые при хронической обструктивной болезни легких и отите. Дальнейшее изучение этих белков может способствовать более подробной оценке развития заболевания, вызванного бактериями H. influenzae, и ускорить разработку новых противомикробных препаратов [36].

Были исследованы трехмерные структуры указанных выше белков *H. influenzae* [53, 54]. В кристаллической структуре транспортируемого домена в качестве основных структурных компонентов были выявлены *N*-концевой трипсино/химотрипсиноподобный протеазный домен и β-спиральный остов. На рис. 3 представлена трехмерная струк-



Рис. 3. Пространственные структуры транспортируемых доменов IgA1-протеазы и Hap [40]: (*a*) – кристаллическая структура транспортируемого домена IgA1-протеазы с *N*-концевым глобулярным протеазным доменом (обозначен домен 2 - D2); (*б*) – кристаллическая структура транспортируемого домена Hap с *N*-концевым глобулярным протеазным доменом (обозначен с-концевой β -спиральный самоассоциирующийся домен SAAT).

тура IgA1-протеазы по сравнению со структурой транспортируемого домена белка Нар.

β-Спиральный остов содержит ядро из гидрофобных остатков и остатков серина, треонина и аспарагина, расположенных на поверхности цепи и сложенных в складчатую структуру. Он служит для удаления *N*-концевого домена из бактериальной мембраны. *N*-Концевой домен характеризуется глобулярной структурой с уникальными петлями в области укладки химотрипсинового домена, имеющими значение для выбора субстрата [54], и содержит каталитическую триаду, отвечающую за активность протеазы [53]. Активный центр протеазного домена – идеален для остатков пролина, которые, как правило, обнаруживаются в специфических сайтах расщепления белков IgA1-протеазой. Следует отметить, что небольшой домен 2 формирует уникальную петлю, выступающую из стержня В-спирали, придавая белку Ү-образную структуру. Расчетные исследования кристаллических структур IgA1 человека и IgA1-протеазы показали, что Fc-домен IgA1 связывается в углублении, образованном доменом 2 и протеазным доменом, что свидетельствует об участии этого небольшого фрагмента в распознавании субстрата [36, 54]. Уникальная петля расположена над активным центром фермента и выполняет роль крышки, закрытой в отсутствие иммуноглобулина. После связывания Fc-домена IgA1 в углублении, образованном между N-концевым доменом протеазы и доменом 2, присоединенным к β-спиральной цепи, крышка стабилизируется в открытой конформации. Это взаимодействие обеспечивает доступ шарнирного пептида к активному центру, что приводит к распознаванию и расщеплению субстрата. Таким образом обеспечивается протеолитическая специфичность фермента.

IgA1-ПРОТЕАЗА И ЕЕ ФРАГМЕНТЫ КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ И ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

В работе Wang et al. [55] была сконструирована и получена высокоактивная рекомбинантная IgA1-протеаза из *H. influenzae* 49247, способная расщеплять *in vitro* гликозилированный IgA1содержащий иммунный комплекс, с целью возможного использования фермента в качестве терапевтического средства для лечения IgA-нефропатии. Тяжесть нарушений почечной функции, таких как протеинурия и гематурия, также может быть снижена с помощью инъекций IgA1-протеазы [56].

В 2007 г. Vitovski et al. [57] получили ряд белков-предшественников IgA1-протеазы менингококка. Были подробно изучены механизмы аутокаталитической активации этого фермента, но иммуногенные и протективные свойства полученных белков не были исследованы, и возможность их использования в качестве вакцины также не рассматривалась.

В работе Wani et al. [58] была впервые показана активность рекомбинантных форм IgA1-протеазы пневмококка и выявлены специфические ингибиторы, препятствующие колонизации слизистой оболочки пневмококком, а неактивный мутант рассматривался как компонент кандидатной вакцины.

В работе Romanello et al. [59] было показано, что IgA1-протеаза пневмококков связана с поверхностью бактериальной клетки с помощью *N*-концевого мембранного якоря. Описаны клонирование, экспрессия, ферментативная активность и иммуногенность трех фрагментов IgA1протеазы, из которых один включает только аминокислоты *N*-концевого участка. Все полученные мутанты были полностью лишены ферментативной активности. Антигенные свойства рекомбинантных полипептидов авторы тестировали с сыворотками пациентов с диагнозом пневмония различной этиологии. В сыворотках пяти пациентов из девяти были обнаружены антитела к фрагменту IgA1-протеазы (1032-1964 a.o.), у семи пациентов – к фрагменту IgA1-протеазы (708-1964 a.o.). Полноразмерная IgA1-протеаза выявляла антитела во всех сыворотках, указывая на то, что IgA1-протеаза – основной антиген S. pneumo*niae* в патогенезе у человека. Эти фрагменты, так же как и IgA1-протеаза – поверхностные белки, присутствующие практически во всех серотипах пневмококка. Авторы заключили, что эти рекомбинантные белки могут быть кандидатами для создания противопневмококковой вакцины.

Описан синтез *N*-концевых фрагментов IgA1протеазы из *N. meningitidis* серогруппы A, содержащих 40–104 а.о. [60], которые были использованы в качестве пептидов-носителей углеводных компонентов клеточных стенок различных микроорганизмов: *Neisseria*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* и *Haemophilus*. Но конъюгация этих фрагментов с полисахаридом менингококка серогруппы C не позволила получить поливалентные композиции. Они обеспечивали защиту только от менингококка серогруппы C.

Для лечения аутоиммунных и других заболеваний, связанных с накоплением IgA1 в тканях и органах человека, методом рекомбинантных ДНК были получены растворимые формы IgA1-протеазы [61, 62]. Авторы использовали их в качестве терапевтических препаратов, но в качестве вакцины не рассматривали. В статье Gupta et al. [63] описаны результаты компьютерного анализа потенциальных Т-клеточных эпитопов трех белков менингококка серогруппы В: белка А, стимулирующего Т-клетки (TspA), аутотранспортного белка А (AutA) и IgA1протеазы. В результате исследования были выявлены шесть девятичленных Т-клеточных эпитопов. Авторы предположили, что эти пептиды могут быть использованы в качестве перспективных агентов для защиты от менингококков серогруппы В, но экспериментальные данные, подтверждающие эту гипотезу, в работе не приведены, и возможность получения поливалентной вакцины на их основе также не обсуждалась.

В дальнейшем многими авторами высказывалось предположение, что IgA1-протеаза — важнейший фактор вирулентности бактерий, может быть использована как средство защиты от этих патогенов [17, 63].

Экспериментальное подтверждение протективной активности IgA1-протеазы представлено небольшим количеством работ. В серии работ [64—74] в опытах на животных было показано, что нативная IgA1-протеаза, выделенная из живой вирулентной культуры *N. meningitidis* серогруппы A, а также рекомбинантные IgA1-протеазы *N. meningitidis* серогруппы B в активной или мутантной формах и некоторые укороченные аналоги этих белков обладают высокой иммуногенной и протективной активностью.

На примере отдельных низкомолекулярных фрагментов IgA1-протеазы показана важная роль В- и Т-эпитопов, расположенных в *N*-концевом участке IgA1-протеазы *N. meningitidis* серогруппы В (штамм H44/76), для сохранения иммуногенных и протективных свойств [64, 65]. Эти белки защищали мышей от заражения живой вирулентной культурой менингококков основных эпидемических серогрупп (A, B и C) и обладали характерной для белков способностью к формированию иммунологической памяти [68, 69, 73].

В опытах острого заражения животных показана роль клеточного и гуморального факторов в формировании иммунитета к менингококку серогруппы В. Защиту иммунизированных животных обеспечивали как иммунные лимфоциты, так и специфические антитела, способные *in vitro* связываться с IgA1-протеазой *N. meningitidis* [69].

Было также показано, что специфические антитела, образующиеся при иммунизации животных аналогами IgA1-протеазы или при инфицировании менингококком, способны связываться не только с секретируемым ферментом, но и с поверхностью микробных клеток [66].

Анализ популяционного состава лимфоцитов (CD4⁺, CD8⁺ и CD19⁺) в крови и селезенке имму-

низированных животных на момент заражения менингококками показал, что механизм защиты обусловлен различными популяциями лимфоцитов в зависимости от структуры иммуногенов [69].

Аналогичные результаты были получены при изучении стрептококковых IgA1-металлопротеаз для защиты животных от заболеваний, вызываемых пневмококками и *S. suis* серотипа 2. Авторы рассматривают этот белок и его фрагменты в качестве протективного поверхностного антигена IgA1-протеазы [5, 75].

Группа авторов [75–78] исследовала антигенный состав и сходство IgA1-протеаз различных представителей микробов серинового типа и металлопротеаз, патогенность которых обусловлена IgA1-протеазой. Обнаружено высокое сходство эпитопов IgA1-протеаз *N. meningitidis* и *N. gonorrhoeae*, что делает их привлекательными компонентами потенциальной вакцины широкого профиля. Незначительным оказалось сходство указанных эпитопов с IgA1-металлопротеазами *S. pneumoniae* [77].

Позднее Kotelnikova et al. [68] установили, что иммунизация животных IgA1-протеазой *N. meningitidis* и ее аналогами способна обеспечивать формирование иммунологической памяти и защиту от смертельного заражения не только менингококковой, но и пневмококковой инфекциями. Напротив, сыворотки кроликов, иммунизированных убитой культурой *S. pneumoniae*, содержали высокие титры протективных антител к IgA1-протеазе *N. meningitidis* и ее фрагментам.

Эти результаты представляют особый интерес, поскольку IgA1-протеаза *S. pneumoniae* относится к классу металлопротеаз и существенно отличается по аминокислотной последовательности от сериновых IgA1-протеаз, секретируемых *N. meningitidis, N. gonorrhoeae* и *H. influenzae*. Протективная активность менингококковой IgA1-протеазы и ее аналогов при инфицировании животных *S. pneumoniae* может зависеть от наличия у этих белков конформационных эпитопов, близких по структуре к эпитопам поверхностных белков пневмококков. Кроме того, секретируемые протеазы могут иметь несколько мишеней и, таким образом, разными способами вмешиваться в метаболизм и иммунный ответ хозяина [34, 79, 80].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ литературных данных показал, что разработка вакцин против бактериальных менингитов на основе поверхностных антигенов микроорганизмов, вызывающих эти заболевания, привела к созданию целого ряда эффективных препаратов строго направленного действия против конкретного возбудителя. Поиски новых вакцинных антигенов стимулировали исследования не только поверхностных, но и секретируемых белков. Интересным направлением стало изучение IgA1-протеазы как одного из основных факторов вирулентности, способствующих колонизации и выживаемости микрооганизмов в организме человека. Нейтрализация IgA1-протеазы на этой стадии инвазии может стать препятствием для развития инфекций, патогенность которых обусловлена этим ферментом. IgA1-протеаза способствует взаимодействию патогена с хозяином (адгезия к клеткам организма-хозяина, уклонение от формирования приобретенного иммунитета, предотвращение активации комплемента, нейтрализация антимикробных пептидов, деградация иммуноглобулинов и т.д.).

Представленные данные о свойствах IgA1-протеаз ряда патогенных микроорганизмов показали, что высокая иммуногенная и протективная активность рекомбинантных вариантов фермента и некоторых его фрагментов в отношении грамотрицательных (N. meningitidis, N. gonorrheoeae, H. influenzae) и некоторых грамположительных (S. pneumoniae, S. suis) бактерий, в совокупности с высокой гомологией консервативных участков первичной структуры полноразмерных IgA1-протеаз, позволяют говорить о возможности формирования перекрестного иммунитета к различным возбудителям, патогенность которых обусловлена IgA1протеазой. Приведенные исследования свидетельствуют о возможности и целесообразности создания монокомпонентной вакцины широкого спектра действия против ряда бактериальных инфекций.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-50-00131).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

 Henderson I.R., Nataro J.P. // Infect. Immun. 2001. V. 69. P. 1231–1243. https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1231-1243.2001

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 47 № 4 2021

- Казеева Т.Н., Шевелев А.Б. // Биохимия. 2007. Т. 72. С. 485–494. https://doi.org/10.1134/s0006297907050045
- Mistry D., Stockley R.A. // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2006. V. 38. P. 1244–1248. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.10.005
- Plaut A.G., Bachovchin W.W. // Methods Enzymol. 1994. V. 244. P. 137–151. https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)44012-3
- Lei F, Zhao J., Lin L., Zhang Q., Xu Z., Han L., Xie C., Zhou R., Jin M., Zhang A. // Microbes Infect. 2016. V. 18. P. 285–289. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.12.005
- Roussel-Jazédé V., Arenas J., Langereis J.D., Tommassen J., van Ulsen P. // Microbiology. 2014. V. 160. P. 2421– 2431. https://doi.org/10.1099/mic.0.082511-0
- Kilian M., Thomsen B., Petersen T.E., Bleeg H. // Mol. Immunol. 1983. V. 20. P. 1051–1058. https://doi.org/10.1016/0161-5890(83)90046-9
- Meningococcal vaccines: WHO position paper, November 2011 // Wkly Epidemiol. Rec. 2011. V. 86. P. 521–539.
- Erickson L.J., De Wals P., McMahon J., Heim S. // Clin. Infect. Dis. 2001. V. 33. P. 737–739. https://doi.org/10.1086/322587
- Edwards M.S., Baker C.J. // J. Pediatr. 1981. V. 99. P. 540–545. https://doi.org/10.1016/s0022-3476(81)80250-8
- Agrawal S., Nadel S. // Pediatr. Drugs. 2011. V. 13. P. 385–400. https://doi.org/10.2165/11593340-000000000-00000
- Stephens D.S., Apicella M.A. // In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases / Eds. Bennett J.E., Dolin R., Blaser M.J. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2015. P. 2425–2445.
- Marchiafava E., Celli A. // Gazz. degli Ospedali. 1884. V. 5. P. 59.
- Weichselbaum A. // Fortschr. Med. 1887. V. 5. P. 573– 583.
- 15. *Pace D., Pollard A.J.* // Vaccine. 2012. V. 30. P. B3–B9. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.12.062
- Takada S., Fujiwara S., Inoue T., Kataoka Yu., Hadano Y., Matsumoto K., Morino K., Shimizu T. // Intern. Med. 2016. V. 55. P. 567–572. https://doi.org/10.2169/internalmedicine.55.3272
- Rouphael N.G., Stephens D.S. // Methods Mol. Biol. 2012. V. 799. P. 1–20. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-346-2
- Crum-Cianflone N., Sullivan E. // Infect. Dis. Ther. 2016. V. 5. P. 89–112. https://doi.org/10.1007/s40121-016-0107-0
- Girard M.P., Preziosi M.P., Aguado M.T., Kieny M.P. // Vaccine. 2006. V. 24. P. 4692–4700. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.03.034
- Thigpen M.C., Whitney C.G., Messonnier N.E., Zell E.R., Lynfield R., Hadler J.L., Harrison L.H., Farley M.M., Reingold A., Bennett N.M., Craig A.S., Schaffner W.,

Thomas A., Lewis M.M., Scallan E., Schuchat A., Emerging Infections Programs Network // N. Engl. J. Med. 2011. V. 364. P. 2016–2025. https://doi.org/10.1056/nejmoa1005384

- Caron F., du Châtelet I.P., Leroy J.P., Ruckly C., Blanchard M., Bohic N., Massy N., Morer I., Floret D., Delbos V., Hong E., Révillion M., Berthelot G., Lemée L., Deghmane A.E., Bénichou J., Lévy-Bruhl D., Taha M.K. // Lancet Infect. Dis. 2011. V. 11. P. 455–463. https://doi.org/10.1016/s1473-3099(11)70027-5
- Королева И.С., Белошицкий Г.В., Закроева И.М., Королева М.А. // Инфекция и иммунитет. 2012. Т. 2. С. 546–547.
- Gossger N., Snape M.D., Yu L.M., Finn A., Bona G., Esposito S., Principi N., Diez-Domingo J., Sokal E., Becker B., Kieninger D., Prymula R., Dull P., Ypma E., Toneatto D., Kimura A., Pollard A.J., European MenB Vaccine Study Group // JAMA. 2012. V. 307. P. 573–582. https://doi.org/10.1001/jama.2012.85
- 24. Granoff D.M. // Clin. Infect. Dis. 2010. V. 50. P. S54– S65. https://doi.org/10.1086/648966
- Holst J., Oster P., Arnold R., Tatley M.V., Næss L.M., Aaberge I.S., Galloway Y., McNicholas A., O'Hallahan J., Rosenqvist E., Black S. // Hum. Vaccin. Immunother. 2013. V. 9. P. 1241–1253. https://doi.org/10.4161/hv.24129
- Folaranmi T., Rubin L., Martin S.W., Patel M., Mac-Neil J.R., Centers for Disease Control (CDC) // MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep. 2015. V. 64. P. 608–612.
- 27. *Haemophilus influenzae* type b immunization // Bulletins du Centre International de L'enfance. 1992. P. 33–34.
- Платонов А.Е., Харит С.М., Платонова О.В. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2009. № 5. С. 32-46.
- 29. Озерецковский Н.А., Немировская Т.И. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016. V. 15. P. 61-66.
 - https://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-1-61-66
- Haemophilus influenzae type b (Hib). Green Book. Immunizaition against infections disease // 2013. Part 2. Ch. 16. P. 127–143. https://www.gov.uk/government/publications/haemophilus-influenzae-type-hib-the-green-book-chapter-16
- Козлов Р.С. // Пневмококки: прошлое, настоящее и будущее. Смоленск: Смоленская государственная медицинская академия, 2005. 128 с.
- Таточенко В.А. // Вопр. совр. педиатрии. 2007. Т. 6. С. 85–91.
- Clark J.E., Hammal D., Hampton F., Spencer D., Parker L. // Epidemiol. Infect. 2007. V. 135. P. 262–269. https://doi.org/10.1017/s0950268806006741
- Tommassen J., Arenas J. // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2017. V. 7. P. 256. https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00256
- Pohlner J., Halter R., Beyreuther K., Meyer T.F. // Nature. 1987. V. 325. P. 458–462. https://doi.org/10.1038/325458a0

- Spahich N.A., Geme J.W.St., 3rd // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2011. V. 1. P. 1–9. https://dx.doi.org/10.3389%2Ffcimb.2011.00005
- 37. van Ulsen P., van Alphen L., ten Hove J., Fransen F., van der Ley P., Tommassen J. // Mol. Microbiol. 2003. V. 50. P. 1017–1030. https://doi.org/10.1046/i.1365-2958.2003.03773.x
- Plaut A.G., Gilbert J.V., Artenstein M.S., Capra J.D. // Science. 1975. V. 190. P. 1103–1105. https://doi.org/10.1126/science.810892
- 39. Boehm M.K., Woof J.M., Kerr M.A., Perkins S.J. // J. Mol. Biol. 1999. V. 286. P. 1421–1447. https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2556
- Torano A., Putnam F.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. P. 966–969. https://doi.org/10.1073/pnas.75.2.966
- Hauck C.R., Meyer T.F. // FEBS Lett. 1997. V. 405. P. 86–90. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00163-4
- Lin L., Ayala P., Larson J., Mulks M., Fukuda M., Carlsson S.R., Enns C., So M. // Mol. Microbiol. 1997. V. 24. P. 1083–1094. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4191776.x
- 43. *Hopper S., Vasquez B., Merz A., Clary S., Wilbur J.S., So M.* // Infect. Immun. 2000. V. 68. P. 906–911. https://doi.org/10.1128/iai.68.2.906-911.2000
- Binscheck T., Bartels F., Bergel H., Bigalke H., Yamasaki S., Hayashi T., Niemann H., Pohlner J. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 1770–1774. https://doi.org/10.1074/jbc.270.4.1770
- 45. Senior B.W., Stewart W.W., Galloway C., Kerr M.A. // J. Infect. Dis. 2001. V. 184. P. 922–925. https://doi.org/10.1086/323397
- Grundy F.J., Plaut A.G., Wright A. // Adv. Exp. Med. Biol. 1987. V. 216B. P. 1251–1260.
- Poulsen K., Brandt J., Hjorth J.P., Thogersen H.C., Kilian M. // Infect. Immun. 1989. V. 57. P. 3097–3105. https://doi.org/10.1128/iai.57.10.3097-3105.1989
- Plaut A.G., Qiu J., Geme J.W.St., 3rd // Vaccine. 2000.
 V. 19 (Suppl. 1). P. S148–S152. https://doi.org/10.1016/s0264-410x(00)00296-6
- 49. Kilian M., Mestecky J., Schrohenloher R.E. // Infect. Immun. 1979. V. 26. P. 143–149. https://doi.org/10.1128/iai.26.1.143-149.1979
- Musser J.M., Barenkamp S.J., Granoff D.M., Selander R.K. // Infect. Immun. 1986. V. 52. P. 183–191. https://doi.org/10.1128/iai.52.1.183-191.1986
- Lomholt H., van Alphen L., Kilian M. // Infect. Immun. 1993. V. 61. P. 4575–4581. https://doi.org/10.1128/iai.61.11.4575-4581.1993
- Vitovski S., Dunkin K.T., Howard A.J., Sayers J.R. // JAMA. 2002. V. 287. P. 1699–1705. https://doi.org/10.1001/jama.287.13.1699
- Perona J.J., Craik C.S. // Protein Sci. 1995. V. 4. P. 337–360. https://doi.org/10.1002/pro.5560040301

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 47 № 4 2021

428

- 54. Johnson T.A., Qiu J., Plaut A.G., Holyoak T. // J. Mol. Biol. 2009. V. 389. P. 559–574. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.04.041
- 55. Wang H., Zhong X., Li J., Zhu M., Wang L., Ji X., Fan J., Wang L. // Mol. Biotechnol. 2018. V. 60. P. 134–140. https://doi.org/10.1007/s12033-017-0054-3
- Lechner S.M., Abbad L., Boedec E., Papista C., Le Stang M.B., Moal C., Maillard J., Jamin A., Bex-Coudrat J., Wang Y., Li A., Martini P.G., Monteiro R.C., Berthelot L. // J. Am. Soc. Nephrol. 2016. V. 27. P. 2622–2629. https://doi.org/10.1681/asn.2015080856
- Vitovski S., Sayers J.R. // Infect. Immun. 2007. V. 75. P. 2875–2885. https://doi.org/10.1128/iai.01671-06
- Wani J.H., Gilbert J.V., Plaut A.G., Weiser J.N. // Infect. Immun. 1996. V. 64. P. 3967–3974. https://doi.org/10.1128/iai.64.10.3967-3974.1996
- Romanello V., Marcacci M., Moschioni M., Censini S., Covacci A., Baritussio A.G., Montecucco C., Tonello F. // Protein Expr. Purif. 2006. V. 45. P. 142–149. https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.07.015
- 60. Achtman M., Moreau M. // Patent US 7235242 B2, 26.06.2007.
- Long S., Phan E., Vellard M.C. // J. Biomed. Biotechnol. 2010. V. 2010. P. 1–9. https://doi.org/10.1155/2010/253983
- 62. Plaut A.G, Qiu J. // Patent US 7407653 B2, 05.08.2008.
- Gupta S.K., Smita S., Sarangi A.N., Srivastava M., Akhoond B.A., Rahman Q., Gupta S.K. // Vaccine. 2010. V. 28. P. 7092–7097. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.08.005
- 64. Zinchenko A.A., Alliluev A.P., Serova O.P., Gordeeva E.A., Zhigis L.S., Zueva V.S., Razgulyaeva O.A., Melikhova T.D., Nokel E.A., Drozhzhina E.Yu., Kotelnikova O.V., Rumsh L.D. // J. Meningitis. 2015. V. 1. P. 1–5. https://doi.org/10.4172/2572-2050.1000102
- Зинченко А.А., Котельникова О.В., Гордеева Е.А., Прокопенко Ю.А., Разгуляева О.А., Серова О.В., Мелихова Т.Д., Нокель Е.А., Жигис Л.С., Зуева В.С., Аллилуев А.П., Румш Л.Д. // Биоорг. химия. 2018. Т. 44. С. 61–70. [Zinchenko А.А., Kotelnikova O.V., Gordeeva E.A., Prokopenko Yu.A., Razgulyaeva O.A., Serova O.V., Melikhova T.D., Nokel E.A., Zhigis L.S., Zueva V.S., Alliluev A.P., Rumsh L.D. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. P. 64–72. https://doi.org/10.1134/S1068162018010193]
- 66. Kotelnikova O.V., Zinchenko A.A., Vikhrov A.A., Alliluev A.P., Serova O.V., Gordeeva E.A., Zhigis L.S., Zueva V.S., Razgulyaeva O.A., Melikhova T.D., Nokel E.A., Drozhzhina E.Y., Rumsh L.D. // Bull. Exp. Biol. Med. 2016. V. 161. P. 391–394. https://doi.org/10.1007/s10517-016-3422-2
- Серова О.В., Мельников Э.Э., Зинченко А.А., Котельникова О.В., Аллилуев А.П., Бичучер А.М., Гордеева Е.А., Жигис Л.С., Зуева В.С., Козлов Л.В., Мелихова Т.Д., Нокель Е.А., Ягудаева Е.Ю., Румш Л.Д. // Биофарм. журнал. 2011. Т. З. С. 42–47.
- Kotelnikova O.V., Alliluev A.P., Zinchenko A.A., Zhigisa L., Prokopenko Y., Nokel E.A., Razgulyaeva O.A., Zueva V.S., Tokarskaya M., Yastrebova N., Gordeeva E.A., Melikhova T.D., Kaliberda E.N., Rumsh L.D. // Mi-

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 47 № 4 2021

crobes Infect. 2019. V. 21. P. 336–340. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2019.02.003

- Kotel'nikova O.V., Alliluev A.P., Zinchenko A.A, Prokopenko Yu.A., Zhigis L.S., Zueva V.S., Razgulyaeva O.A., Gordeeva E.A., Melikhova T.D., Nokel' E.A., Rumsh L.D. // Bull. Exp. Biol. Med. 2018. V. 165. P. 763–766. https://doi.org/10.1007/s10517-018-4260-1
- Котельникова О.В., Аллилуев А.П., Дрожжина Е.Ю., Королева И.С., Ситникова Е.А., Зинченко А.А., Гордеева Е.А., Мелихова Т.Д., Нокель Е.А., Жигис Л.С., Зуева В.С., Разгуляева О.А., Серова О.В., Ягудаева Е.Ю., Руми Л.Д. // Биомед. хим. 2014. Т. 60. С. 479–486. https://doi.org/10.18097/pbmc20146004479
- Румш Л.Д., Мельников Э. Э., Аллилуев А.П., Козлов Л.В., Котельникова О.В., Жигис Л.С., Серова О.В., Ягудаева Е.Ю., Бичучер А.М., Зубов В. П., Анохина И. В., Зуева В.С., Аваков А.Э. // Патент RU 2453599 С1, 20.06.2012.
- 72. Румш Л.Д., Серова О.В., Зинченко А.А., Аллилуев А.П., Козлов Л.В., Котельникова О.В., Жигис Л.С., Ягудаева Е.Ю., Андинина С.С., Анохина И.В., Зуева В.С., Гордеева Е.А., Мелихова Т.Д., Нокель Е.А. // Патент RU 2486243 C1, 27.06.2013.
- Зинченко А.А., Серова О.В., Прокопенко Ю.А., Гордеева Е.А., Мелихова Т.Д., Нокель Е.А., Калиберда Е.Н., Котельникова О.В., Жигис Л.С., Разгуляева О.А., Аллилуев А.П., Румш Л.Д. // Патент RU 2701964 С2, 02.10.2019.
- Zhigis L.S., Kotel'nikova O.V., Vikhrov A.A., Zinchenko A.A., Serova O.V., Zueva V.S., Razgulyaeva O.A., Gordeeva E.A., Melikhova T.D., Nokel E.A., Alliluev A.P., Drozhzhina E.Yu., Rumsh L.D. // Biotechnol. Lett. 2015. V. 37. P. 2289–2293. https://doi.org/10.1007/s10529-015-1916-z
- Janoff E.N., Rubins J.B., Fasching C., Charboneau D., Rahkola J.T., Plaut A.G., Weiser J.N. // Mucosal Immunol. 2014. V. 7. P. 249–256. https://doi.org/10.1038/mi.2013.41
- 76. Lomholt H., Kilian M. // Infect. Immun. 1994. V. 62. P. 3178–3183. https://doi.org/10.1128/iai.62.8.3178-3183.1994
- 77. Lomholt H., Poulsen K., Kilian M. // Mol. Microbiol. 1995. V. 15. P. 495–506. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02263.x
- Lomholt J.A., Kilian M. // J. Clin. Microbiol. 2000.
 V. 38. P. 2760–2762. https://doi.org/10.1128/jcm.38.7.2760-2762.2000
- Казеева Т.Н., Шевелев А.Б., Леонович О.А., Фаизов Т.Х., Белякова А.В., Лебедева А.А., Кузнецова Т.В., Маракасова Е.С., Ермохина О.В., Эпова Е.Ю., Дудорова М.Г., Соцкова Д.В., Волкова Е.А., Терехина А.С., Воронова Т.Ю, Васильев И.А. // Электронный научный журнал Современные проблемы науки и образования. 2012. № 1. https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=5096
- Pérez-Ortega J., Rodríguez A., Ribes E., Tommassen J., Arenas J. // Front. Microbiol. 2017. V. 8. P. 434. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00434

IgA1 Protease as a Vaccine Basis for Prevention of Bacterial Meningitis

L. S. Zhigis*, #, O. V. Kotelnikova*, A. A. Zinchenko*, D. M. Karlinsky*,

Yu. A. Prokopenko*, and L. D. Rumsh*

[#]Phone: +7(499) 336-06-00, e-mail: zhigis@ibch.ru

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

This review is intended to the study of the protective properties of IgA1 protease and the possibility of creating a vaccine preparation for the prevention of bacterial meningitis of various origins on its basis. Bacterial meningitis belongs to the group of socially dangerous diseases and is characterized by a severe course, numerous complications and high mortality. The approaches used in the world practice to create antimicrobial vaccines are based on a narrow focus against a specific pathogen. The development of a single-component vaccine against a wide range of bacterial pathogens with a common virulence factor remains relevant. IgA1 protease, a protein that is one of the main virulence factors of a number of gram-negative and gram-positive bacteria, can serve as such an antigen. Bacterial IgA1 protease is uniquely specific for immunoglobulins A1 (IgA1), cleaving peptide bonds in the hinge regions of human IgA1 and higher primates. Bacteria, getting on the mucous membrane, cleave IgA1, which is the body's first barrier against infection. Neutralization of IgA1 protease at this stage can become an obstacle to the development of infection, hindering the adhesion of a number of pathogens producing this protein. Available literature data on the mechanism of antibacterial protection are scattered and ambiguous. We have shown that the recombinant meningococcal IgA1 protease and some of its fragments protect mice from infection with a live virulent culture not only of meningococci of the main epidemic serogroups (A, B, C, and W135), but also of some of the most common virulent pneumococcal serotypes. The data obtained indicate the possibility of creating a single-component vaccine against these and possibly other bacterial infections. At present, significant progress has been achieved in the study of the structure and functions of secreted proteins in the bacteria Neisseria meningitidis and Haemophilus influenzae. The *N. meningitidis* protein translocation systems, which are related to the secretion of proteins in these bacteria, and the current understanding of the functions of these proteins are described. Analysis of experimental data on the structure of IgA1 protease from N. meningitidis and the formation of immunity during vaccination are of key importance in the development of prophylactic preparations.

Keywords: IgA1 protease, Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae, vaccine



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 4, с. 431–463

— ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ —

УДК 615.214.22

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ПОИСКУ АНКСИОЛИТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

© 2021 г. Д. В. Мальцев*, **, #, А. А. Спасов*, **, М. В. Мирошников*, М. О. Скрипка*

 *ФГБОУ ВО "Волгоградский государственный медицинский университет" Минздрава России, Россия, 400131 Волгоград, площадь Павших Борцов, 1
 **ГБУ "Волгоградский медицинский научный центр", Россия, 400131 Волгоград, площадь Павших Борцов, 1
 Поступила в редакцию 04.07.2020 г. После доработки 26.07.2020 г.
 Принята к публикации 28.07.2020 г.

Представлен обзор исследований новых фармакологических субстанций в аспекте их анксиолитической активности. Описанные вещества выступают производными различных химических классов и характеризуются выраженным противотревожным действием. Разнообразие описанных в данной статье синтезированных веществ представляет собой совокупность наиболее интересных и перспективных проектов на данный момент. Согласно современным тенденциям, дальнейшее подробное доклиническое изучение химерных соединений с политаргетным механизмом действия – весьма актуальное направление в химической и фармакологической, а также медицинской сферах деятельности исследователей.

Ключевые слова: анксиолизис, полимодальные соединения, ГАМК, 5-НТ, TSPO, доклинические исследования

DOI: 10.31857/S013234232103012X

введение

По данным ВОЗ, во всем мире зарегистрировано более 260 млн человек, подверженных различным тревожным расстройствам. По причине тревожных и депрессивных расстройств населения мировая экономика ежегодно терпит убытки, оцениваемые в 1 трлн долларов США [1]. На долю лиц с ментальными расстройствами. нужлающихся в систематической помощи, в России приходится 8-10% населения, а число наиболее тяжелых пациентов составляет ~3-6% [2]. Так, наиболее часто в клинической практике встречаются генерализованное тревожное расстройство (ГТР), посттравматическое стрессовое расстройство, паническое расстройство, обсессивно-компульсивное расстройство, социальные фобии и тревожно-депрессивное расстройство [3]. Терапевтическая

коррекция данных патологий на сегодняшний день - проблема весьма актуальная и требующая решения. Классические анксиолитические (транквилизирующие) препараты, к числу которых относятся феназепам, диазепам, алпразолам и др., характеризуются высоким анксиолитическим потенциалом и адекватной скоростью реализации противотревожного эффекта при широком терапевтическом индексе [4], именно поэтому многие из них используются в терапии тревожных патологий уже более 40 лет. Тем не менее данные препараты имеют значительный перечень побочных эффектов, среди которых психическая и физическая зависимость, миорелаксация и седация. Применение указанной группы лекарственных средств ограничено для пациентов, чья профессиональная деятельность связана с повышенным вниманием и координацией движений (водители, диспетчеры и т.п.). "Новые анксиолитики" [5], по классификации Т.А. Ворониной и С.Б. Середенина (2002 г.), к которым относятся частичные агонисты бензодиазепинового рецептора (абекарнил), эндогенные модуляторы ГАМК_Абензодиазепинового рецепторного комплекса (эндозепины), агонисты ГАМК_Б-рецепторного комплекса (фенибут), мембранные модуляторы ГАМК₄-бензодиазепинового рецепторного комплекса (афобазол), глутаматергические (кетамин) и серотонинергические анксиолитики (буспирон), в большинстве случаев характеризуются менее выраженными побочными эффектами, но и

Сокращения: ГАМК – γ-аминомасляная кислота; МАО – моноаминоксидаза; ОАМ – отрицательный аллостерический модулятор; ПАМ – позитивный аллостерический модулятор; ПТСР – посттравматическое стрессовое расстройство; GAT – транспортеры ГАМК (Gamma-aminobutyric acid transporters); GPCR – рецепторы, сопряженные с G-белком (G-protein-coupled receptors); 5-НТ – 5-гидрокситриптамин; mGluRs – метаботропные глутаматные рецепторы; TRPC – транзиторные рецепторы потенциалзависимых катионных каналов (transient receptor potential cation channels); TSPO – внутриклеточный транспортный белок (translocator protein).

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (961) 071-12-50; эл. почта: maltsevdmitriy@rambler.ru).

менее активны при терапии фобических расстройств в сравнении с производными бензодиазепина. Для лечения патологического стресса назначаются также антидепрессанты, преимущественно группы селективных ингибиторов обратного захвата серотонина [6] (флуоксетин), однако и они не лишены ряда нежелательных действий – атипичные реакции, длительное развитие основного эффекта либо его нивелирование. Широкое многообразие препаратов и механизмов их основного действия при лечении тревожных расстройств обусловлено биохимической сложностью и этиологической индивидуальностью патологического процесса. В настоящее время одной из стратегий лечения невротических расстройств выступает одновременное сбалансированное назначение транквилизаторов и антидепрессантов, что значительно повышает эффективность терапии [7]. Другой путь – создание новых полимодальных соединений, сочетающих указанные виды активности [8].

Ввиду частой неклассической картины фобических расстройств, тревожные заболевания следует отличать от непсихических нарушений [3]: соматических, эндокринных расстройств, а также адекватной ситуационной тревоги, носящей мобилизационный характер. Причины симптоматического калейдоскопа, к тому же, могут заключаться в каскадных нарушениях нескольких нейромедиаторных систем [9] (ГАМКергическая, серотонинергическая, глутаматная, эндоканнабиноидная) либо нарушениях взаимодействия между ними.

ОСНОВНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ПСИХИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ЧЕЛОВЕКА

На современном этапе патобиохимические проблемы тревожных расстройств, а также терапевтические пути их решения занимают важное место как в клинической медицинской практике, так и в фундаментальных научных исследованиях [10, 11]. Поскольку тревожно-фобические расстройства — этиологически сложноидентифицируемые патологические состояния [12], на сегодняшний день в фокусе внимания исследователей находится не менее десятка гипотез о механизмах действия и роли медиаторных систем, нарушения которых могут приводить к развитию тревожных заболеваний. Наиболее изученная среди этих систем – ГАМКергический механизм, поскольку дефекты формирования или функционирования рецептора, а также некорректная работа транспортера ГАМК могут приводить к развитию ряда тревожных состояний [13]. Другими наиболее изученными механизмами выступают серотонинергическая [14] и катехоламинергическая системы [15], поскольку их патобиохимическая неполноценность способна негативно сказываться на психическом статусе

пациента в сторону тревожно-фобического состояния, а также приводить к развитию депрессии и хронических стрессовых расстройств.

Помимо вышеназванных систем в настоящее время активно ведутся исследования альтернативных путей, дисрегуляция которых требует коррекции по причине значительного влияния на генез патологий психики. Одни из самых перспективных среди них - ингибиторы TSPO, лиганды которого рассматриваются как чувствительные биомаркеры визуализации нейроочага поражения головного мозга [16, 17]. В то же время они характеризуются анксиолитическим и антидепрессивным эффектом без очевидных побочных действий обычных бензодиазепинов. Также активно разрабатываются новые соединения, аффинные к сигма- [18, 19] и опиоидным рецепторам [20], проводятся эксперименты по снижению побочных эффектов, главными из которых выступают зависимость и аддикция. Еще одно новое направление изучения механизмов действия новых соединений с анксиолитической активностью – ингибиторы ионных каналов транзиторного рецепторного потенциала $TRPC_4$ и $TRPC_5$, эффекты которых связаны с поведенческими изменениями и чувством страха под действием стимуляции GPCRs [21]. Кроме того, ведутся разработки в отношении ингибирования потенциалзависимых натриевых каналов, т.к. ряд источников подтверждает [22, 23], что взаимодействие данного канала с определенными лигандами может приводить к развитию противотревожного эффекта. Помимо этого, существует большой объем информации о разработке новых соединений с Н₃-гистаминергической активностью [24, 25].

В результате открытия новых мишеней для реализации антифобического действия в организме в большом количестве разрабатываются вещества различных химических классов с транквилизирующей активностью, они находятся на доклиническом этапе исследования. Анализируя химическую структуру представленных в данном обзоре субстанций, можно заметить, что с ГАМК-рецептором взаимодействует широкий спектр соединений с выраженной анксиолитической активностью: производные пиперазина, хинолина, диазепинобензимидазола, пиримидина, фторфенилацетамида, бензотриазина, гувацина и синтетических флаваноидов [26]. С серотониновыми рецепторами также взаимодействуют многие из описанных веществ, что подтверждает вовлеченность серотониновой и ГАМКергической систем в корректировку тревожно-фобических состояний и вызывает серьезный исследовательский интерес к природе связи этих систем со стрессово-депрессивными расстройствами. К веществам, влияющим на серотониновые рецепторы [27], относятся производные индола, пиперидина, триазина, бензосульфонамида, пиримидина, пиперазина, бензимидазола и диазепинобензимидазола. К ингибиторам моноаминоксидазы (МАО) относятся производные

пиразола [28], TSPO – производные пурина и пиримидина [16, 17], TRPC₄ и TRPC₅ – производные бензимидазола [21]. Сродство к опиоидным рецепторам [20] проявляли производные тиазола, диазенафтацена, триазола, а к гистаминовым производные пиридина [24, 25]. Стоит отметить влияние глициновых рецепторов в цикле патогенеза тревоги в миндалине мозга человека [29]. Изменения в обменном факторе гуанина – коллибистине (Cb) – приводят к возникновению тревоги, развитию эпилепсии и интеллектуальных нарушений [30]. Некоторые исследования показывают роль рецепторов холецистокинина типа В (ССК-В) в анксиогенезе: введение холецистокинина здоровым добровольцам приводило к развитию тревожного состояния, а пациентам с паническим расстройством – к панической атаке [31]. Однако клиническое исследование этого механизма не приведо к положительным результатам [32]. Известно свойство кофеина, неселективного А_{1/2А}-аденозинового антагониста, в малых дозах улучшать состояние при стрессе и депрессии, но усугублять его в больших дозах [33]. Вовлеченность BNDF в генез тревожных состояний полтверждается также значительным снижением содержания этого фактора в плазме пациентов с ГТР по сравнению с группой здоровых добровольцев [34].

При более детальном анализе химической основы веществ (кора), числа и стереорасположения радикальных заместителей становится очевидно, что многие из представленных соединений проявляют определенное сходство между собой. Поэтому теоретически при химической трансформации структуры вещества возможно взаимодействие и с иными субъединицами рецепторов, терапевтически положительно влияющих на психическое здоровье пациентов. Основываясь на этом предположении, а также приведенной в данном обзоре информации о соединениях, одним из наиболее выгодных направлений в разработке и исследовании веществ с нейропсихотропной активностью представляется синтез новых комбинированных субстанций [35], содержащих привилегированные скаффолды. Примером данного класса соединений слупроизводные диазепинобензимидазола жат [36], содержащие в своей структуре диазепиновый и бензимидазольный фрагменты. Эти вещества с комбинированной структурной основой, в теории, могут проявлять несколько типов активностей, одной из которых может быть противотревожная [37], а дополнительными – антидепрессивная, анальгетическая, снотворная, ноотропная. Эти вещества в перспективе могут оказывать влияние на множество рецепторных систем, что может приводить к более быстрому проявлению терапевтического эффекта, сниженным побочным эффектам или их отсутствию [38], а также наличию терапевтического потенциала и для иных патологических состояний.

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 47 № 4 2021

Исходя из этого, новые комбинированные препараты способны взаимодействовать с несколькими типами мишеней, а при наличии широкой линейки препаратов с комбинированными структурами можно добиться более выраженного анксиолитического эффекта в отдельных клинических ситуациях. Представленная проблематика специфичности терапии тревожных состояний анксиолитическими и антидепрессивными средствами приводит к поиску химически и фармакологически наиболее оптимальных и выгодных субстанций с перспективными анксиолитическими характеристиками (скорость достижения эффекта, его сила и продолжительность) и минимумом побочных эффектов. В данной статье представлен обзор современных литературных данных за последние годы, актуализирована информация о новых соединениях с потенциальной антифобической активностью. Описанные вещества находятся на доклиническом этапе исследований, характеризуются различными механизмами действия и нейропсихотропными свойствами.

Химические структуры описанных в данной статье новых соединений, виды активностей, а также мишени, посредством которых обусловлено действие этих субстанций, приведены в табл. 1.

НЕЙРОМЕДИАТОРНАЯ СИСТЕМА ГАМК

Агонисты ГАМК-рецепторов. ү-Аминомасляная кислота – основной тормозной медиатор ЦНС. Агонистами данного класса выступают производные бензодиазепина – диазепам, феназепам, мидазолам и др. С момента открытия подтипов бензодиазепиновых рецепторов в 1979 г. поиск действенных анксиолитиков со сниженным перечнем побочных действий продолжается и сегодня [39, 40]. Клонирование и экспрессия ГАМК_А-рецепторов выявило несколько подтипов рецепторов, основанных на вариации субъединичного состава. Особое внимание было уделено α-субъединицам, образующим ионный канал, поскольку было доказано, что данные субъединицы оказывают значительное влияние на фармакологическую активность анксиолитиков. α₁-Субъединица ассоциируется с седативным действием; это открытие привело к успешной разработке и внедрению в клиническую практику множества α₁-селективных препаратов со снотворным эффектом, таких как нитразепам, лоразепам, оксазепам. Поскольку было доказано, что α_{2,3}-субъединицы ГАМК_А-рецептора связаны с проявлением анксиолитического эффекта, этот механизм до сих пор остается классическим для поиска новых субстанций с противотревожным действием [41].

Так, в работе Brito et al. (2017) на различных поведенческих моделях изучалась анксиолитическая активность соединения **LQFM032** – производного пиперазина. Исследуемое вещество вводили перорально в дозах 18–162 мкМ/кг. По результатам проведенных исследований, авторами статьи было сделано заключение о вовлечении ГАМКергической системы в генез анксиолитического эффекта соединения LQFM032, поскольку это подтверждалось нивелированием действия вещества при совместном использовании с флумазенилом в тесте "приподнятый крестообраз-ный лабиринт" [42]. Помимо исследования антифобического действия соединения авторы проводили эксперименты по изучению влияния вещества на когнитивные функции в тесте пассивного избегания со скополамином (поскольку анксиолитические эффекты классических агонистов бензодиазепинового сайта связаны с нежелательной антероградной амнезией). По данным нейротоксикологического исследования по Irwin, исследуемое вещество отличается низкой токсичностью (токсические эффекты развивались в дозе 875 мкМ/кг), что также служит положительным фактором. Среди производных пиперазина на сегодняшний момент на рынке уже существует транквилизирующий препарат под названием атаракс (гидроксизин), характеризующийся умеренной анксиолитической активностью и применяемый для купирования различных тревожных состояний [43].

Другой класс потенциальных анксиолитиков – конденсированные производные пиразолохинолина **PQ**, описанные Rivilli et al. в 2018 г. Данные вещества были получены и испытаны как высокоаффинные агонисты бензодиазепинового сайта ионотропного ГАМК_А-рецептора. Преимущество данных соединений по сравнению с бензодиазепинами заключается в отсутствии нежелательного эффекта седации. Предполагаемый ГАМКергический механизм действия веществ был доказан с помощью радиолигандного метода исследования. Проведен детальный химический разбор, в котором авторы дали заключение о высокой селективности связывания с бензодиазепиновым участком ГАМК_А-рецептора с величиной IC₅₀ = = 0.326 нМ для соединений, содержащих в структуре заместитель брома в положении 8, а также *р*-метоксифенильную группу в положении N2. Анксиолитическая активность была подтверждена экспериментально в ряде антифобических моделей. Соединения с метоксифенильной группой при N2 и высокой аффинностью к ГАМК_А-рецепторам показали значительный антифобический эффект, превосходящий препараты сравнения. Авторами сделан вывод о наличии достоверного эффекта в дозах 0.5 и 1.0 мг/кг. Кроме того, авторы указывают на хорошую степень проницаемости гематоэнцефалического барьера для соединения PQ [44].

В работах Tyurenkov et al. изучено влияние нового средства с антидепрессантным, анксиолитическим и нейропротекторным действием – **РГПУ-135** (гидрохлорид β-фенилглутаминовой кислоты, нейроглутам) – на общее состояние и поведение аутбредных мышей при хроническом стрессе, вызванном повторными истощающими физическими нагрузками. Нейроглутам вводили животным внутрижелудочно (через зонд) в дистиллированной воде в дозах 13, 26 и 52 мг/кг на протяжении 6 дней ежедневно однократно за 1 ч до плавания. Установлено, что нейроглутам проявляет стресс-протекторные свойства в дозе 26 мг/кг и в меньшей степени – в дозе 52 мг/кг: уменьшает выраженность нарушений общего состояния и поведения животных в домашней клетке, препятствует снижению массы тела, в постстрессорном периоде способствует повышению локомоторной и исследовательской активности, уменьшению проявлений тревоги в тесте "открытое поле" и выраженности депрессивноподобного поведения мышей в тесте "подвешивание за хвост" [45]. ГАМКергический механизм действия нейроглутама был выявлен путем анализа влияния антагониста ГАМК_А-рецепторов бикукуллина (1 мг/кг) и антагониста ГАМК_Б-рецепторов факлофена (2 мг/кг) на характер и выраженность эффектов нейроглутама (26 мг/кг) в тестах "открытое поле" и "темная/светлая камера". При сочетанном применении нейроглутама и бикукуллина анксиолитический и антилепрессивный эффекты нейроглутама не проявлялись, т.е. для их реализации необходима активация ГАМК_А-рецепторов [46].

Еще один перспективный класс веществ – производные диазепинобензимидазола – **DAB** [38]. Spasov et al. позиционируют структуру соединения как комбинацию привилегированных подструктур – диазепина и бензимидазола. Каждая из них самостоятельно зарекомендовала себя как характеризующаяся психотропной активностью, обе широко применяются в терапии тревожных расстройств. Авторами выдвигается теория об улучшенных нейропсихотропных свойствах со сниженным перечнем побочных эффектов для вновь полученных диазепинобензимидазолов, обусловленных синтетическим преобразованием соединений.

При рассмотрении химической структуры наиболее перспективного соединения — DAB-21, показавшего в тестах in vivo наиболее сильный антифобический потенциал, авторы выдвигают гипотезу о негативном влиянии на анксиолитический эффект исследуемого соединения присутствия в положении 11 2-пирролидиноэтильного радикала и наличия в этом радикале у атома азота насыщенного гетероцикла, но только в том случае, когда для цикла характерна выраженная трехмерная (3D) геометрия. Это характерно именно для шестичленных циклов, но не для пятичленного пирролидина, имеющего более плоскую структуру. Новые соединения позиционируются как вещества с полимодальным механизмом действия, что может быть перспективным критерием в дальнейших исследованиях нейропсихотропного профиля. Так, в работах описывается множество методик анксиолитического, антиде-

435

прессивного, поведенческого, анальгетического профиля, а также оценивается влияние веществ на снижение проявлений обсессивно-компульсивного расстройства. По результатам исследований, представленных в статьях, соединения-лидеры изучаемого ряда веществ **DAB** (**DAB-19**, **DAB-21**) превосходят препарат сравнения диазепам и выступают перспективными для углубленного изучения нейропсихотропного профиля [36, 38, 47].

Аллостерические модуляторы ГАМК_А-рецептора. В ГАМК_А-рецепторе существует целый ряд модуляторных сайтов, отличных от сайта связывания агониста. Различные соединения, действующие на сайты, повышают или, наоборот, снижают эффективность активации ГАМК₄-рецепторов агонистом. Бензодиазепиновый сайт – мишень для ряда препаратов, используемых в клинической практике: антиконвульсантов, седативных и гипнотических средств [48]. Активация бензодиазепинового сайта приводит к увеличению аффинности к агонисту у определенной группы ГАМК_Арецепторов. Было показано, что токи хлорных опосредованные низкоаффинными ионов. ГАМКергическими рецепторами, в гиппокампе усиливаются бензодиазепинами в гораздо большей степени, нежели опосредованные высокоаффинными рецепторами. Такие различия ГАМКергических рецепторов могут быть объяснены различным составом входящих в них субъединиц [49]. Данная теория подтверждается тем, что диазепам приводит к увеличению ГАМКергического ионного тока лишь при наличии у-субъединицы в ГАМК_А-рецепторах. Другим сайтом аллостерической модуляции ГАМК_А-рецепторов выступает сайт барбитуратов. ГАМК₄-рецепторы, чувствительные к барбитуратам, более широко распространены в мозге, чем бензодиазепиновые. В отличие от бензодиазепинов, увеличивающих аффинность ГАМКергического рецептора к агонисту, барбитураты увеличивают время открытого состояния и проводимость каналов ГАМКергического рецептора. Кроме бензодиазепинов и барбитуратов специфичное модулирующее действие на ГАМК_А-рецепторы оказывают нейростероиды и соли цинка [50].

Вогдhese et al. (2017) изучали новый селективный ПАМ ГАМК_А-рецепторов **DCUK-OEt** – производное аминохинолина. Механизм действия данного соединения был подтвержден радиолигандным методом, также производился поиск сайта связывания с помощью молекулярного моделирования. Авторами было отмечено, что наибольший антифобический эффект **DCUK-OEt** может быть вызван при взаимодействии соединения с рецепторами ГАМК, содержащими либо γ_2 -, либо δ -субъединицы вместе с α_1 - и β_3 -субъединицами; это комбинации субъединиц – $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ и $\alpha_1\beta_3\delta$. Для соединения **DCUK-OEt** не было выявлено взаимодействий с другими рецепторами, транспортерами и ионными каналами [51].

Akbar et al. (2017) были открыты свойства флавоноидов как позитивных модуляторов (ПАМ) ГАМК_А-рецепторов, к тому же лишенных побочных эффектов бензодиазепинов. По результатам радиолигандного исследования, молекулярный связующий сайт соединения 6-МеОГ (6-метоксифлаванон) отличается от других известных флавоноидных модуляторов ГАМК-рецепторов: он действует на ү-субъединицы, нечувствительные к антагонизму флумазенила, следовательно, 6-MeOF – перспективное анксиолитическое соединение. Авторы провели анализ химической формулы изучаемого соединения и пришли к заключению, что положение 6 ядра флавонов активно даже без какой-либо замены и придает этой группе анксиолитические свойства, тогда как само ядро считается неактивным в отношении анксиолизиса. Однако в недавних исследованиях установлено, что замена в положении 6 на флаваноновом ядре приводит к увеличению анксиолитических свойств этой группы. Активность вещества 6-MeOF изучали in vivo на моделях антифобического действия при внутрибрюшинном введении, исследуемое вещество вводили в дозах 10-100 мг/кг. Анксиолитический эффект был сопоставим с препаратом сравнения диазепамом (2 мг/кг) [52]. Биораспределение 6-МеОF оценивали в плазме, коре головного мозга и миндалевидном теле. Анализ фармакокинетического профиля показал, что 6-MeOF способно проникать через гематоэнцефалический барьер.

Guerrini et al. описаны новые производные бензотриазина (5b-12b), для которых была показана способность вытеснять [H³]-флумазенил из бензодиазепинового сайта связывания. Вещества были синтезированы из исходного соединения этилпиразоло[1,5-а]хиназолин-3-карбоксилата, показавшего значительное сродство с ГАМК_А. Было выяснено, что соединения аффинны к α2- и α_3 -субъединицам и действуют как α_2/α_3 -GABA_A-R-положительные аллостерические модуляторы. Химическую модификацию осуществляли либо введением метоксигруппы в положение 8, либо трансформацией этоксикарбонильной функциональной группы в арильную (гетеро) алкильную сложноэфирную группу. При изучении нейропсихотропных эффектов in vivo была показана наибольшая активность соединения (12b) среди изучаемых соединений. Данное вещество не вызывало нейротоксических эффектов и не изменяло моторику и координацию движений у исследуемых животных [53].

Описанное в работе Artelsmair et al. (2018) соединение **AZD7325**, производное *N*-пропилциннолина, — высокоаффинный селективный модулятор системы рецепторов GABA_A с дифференцированными связывающими и модулирующими свойствами, зависящими от конкретного подтипа GABA_A. Аффинность высока для GABA_A α_1 -, α_2 - и α_3 -субъединиц, но не для GABA_A α_5 -субъединицы, что ограничивает негативное влияние AZD7325 на когнитивные функции. AZD7325 потенцировало действие диазепама на α_2 - и α_3 -, но не на α_1 - и α_5 -субъединицы, ограничивая его седативный эффект. Соединение действует как полный антагонист золпидема на уровне α_1 -субъединицы, что согласуется с отсутствием седативного эффекта. AZD7325 также усиливал нативные ответы ГАМК в нейронах, полученных из префронтальной коры крыс, и продемонстрировал эффективность в ряде моделей тревожности *in vivo* [54, 55].

Изучаемое Nickolls et al. производное имидазопиридазина **PF-06372865** выступает ПАМ для GABA_A, проявляя селективность к α_2 - и α_3 -субъединицам, ассоциированным с анальгетическим и противотревожным действием, и к α_5 -субъединице, ответственной за функционирование памяти, однако не воздействует на α_1 -субъединицу, влияние на которую обусловливает седативный эффект [56].

Положительные аллостерические модуляторы (ПАМ) GABA_в-рецепторов. *ү*-Аминомасляная кислота (ГАМК), главный ингибирующий нейротрансмиттер, опосредует свое действие через различные рецепторные системы – ионотропные и метаботропные рецепторы GABA_{A/C} и GABA_B соответственно [57]. В то время как GABA_{A/C}-рецепторы образуют хлоридные каналы и быстро опосредуют синаптическое ингибирование, рецептор GABA_в ассоциирован с GPCR, впоследствии взаимодействующим с нуклеотидом гуанином, и, в зависимости от локализации, опосредует пресинаптическое или медленное постсинаптическое ингибирование посредством модуляции Ca²⁺- и K⁺-каналов [58]. Значительный прогресс в понимании физиологической роли GABA_в-рецептора и его места в патофизиологическом каскаде некоторых расстройств связан с открытием его агониста – баклофена (β-хлорфенил-ГАМК) [59]. Введенный в клиническую практику как миорелаксант центрального действия более четырех десятилетий назад, баклофен стал одним из основных лекарственных средств в терапии спастичности, хронического и изнурительного состояния, а также состояний, характеризующихся значительным увеличением тонуса и ригидности мышц, обычно наблюдаемых у пациентов с рассеянным склерозом или травмами спинного мозга. Однако баклофен характеризуется слабым проникновением через гематоэнцефалический барьер, коротким периодом действия и может вызывать различные побочные эффекты, включая седацию, головокружение, тошноту, мышечную слабость и умственную путаницу [60]. Эти ограничения исключают более широкое использование баклофена в коррекции множества других заболеваний, несмотря на его многообещающие эффекты в серии клинических исследований: препарат снижает симптомы тревоги у пациентов с ПТСР (посттравматическое стрессовое расстройство), паническими атаками и синдромом отмены алкоголя. ПАМ GABA_B – альтернатива прямым агонистам рецептора [61] и поэтому представляют собой перспективный терапевтический подход для лечения расстройств, к которым баклофен неприменим. В отличие от аллостерических агонистов, активирующих рецептор постоянно, действие ПАМ включает повышение активности рецепторов только в синапсах, где высвобождается ГАМК. ПАМ GABA_B-рецептора – многообещающая альтернатива прямых агонистов рецептора в качестве терапевтического подхода для лечения аддикции, хронической боли, тревоги и эпилепсии.

В статье Kalinichev et al. (2016) приведены данные по изучению транквилизирующей активности соединения **ADX71441**, производного триазина. Механизм действия вещества изучали с использованием клеток линии HEK293, авторы сделали заключение о связи **ADX71441** с позитивным аллостерическим модулированием GABA_Bрецепторов [62]. По результатам исследований, проведенных на противотревожных моделях (0.3–3.0 мг/кг, *per os*), соединение **ADX71441** – перспективно для лечения тревожных состояний и обсессивно-компульсивного расстройства. К тому же, в исследованиях миорелаксирующей активности было установлено, что вещество не вызывает расслабления мышц даже в дозе 10 мг/кг.

Porcu et al. (2016) исследовали аффинность связывания соединения SSD114 с ГАМК_Б-рецепторами на препаратах мозга крыс [63]. SSD114 производное пиримидина. Молекула содержит центральное плоское шестичленное кольцо с заместителями различной полярности. Как предполагают авторы, вторичные амины могут быть ответственны за связывание водорода с рецептором, тогда как плоская ароматическая система может взаимодействовать с гидрофобным фрагментом рецептора. По данным литературы, соединение SSD114 проявляло фармакологическую активность в отношении GABA_в ПАМ. Показано, что ГАМКергическое влияние изучаемого соединения полностью отменяется при использовании антагониста GABA_в-рецепторов CGP54626. Также авторами было отмечено, что SSD114 ведет себя как специфический и селективный рецептор GABA_в ПАМ *in vitro*. Увеличение концентрации SSD114 вызывало зависящее от концентрации потенцирование стимулирующих эффектов, индуцированных ГАМК (1-20 мкМ), со значениями ЕС₅₀ в низком диапазоне концентраций. Более того, SSD114 усиливал ответные реакции GABA_врецепторов в моделях in vivo с баклофеном. На основании результатов данного эксперимента установлено, что предварительная обработка самыми неэффективными дозами SSD114 синергически увеличивает седативный/гипнотический эффект субпороговой дозы баклофена. Все индуцированные баклофеном параметры – седация и гипнотическое состояние — были заметно усилены предварительной обработкой **SSD114**. На основании приведенных данных можно считать, что **SSD114** ведет себя как GABA_B ПАМ в анализе *in vivo*.

СЕЛЕКТИВНЫЙ ИНГИБИТОР ТРАНСПОРТЕРА ГАМК GAT₁

В настоящее время существует ряд стратегий, позволяющих увеличить ГАМКергическую активность, включающих прямой агонизм для ГАМКергических рецепторов, ингибирование ГАМК, катаболизм или его обратный захват из синаптической щели. На сегодняшний день обнаружено пять транспортных средств ГАМК (GAT), один из них – везикулярный транспортер ГАМК [64]. Другие четыре (GAT₁₋₄) – мембранные белки, принадлежащие семейству генов-носителей (SLC6A) Na⁺-независимых транспортеров [65]. В связи с их ключевой ролью в регуляции концентрации ГАМК в головном мозге. GAT (в частности, GAT₁) стали перспективной мишенью для создания новых лекарственных средств для лечения заболеваний ЦНС [66]. Тиагабин представляет производное изоникотиновой кислоты, выступающей высокоселективным ингибитором GAT₁ [67]. Этот препарат блокирует обратный нейрональный захват ГАМК, что приводит к увеличению концентрации этого нейромедиатора в синаптической щели, увеличивающего ток ионов хлора через клеточные мембраны. В настоящее время тиагабин реализуется как вспомогательное средство при лечении тревожных расстройств.

Salat et al. (2016) показали анксиолитический и антидепрессивный эффекты соединения **DDPM-2571** – производного 1,2,5,6-тетрагидропиридин-3-карбоновой кислоты. Показатели, полученные при исследовании вещества на животных моделях тревоги и депрессии в дозе 5 мг/кг, статистически достоверно превышали показатели препарата сравнения диазепама [68, 69].

КАТЕХОЛАМИНЕРГИЧЕСКАЯ И СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМЫ

Дофаминовые рецепторы. В стрессовых ситуациях происходит активация дофаминергической иннервации и снижение уровня дофамина в миндалине. Дофаминовые рецепторы относятся к родопсиноподобным аминергическим G-белковым рецепторам (GPCRs) и играют главенствующую роль в центральной нервной системе. Существует пять подтипов дофаминовых рецепторов, которые можно разделить на две группы: D_1 -подобные (D_1 и D_5) и D_2 -подобные (D_2 , D_3 и D_4) – в зависимости от активации или ингибирования вторичного мессенциклического аденозинмонофосфата джера, (цАМФ) [70]. Найдено множество литературных данных об анксиогенном эффекте лигандов дофаминовых рецепторов, в частности 2-го подтипа, либо об ослаблении ими проявлений тревоги [71].

Rice et al. (2018) изучали соединение YQA-14 [72], производное бензоксазола, новый селективный антагонист дофаминовых D₃-рецепторов. Вешество представляется перспективным в отношении терапии ПТСР. В методиках in vivo соединение изучали в дозах 3.12-12.5 мг/кг при внутрижелудочном введении. Исследователями была выбрана концепция выработки у животных длительного стресса (modified single prolonged stress) путем продолжительного совокупного применения нескольких поведенческих тестов ("приподнятый крестообразный лабиринт", "открытое поле", "принудительное плавание" по Porsolt). В результате полученных данных было выяснено, что соединение YQA-14 значительно снижает проявления тревожно-депрессивного характера у исследуемых животных.

Серотониновые рецепторы. Серотонинергическая система остается перспективной мишенью для создания новых анксиолитиков, поскольку 5-гидрокситриптамин играет важную роль в регуляции многих физиологических процессов, включая эмоции, циркадные ритмы и аппетит [73]. Существует семь семейств серотониновых рецепторов (5-НТ₁₋₇), реализующих различные фармакологические эффекты. Было выявлено, что анксиолитический эффект развивается при стимулировании 5-HT_{2B}- или блокировании 5-НТ_{2А}-, 5-НТ₃- и 5-НТ_{5А}-рецепторов. Среди 5-НТ-рецепторов подтип 5-НТ_{1А} оказывает более глубокое воздействие на контроль тревоги и депрессии, влияя на серотонинергическую нейротрансмиссию в нескольких областях мозга. В соответствии с широким терапевтическим потенциалом рецепторов 5-НТ_{1А} были разработаны различные препараты, наиболее известные из которых – азапироны – буспирон и тандоспирон, используемые для коррекции тревоги, обеспечивающие неселективную и неаддитивную терапевтическую альтернативу использованию бензодиазепинов.

Была показана роль 5-HT_{2C} в формировании тревожного поведения у грызунов [74]. Применение антагониста 5-HT_{2C} под шифром **SB242084** приводило к развитию анксиолитического эффекта в ряде поведенческих тестов [75]. Под действием соединения **S32212**, обратного агониста 5-HT_{2C}, зарегистрировано противотревожное действие в тесте конфликтной ситуации по Vogel [76].

5-НТ₃-рецепторы – пентамерные лиганд-ионные каналы, принадлежащие к суперсемейству СҮЅ-петлевых рецепторов. Ряд доклинических исследований показал, что антагонисты 5-НТ₃рецептора играют значительную роль в лечении психических расстройств, таких как депрессия и тревога [77, 78].

По литературным источникам [79, 80], активация рецепторов 5- HT_6 и/или 5- HT_7 может оказывать положительное влияние на эффективность и широту терапевтического спектра применяемых

в настоящее время антидепрессантов. Рецепторы 5- HT_6 и 5- HT_7 положительно связаны с цАМФ (система вторичных мессенджеров аденилатциклазы) и широко распространены в кортиколимбических областях (полосатом теле, коре, обонятельном бугорке, прилежащем ядре, в частности рецептор 5- HT_6 , гиппокампе, гипоталамусе и миндалине), участвующих в контроле настроения и эмоций.

В статье Brito et al. (2017) приводятся данные по изучению транквилизирующей активности соединения LQFM180, производного пиперазина. В настоящее время для этого соединения показан полимодальный тип действия с анксиолитической и антидепрессивной активностями. Химическая структура LQFM180 содержит базовую часть производных пиперазина с центральной фармакологической активностью и бутилированный гидрокситолуол – соединение с выраженными антиоксидантными свойствами. Рациональность введения данного радикала обусловлена когнитивными нарушениями, связанными с окислительным стрессом. Авторами статьи была доказана вовлеченность серотонинергической системы в реализацию анксиолитического эффекта субстанции при использовании фармакологических антагонистов - NAN-190 и PCPA. Таким образом, анксиолитическая активность LQFM180 развивается в том числе по серотонинергическому пути. Эксперименты in vivo проводили на антифобических моделях, животным каждой группы вводили изучаемое вещество перорально в дозах 9.4-75.2 мг/кг. Показатели группы соединения LQFM180 превышали данные группы препарата сравнения диазепама (5 мг/кг) в проведенных методиках (тест "приподнятый крестообразный лабиринт", тест пассивного избегания со скополамином). Исследование антидепрессивной активности продолжили с использованием адреноблокаторов празозина и пропранолола, дофаминоблокаторов галоперидола и сульпирида, а также РСРА и АМРТ для изучения моноаминов. Таким образом, антидепрессивная активность соединения LQFM180 включает серотонинергический, дофаминергический и норадренергический пути [81].

В статье Руtka et al. (2018) изложены результаты исследования производного 2-метоксифенилпиперазина под шифром **HBK-17**, для которого показана высокая аффинность к 5-HT_{1A}- и 5-HT₇-рецепторам. Противотревожная активность изучена на моделях "четыре пластины" и "приподнятый крестообразный лабиринт". Отмечено преимущественное влияние соединения на β-аррестиновый путь после связывания с 5-HT_{1A} [82].

В статье Kondej et al. (2016) приводятся данные о новом производном хинолинона – соединении **D2AAK1**. Арилпиперазины и, в меньшей степени, арилпиперидины и арилтетрагидропиридины были зарегистрированы как привилегированные структуры для аминергических рецепторов, сопряженных с G-белком, в частности серотонинового и дофаминового. Кроме того, арилтетрагидропиридины известны как лиганды других мишеней, например, σ -рецепторов, а также рецепторов, активированных пролифераторами пероксисом (PPAR, принадлежащие к семейству ядерных рецепторов), агонистов с антидиабетической активностью и МАО-В. Для соединения D2AAK1 показан политаргетный механизм действия: D₁-, D₃-, 5-НТ_{1А}- и 5-НТ_{2А}-рецепторный, обусловливающий антипсихотический и анксиолитический эффекты. Изучение антифобической активности *in vivo* проводили в дозе 100 мг/кг внутрибрюшинно, соединение достоверно повышало уровень противотревожной активности [83]. Результаты исследований D2AAK1 на животных показывают также, что для этого соединения характерны антипсихотические свойства, поскольку оно снижает гиперактивность, вызванную амфетамином в модели на мышах, представляющей классический тест для потенциальных нейролептиков. Более того, соединение D2AAK1 проявляло анксиолитические свойства, характерные для антипсихотиков второго поколения, таких как рисперидон и зипразидон.

Рагтука et al. (2019) описано соединение **ADN-1184** — производное арилсульфаниламида с $5\text{-HT}_{6/5}\text{-HT}_{7/5}\text{-HT}_{2A}/D_2$ -рецепторной активностями [84]. В исследованиях *in vivo* авторами было доказано, что соединение в дозе 0.3 мг/кг проявляет статистически значимую анксиолитическую и антидепрессивную активности. Через 1 ч после введения вещества производили измерение уровня серотонина и его метаболитов во фронтальной коре методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Изучаемое вещество не оказывало влияния на метаболизм серотонина во фронтальной коре.

Łażewska et al. (2018) изучали производное пиримидина AVN-492. В результате исследования 69 мишеней, включающих рецепторы, ионные каналы, транспортеры нейромедиатиров и ферменты, был сделан вывод о вовлечении 5-НТ₆-рецепторов в реализацию противотревожного эффекта. Исследование зависимости структуры и активности совместно с молекулярным анализом подтвердило преимущественное взаимодействие с 5-НТ₇ для стерически обремененных заместителей в положении 2 арилоксильного фрагмента (изопропил, *трет*-бутил, циклопентил и фенил). Кроме того, замена пиперидинового фрагмента на 8-азабициклооктан (тропан) приводила к активации 5-НТ₇-лигандов и повышению селективности к рецепторам 5-НТ_{1А}. Наконец, авторами была подтверждена большая предпочтительность для взаимодействия с сульфонамидной группировкой 5-НТ₇-рецептора, нежели для амидных и мочевинных остатков. Нейропсихотропную активность соединения изучали in vivo после внутрижелудочного введения AVN-492 в дозах 0.05 и 0.2 мг/кг на анксиолитических и антидепрессивных моделях [85]. В результате исследования были установлены статистически значимые нейропсихотропные эффекты в дозах, меньших или сопоставимых с циталопрамом и диазепамом, использованных в качестве препаратов сравнения.

Группой исследователей Słoczyńska et al. (2018) открыто производное бензенсульфонамида **PZ-1150** с 5-HT₇-антагонистическими свойствами, проявляющее антидепрессивный и анксиолитический эффекты [86].

Соединение **F15599** впервые было описано Assié et al. (2010) в качестве агониста серотониновых рецепторов с наибольшей аффинностью к 5-HT_{1A}-подтипу [87]. Данному производному пиперидина свойственна антидепрессивная активность. Еще одно производное пиперидина, описанное Jastrzbska-Wiesek et al., — соединение **F13714**. Эксперименты *in vivo* проводили на анксиолитических и антидепрессивных моделях [88], и был отмечен анксиолитический потенциал изучаемого соединения.

В исследовании Azevedo et al. (2019) установлена анксиолитическая активность соединения АСН-000029, производного хиназолина, селективного агониста 5-HT_{1A}-, 5-HT_{1D}-рецепторов и антагониста 5-HT_{2A}-серотониновых, а также α_{1A} -, α_{1B} - и α_{1D} -адренергических рецепторов, с хорошей селективностью к другим GPCR. Продемонстрирована высокая степень проникновения соединения через ГЭБ. Анксиолитический эффект наблюдали в моделях "закапывание шариков" и "темная/светлая камера" в диапазонах доз 8–32 и 16-30 мг/кг. Антифобическая активность была сопоставима с наблюдаемой для ингибиторов обратного захвата серотонина (пароксетин и флуоксетин) и бензодиазепинов (алпразолам, диазепам и клобазам). На основании анализа экспрессии с-Fos в головном мозге после перорального введения АСН-000029 установлено, что эффект соединения тесно связан с областями обработки сигналов окружающей среды и тревожного поведения: миндалиной, паравентрикулярным ядром таламуса, паллидумом, ядром ложа терминальной полоски и голубым пятном. При исследовании безопасности ACH-000029 in vivo в функциональной наблюдательной батарее (functional observational battery) до 50 мг/кг и в абстинентном тесте до 30 мг/кг дважды в день в течение 20 дней отклонений обнаружено не было [89].

В исследовании Ferreira et al. (2020) показан антагонизм соединения **РААРМNВА** (производного фенилпропенона) с серотониновыми рецепторами 5-HT₁, 5-HT_{2A/2C} и 5-HT_{3A/3B}. Соединение вводили взрослым особям *Danio rerio* в дозах 4, 12 и 40 мг/кг внутрибрюшинно, и его анксиолитическая активность была выявлена в тестах "открытое поле" и "темная/светлая камера". Соединение малотоксично, а также уменьшает локомоцию *D. rerio in vivo* [90]. Группой ученых под руководством Faye (2020) исследован агонист 5- HT_4 -подтипа серотониновых рецепторов под шифром **RS67333**, производное пиперидина. Его противотревожная активность выявлена в ряде тестов *in vivo* в сравнении с диазепамом. Соединение вводили внутрибрюшинно в дозе 1.5 мг/кг либо под медиальную префронтальную кору мышей в дозе 0.5 мг. Установлено, что активация 5- HT_4 на терминалях аксонов медиальной префронтальной коры, связанных с дорсальными ядрами шва, обусловливает развитие быстрого анксиолитического действия [91].

Kurczab et al. (2018) установлены плейотропные эффекты агонистов 5-НТ₆-серотониновых рецепторов, соединений (18) и (26), производных арилгидантоин-1,3,5-триазина – анксиолитический, антидепрессивный, метаболический. Также авторами были отмечены и другие активности для изучаемых субстанший помимо серотонинергической. Соединения, содержащие галогеновые заместители (9, 10, 16, 17, 23, 24, 30), были определены как наиболее активные против фермента MAO-A (IC₅₀ = 6.25-37.24 мкM). В результате изучения веществ на моделях in vivo было установлен пик нейротропного действия соединения (26) в дозе 3 мг/кг [92]. Интерес исследователей вызвали соединения (9), (10) и (17), проявляющие умеренную анксиолитическую активность.

Аффинность соединения **MF-8**, производного метилгидантоина, изучалась Kucwaj-Brysz et al. (2018) [93] *in vitro* на клеточной линии HEK293, экспрессирующей 5-HT_{1A}-, 5-HT_{7B}- и D_{2L}-рецепторы. Наибольшее связывание наблюдалось с 5-HT₇-рецепторами. Результаты исследований молекулярного моделирования совместно с кристаллографическим анализом обеспечили более глубокое понимание лиганд-рецепторного взаимодействия. Молекулярно-динамическое моделирование подтвердило стабильность комплекса белок—лиганд. Авторы пришли к выводу о влиянии гидантоиновой части молекулы на проявление ее нейропсихотропных эффектов [94].

Ran et al. (2018) изучали производное пиперидина — **YL-0919**, частичного агониста 5-HT_{1A}-серотониновых рецепторов и селективного ингибитора обратного захвата серотонина [95]. Экспериментальную часть исследований проводили на животных моделях тревоги и депрессии. Получены перспективные данные для дальнейшего изучения нейропсихотропного профиля вещества. Кроме того, на крысах был проведен дендритный анализ, и было установлено увеличение под действием соединения YL-0919 образования дендритов по длине и числу в области гиппокампа. Таким образом, соединение YL-0919 характеризуется терапевтическим потенциалом в отношении поведенческих расстройств, связанных с морфологической деструкцией дендритного волокна.

Bhatt et al. (2016) было описано производное хиноксалина (**6n**) в качестве потенциального ан-

тагониста 5-НТ₃-рецепторов [96]. Исследования проводили *in vivo* на большом количестве нейропсихотропных тестов *per os* в объеме 5 мл/кг в течение 14 дней. Соединение проявляло умеренную активность, сопоставимую с препаратом сравнения пароксетином.

Spasov et al. (2016) описали влияние производных имидазобензимидазола на 2А-подтип серотониновых рецепторов. Для наиболее активного соединения **RU-476** с помощью радиолигандного метода определяли способность связываться с 5-HT_{2A}-рецепторами [97, 98]. Авторами было показано наличие нейропсихотропной активности у производного бензимидазола **RU-476** *in vivo* при однократном и хроническом введении на животных поведенческих моделях. Изучаемое соединение в дозе 0.5 мг/кг статистически значимо проявляло анксиолитическую активность [99].

ИНГИБИТОРЫ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ (ИМАО)

Моноаминоксидаза (МАО) представляет собой FAD-зависимую аминоксидазу, расположенную на наружной мембране митохондрий головного мозга, печени, слизистой оболочки кишечника и некоторых других органов и тканей, катализирующую окислительное дезаминирование биогенных аминов в альдегиды с радикальными и полярными нуклеофильными механизмами и выполняющую существенную физиологическую роль в центральной нервной системе и периферических органах. Существуют два изомера, МАО-А и МАО-В, которые кодируются различными генами и отличаются чувствительностью к избирательным ингибиторам [100]. МАО-А предпочтительно катализирует окисление серотонина, норэпинефрина, тирамина и дофамина. Она играет важную роль в психических расстройствах, таких как биполярная депрессия и атипичное поведение с повышенным стрессом [101], в то время как МАО-В селективно катализирует окисление фенилэтиламина и бензиламина, участвует в нейродегенеративных процессах [102]. Надлежащее функционирование синаптических нейропередач обусловлено быстрым разрушением биогенных аминов, имеющих критически важное значение для регулирования эмоционального поведения и других функций мозга. Нежелательное повышение в плазме концентрации МАО-субстратов и продуктов реакций может вызывать серьезные проблемы психического здоровья [103]. В настоящее время существует большое количество препаратов-ингибиторов моноаминоксидазы, среди которых выделяют неселективные (прониазид, ниаламид, фенелзин, применяемые при различных панических и депрессивных состояниях, но гепатотоксичные) и селективные (обратимые ингибиторы МАО-А – моклобемид, пирлиндол, метралиндол, применяемые при терапии депрессивных и фобических расстройств, и необратимые ингибиторы МАО-В — селегилин и разагилин, в основном применяемые в качестве противопаркинсонических средств, но, согласно ряду литературных источников, снижающие и различные тревожно-фобические состояния [104]).

Кос et al. (2014) изучили 28 новых производных пиразола, среди которых наиболее активными оказались соединения (9), (10) и (17). Активность в отношении моноаминоксидаз показана с помощью молекулярного докинга. Были проведены биохимические исследования по определению ингибирующей активности МАО-А и МАО-В для синтезированных соединений с использованием изоформ МАО печени крыс. Установлено, что соединения в основном селективно ингибируют фермент МАО-А, среди них соединение (9) – наиболее активно ($IC_{50} = 6.25$ мкМ). Отмечено, что наличие атома галогена (Cl и Br) на фенильном кольце обусловливает лучшую ингибирующую активность МАО-А. Тем не менее, ингибирующее свойство бромидзамещенных соединений было заметно ниже. чем v хлорзамешенных. к тому же для соединений с тиокарбамоильными заместителями также происходило снижение ингибирования активности МАО-А. Авторами была показана умеренная анксиолитическая и антидепрессивная активность соединений (9), (10) и (17) в тестах in vivo при интраперитонеальном введении в дозе 100 мг/кг [105].

Соединения **РFC-1–РFC-16** – производные пиразолина, изучаемые Upadhyay et al. [106]. Соединения PFC-3 и PFC-12 были выбраны как наиболее активные среди всех синтезированных производных. Анализ химической структуры веществ показал, что замещение хлорбензолсульфонилом в положении N1 благоприятно влияет на выраженность анксиолитического и антидепрессивного действия, замещение 2-гидроксифенилом в 3-й позиции и 4-бензилоксифенилом в 5-м положении пиразолинового ядра играет важную роль в развитии антидепрессивного эффекта соединения PFC-3, а присоединение гидрофобного радикала антрацен-9-ил в третьей позиции и замещение метилфенилом в 5-м положении увеличило анксиолитическую активность соединения PFC-12. Вещества демонстрировали значительную противотревожную и антидепрессивную активность на различных поведенческих моделях in vivo. Результаты дозозависимых фармакологических исследований продемонстрировали, что синтезированные производные 1,3,5-тризамещенные-2-пиразолины имеют широкий диапазон анксиолитической и антидепрессивной активности.

ИНГИБИТОРЫ ТРАНСЛОКАТОРНОГО ПРОТЕИНА ТЅРО

Транслокаторный белок (18 кДа) (TSPO), ранее называемый периферическим бензодиазепи-

новым рецептором (PBR), в последние годы активно изучается в патофизиологии ПТСР, поскольку отличается нейростероидным эффектом, утверждая гипотезу о том, что для селективных лигандов TSPO свойственен потенциал в лечении ПТСР-расстройств. Транслокаторный белок располагается между наружной и внутренней митохондриальными мембранами. Функция данного белка связана с переносом холестерола и участием в стероидогенезе, в частности в нейростероидогенезе. Есть данные, подтверждающие связь экспрессии TSPO и психических расстройств [16]. Стероидные гормоны модулируют экспрессию TSPO и активность их в нейронах. При невропатологических состояниях (инсульт, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, множественный склероз, боковой амиотрофический склероз), травмах и воспалении экспрессия TSPO усилена в реактивной микроглие и астроцитах, поэтому лиганды TSPO обычно рассматривают как чувствительные биомаркеры визуализации головного мозга для какого-либо нейроочага поражения. Лиганды TSPO характеризуются анксиолитическим и антилепрессивным эффектом без очевидных побочных действий обычных бензодиазепинов. К представителям данного класса относятся бензодиазепиновые соединения, например, Ro5-4864 (4-хлородиазепам), применяемый для лечения психоподобных нарушений, эффективный также в отношении патологий. связанных с миелиновой дегенерацией. Другой лекарственный препарат из группы ингибиторов транслокаторного протеина TSPO – эмапунил, производное оксопурина. Благодаря эффективному стимулированию производства нейростероидов, таких как прегненолон, эмапунил выступает быстродействующим анксиолитическим препаратом с менее серьезными побочными эффектами, чем бензодиазепины [17].

Li et al. изучали соединение **ZBD-2** – производное пурина, лиганд для транслокаторного протеина, с присущими анксиолитической, антидепрессивной и анальгизирующей активностями. Также для субстанции было показано нейропротективное действие. Эксперименты *in vivo* проводили на доклинических нейропсихотропных моделях в дозах 0.75–3.0 мг/кг при пероральном введении. Соединение позиционируется как препарат для лечения послеродовой депрессии женщин [107].

В ранее проведенных Zhang et al. исследованиях с антагонистом PK11195 была отмечена высокая аффинность к транслокаторному белку соединения **YL-IPA08**, производного пиридина [108]. Для соединения показано относительно высокое сродство к TSPO (IC₅₀ = 0.23 нМ). Было обнаружено, что для **YL-IPA08** характерны заметные антидепрессивные и анксиолитические эффекты на нескольких животных моделях при хроническом введении в дозах 3–6 мг/кг, но не вызывает побочных эффектов, обычно связанных с классическими бензодиазепинами, таких как миорелаксация и когнитивные расстройства. Авторы позиционируют соединение как перспективное средство в терапии ПТСР [109].

В НИИ фармакологии им. В.В. Закусова в 2018 г. изучено производное пирроло[1,2-*a*]пиразина под шифром **GML-1**, лиганда TSPO с анксиолитическим действием, показанным в тесте "приподнятый крестообразный лабиринт" на крысах в дозе 1 мг/кг. Установлено, что величина анксиолитического эффекта **GML-1** не коррелирует с его концентрацией в плазме крови [110, 111].

ГЛУТАМАТНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

Глутаминовая кислота – нейромедиаторная аминокислота, одна из важных представителей класса "возбуждающих аминокислот" [112]. Связывание глутамата со спенифическими ренепторами нейронов приводит к возбуждению последних. Для нормального функционирования необходимо правильное соотношение активностей тормозящей ГАМКергической и возбуждающей глутаматергической систем. Гиперактивация глутаматергической системы может приводить к тревожным расстройствам, поэтому остается актуальным поиск новых веществ, влияющих на ионотропные и метаботропные глутаматные рецепторы. Отрицательные аллостерические модуляторы (ОАМ) метаботропного глутаматного рецептора 5 (mGlu R_5) выступают кандидатами в лекарственные средства лля лечения ряда психических заболеваний, включая тревогу и депрессию [113]. Метаботропные глутаматные рецепторы (mGluRs) составляют класс С рецепторов, связанных с G-белком (GPCR), и выполняключевую роль в глутаматергической ЮТ сигнализации. Этот класс (GPCRs) состоит из трех подклассов, включая группы I (mGluR₁ и mGluR₅), II (mGluR₂ и mGluR₃) и III (mGluR₄, mGluR₆, mGluR₇ и mGluR₈) [114]. Группа I mGluRs соединена с Gq и расположена главным образом постсинаптически, их активация увеличивает NMDA-рецепторную активность и возбудимость нейронов. Ингибирование mGlu R_5 , в основном экспрессирующегося в полосатом теле. гиппокампе, амиглале и лобной коре головного мозга, - перспективный метод лечения ряда психических заболеваний. в том числе тревожных и депрессивных расстройств [115]. В связи с косвенным усилением активности NMDA, активаторы mGluR₅ могут быть эффективными при психических расстройствах, фобиях, наркомании, шизофрении и когнитивных нарушениях. Поскольку сайт ортостерического глутамата - высококонсервативный для всех mGluRs, большинство программ обнаружения направлено на аллостерические модуляторы, которые селективны не только между подклассами, но и внутри подклассов [116]. Для mGluR выделяют хемотипы отрицательных и положительных аллостерических модуляторов (ОАМ и ПАМ). Ранее изученные ОАМ mGluR₅ представляют собой с химической точки зрения стержнеобразные соединения, в которых концевые кольца обычно соединялись ацетиленовой группой.

В работе Galambos et al. описан пошаговый синтез группы производных 4-фенил-3-арилсульфохинолинов, основными этапами которого стали стабилизация и оптимизация хинолиновых ялер путем ввеления фторированных и хлорпроизводных заместителей в положение 1 и метоксигрупп в положениях 3 и 4. Авторы приводят расчеты докинга, показавшие, что вещество-лидер – соединение (25) — отличается высоким сродством к аллостерическому сайту связывания нативных рецепторов (крысы и человека), а также рекомбинантных рецепторов человека mGluR₅ и проявляет более чем 50-кратную селективность по сравнению с нативными рецепторами mGluR₁. В анксиолитических моделях in vivo соединение (25) было исследовано в диапазоне доз 0.5-10.0 мг/кг при пероральном способе введения. Показано, что соединение (25) обладает антифобическим лействием лаже в высоких концентрациях и не оказывает побочных эффектов. Также противотревожная активность соединения (25) была продемонстрирована в тесте ультразвуковой вокализации и контекстуальном тесте страха (fear conditioning). В тесте ультразвуковой вокализации соединение (25) значительно и дозозависимо снижало ультразвуковую вокализацию, а в контекстуальном тесте страха – значительно и дозозависимо уменьшало число замираний исследуемых животных [117].

Reis et al. (2017) описано производное хинолина **4-PSQ**. Авторами делается предположение о вовлеченности глутаматергической системы в реализацию транквилизирующего эффекта, поскольку соединение 4-PSQ ингибирует захват [H³]-глутамата [118]. Кроме того, были проведены дополнительные исследования, подтверждающие вовлеченность глутамата в анксиолитический эффект вещества на каинатовой модели, оценена эффективность ингибирования соединением **4-PSQ** каинат-индуцированного тревожного поведения. Авторы сообщают о снижении проявления страха у исследуемых животных. Анксиолитическая активность in vivo была доказана на нескольких моделях в дозировках 5-50 мг/кг при пероральном введении.

ОПИОИДНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

К-, μ- и δ-опиоидные рецепторы, принадлежащие к подсемейству родопсинов семейства G-связанных рецепторов (GPCR), широко распространены во всей центральной и периферической нервной системе [20]. Помимо модуляции боли и зависимости, эти опиоидные рецепторы и их эндогенные опиоидные пептиды также вовлечены в регулирование эмоциональных состояний [119]. По результатам проведенных исследований с использованием агонистов δ-рецепторов показано, что активация δ-рецептора приводит к возникновению анксиолитического и антидепрессивного эффектов [120]. Роль µ-рецептора в генерации настроения. по ряду литературных источников неоднозначна, поскольку при фармакологической блокаде ц-рецептора наблюдается депрессивное поведение у грызунов, тогда как у мышей с µ-рецепторным нокаутом проявляются антидепрессивные и анксиолитические эффекты. Также к-рецептор и эндогенный лиганд динорфин участвуют в регуляции эмоций [121]. Было показано, что к-рецептор индуцирует анксиогенные, анксиолитические, депрессивные и антидепрессивные эффекты у разных животных в поведенческих моделях, тогда как антагонисты крецепторов оказывают последовательные анксиолитические и антидепрессивные эффекты [122]. К тому же, по некоторым данным, была пролемонстрирована перспективность комбинации к/µ-опиоидов для регулирования эмоций и лечения наркотической зависимости [123].

Wang et al. была изучена анксиолитическая и антидепрессивная активность соединения **АТРМ-ЕТ** – производного тиазола (3-*N*-этиламинотиазоло[5,4-b]-N-циклопропилметилморфинана гидрохлорид). Авторами была доказана анксиолитическая и антидепрессивная активность соединения ATPM-ET на моделях in vivo после подкожного введения субстанции в дозах 1 и 2 мг/кг. При совместном введении с к-антагонистом nor-BNI наблюдалось снижение анксиолитического эффекта вещества, что может свидетельствовать о к-рецепторном механизме действия [124]. Проведено исследование в тесте отвращения с бупренорфином, антагонистом к-и частичным агонистом μ-рецепторов, чтобы определить влияние АТРМ-ЕТ в эмоциональных реакциях. Показано, что АТРМ-ЕТ (2 мг/кг) не индуцирует негативных эмоций у мышей, соединение рассматривается как антагонист к-рецепторов и частичный агонист μ-опиоидных рецепторов.

В работе Yamada et al. было изучено соединение **KNT-127** — производное нафтоакридина. В результате исследования взаимодействия вещества с антагонистом d-опиоидного рецептора (DOP) налтриндола авторы сделали предположение об агонистическом действии **KNT-127** на DOP. В тестах *in vivo* вещество вводили мышам подкожно в диапазоне доз 1, 3 и 10 мг/кг. Авторами подчеркнуты выраженные анксиолитические свойства **KNT-127** в дозе 10 мг/кг, при этом эффекты изучаемого вещества были сходны с диазепамом, а побочных эффектов бензодиазепиновых анксиолитиков (седация, миорелаксация) не наблюдалось [125].

Серия производных 5'-4-алкил/арил-1*H*-1,2,3триазола с агонистическим µ-рецепторным профилем представлена в статье Montes et al. (2017). Эти соединения — продукты синтеза двух привилегированных структур - триазола, оказывающего общеседативное действие на ЦНС (снижение тревоги, депрессии и т.д.), и изатинового скаффолда, применяемого при нарушениях сна. По результатам тестов in vivo при введении мышам наиболее активного соединения PILAB 8 (25 мкМ/кг, интраперитонеально) наблюдался достоверный анксиолитический эффект, превышающий эффект препарата сравнения мидазолама. Также был изучен механизм действия PILAB 8 посредством совместного введения с неспецифическим антагонистом опиоидных рецепторов налоксоном в одном из тестов, а также с µ-антагонистом СТОР – в другом. Показано, что налоксон блокировал анксиолитический эффект изучаемого вещества, а СТОР снижал продолжительность сна (hypnosis following) [126].

ИНГИБИТОРЫ TRPC₄ И TRPC₅

Ионные каналы транзиторного рецепторного потенциала (transient receptor potential channels) в большом количестве присутствуют в головном мозге, особенно в коре и миндалине, где они регулируют передачу сенсорных сигналов. По ряду литературных источников, роль TRPC₄ и TRPC₅ связана с поведенческими изменениями и чувством страха [21, 127]. Стимуляция G_{аq}-G-белковых рецепторов (GPCRs) индуцирует TRPC₄ и TRPC₅ в гетерологичных экспрессионных системах, что считается физиологически значимым фактором для активации каналов, т.к. стимуляция G_{αα}-связанных GPCRs-рецепторов коррелирует с атипичным и тревожным поведением [128]. Комбинированным GPCR $G_{\alpha i / o}$ также свойственна способность к активации TRPC₄, возможно, даже более выраженная, чем у G_{аа} [129]. Таким образом, эти каналы выступают преобразователями еще более широкого спектра сигналов. К тому же, согласно данным литературы, делеция TRPC₄ или TRPC₅ снижает тревожное поведение у лабораторных животных.

Јизt et al. изучали производное пурина – HC-070 – ингибитор рекомбинантных гомомультимеров $TRPC_4$ и $TRPC_5$ в гетерологичных экспрессионных системах с наномолярной активностью, механизм действия которого был доказан электрофизиологическими и флуориметрическими методами. HC-070 ингибирует гетеромультимеры $TRPC_{1/5}$ и $TRPC_{1/4}$ с аналогичной эффективностью и уменьшает ответы, вызываемые тетрапептидом холецистокинина (ССК-4) в миндалине. По результатам исследований HC-070(1–3 мг/кг, *per os*) *in vivo* авторы делают заключение о снижении тревожного поведения без влияния на локомоторную активность в сравнении с диазепамом (1.5 мг/кг), а также о наличии антидепрессивной активности [21].

Yang et al. (2015) исследовали соединение **М084** – производное бензимидазола, потенци-

альный ингибитор TRPC_4 и TRPC_5 . В тестах *in vivo* (2–40 мг/кг, интраперитонеально) оно оказывало анксиолитический и антидепрессивный эффект, считается перспективным для дальнейшего изучения психотропной активности [128].

ГИСТАМИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, ИНГИБИТОРЫ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ IX, ИОННЫЕ КАНАЛЫ И НЕКОТОРЫЕ ДРУГИЕ МИШЕНИ

На сегодняшний день известно множество нейропсихотропных мишеней, воздействуя на которые агонистически или антагонистически, можно влиять на тревожно-фобическое состояние человека [9], однако с каждым годом исследуются и новые механизмы - потенциальные посредники коррекции эмоционального состояния человека. Например, с момента открытия центральных гистаминовых Н₃-рецепторов накапливается все больше доказательств, подтверждающих их роль в функционировании ЦНС, а именно в познании, эмоциональном статусе, при стрессе [24, 25, 129]. Гистаминовые рецепторы ЦНС вовлечены в патогенез тревожности и депрессии, в литературных источниках встречаются данные многочисленных исследований, указывающие на функциональную связь между тревожностью и гистаминергической нейромедиацией на классических анксиолитических моделях in vivo (Н₁-антагонист хлорфенамин снижал тревожность у крыс) [130]. В литературных данных содержится информация об анксиолитической активности соединений, опосредованной, например, ингибированием потенциал-зависимых натриевых каналов. Приведенные системы – далеко не полный перечень целевых мишеней в терапии тревожных расстройств.

Соединение **ST-1283**, изученное Sadek et al. – производное пиридина – рассматривается в качестве антагониста H_3 -гистаминового рецептора. В экспериментах *in vivo* авторами была доказана его анксиолитическая и антидепрессивная активность (7.5 мг/кг, интраперитонеально). Показано, что вещество не влияет на локомоторную активность исследуемых животных [131].

Разtore et al. (2017) изучали фармакологическую активность соединений *N*-пропил-2,2-дифенил-2-гидроксиацетамидов, среди которых было выбрано соединение (5), изученное на предмет нейропсихотропной активности. Посредством электрофизиологических и радиолигандных исследований было выяснено, что механизм анксиолитического действия соединения (5) не связан с ГАМК- или 5-НТ-рецепторами. Авторами была выдвинута гипотеза об ингибировании веществом потенциал-зависимых натриевых каналов. Для подтверждения своей теории авторы использовали культуру клеток НЕК293 с применением методики "patch-clamp". При изучении фармакологической активности *in vivo* при введе-

Таблица 1. Све,	дения о представленных в статье фарман	ологических соедин	ениях с анксиолит	ической активностью		
Название	Формула	Химическая группа	Активность	Мишень	Тесты	Ссылка
LQFM032	N N N N N N N N (1-Фенил-1 <i>H</i> -пиразол-4- ил)метил)пиперазин-1-ил)этан-1-ол	Производное пипера- зина	Анксиолигическая, когнитивная	Бензодиазепиновый фрагмент ГАМК _А - рецепторов	"Приподнятый крестообразный лаби- ринт", тест пассивного избегания со скопола- мином	[42]
Ъб	R ₂ R ₁ N-N R ₂ R ₁ N-N R ₃ R ₃ R ₁ N-N Oбшая формула производных веществ пира- золо[4,3-с]хинолин-3-онов (PQ)	Производные пиразо- лохинопина	Анксиолигическая	Бензодиазепиновый фрагмент ГАМК _А - рецепторов	Радиолигандный метод исследования	[44]
PITIV-135	СІ ^Н СІ ^Н Гидрохлорид В-фениллугаминовой кислогы	Производнос β-фе- нилглугаминовой кислоты	Анксиолитическая, антидепрессивная, нейропротекторная	Бензодиазепиновый фрагмент ГАМК _А - и ГАМК _Б - рецепторов	"Открытое поле", "темная/светлая камера", "подвешивание за хвост"	[45, 46]
DAB	R_1 R_1 R_1 R_1 R_1 R_2 R_1 R_1 R_1 R_2 2HCl R1-H-2,3,4,5-T етрагидродиа зепино[1,2- <i>a</i>]бенз-имидазола гидрохлориды	Производные диазе- пинобензимидазола	Анксиолитическая, антидепрессивная, когнитивная, анти- компульсивная	Бензодиазепиновый фрагмент ГАМК _А -рецепторов	"Приподнятый кре- стообразный лаби- ринт", "темная/ светлая камера", "принудительное взя- тие воды" по Vogel, "Принудительное пла- вание" по Porsolt, тест "закапывания шари- ков"	[36, 38, 47]

444

МАЛЬЦЕВ и др.

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 47 № 4 2021

	Таблица 1. Про	одолжение					
БИО	Название	Формула	Химическая группа	Активность	Мишень	Тесты	Ссылка
ОРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 47	DCUK-OEt	Н С С С 5,7-Дихлор-4-([дифенилкарбамо- ил]амино)хинолин-2-этилкарбоксилат)	Производное амино- хинолина	Анксиолитическая	Аллостерический молу- лятор ГАМК _А -рецеп- тора	Радиолигандный метод	[51]
№ 4 2021	6-MeOF	H ₃ CO 0 6-Метоксифлаванон	Синтетические фла- ваноиды	Анксиолитическая	Аллостерический молу- лятор ГАМК _А -рецеп- тора	"Приподнятый кре- стообразный лаби - ринт", "открытое поле"	[52]
	Соединения (5b—12b)	$R_8 \xrightarrow{N} R_3$ $(5a-5b), (12a-12c)$ $R_8 \xrightarrow{N} R_3$ $R_8 \xrightarrow{N} R_3$ $(8), (10)$ IIupa3010[1,5-a]XuHa3011HH1	Производные бензо- триазина	Анксиолитическая	Аллостерический молу- лятор ГАМК _А -рецеп- тора	"Темная/светлая камера"	[53]

ПОИСК АНКСИОЛИТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

445

Ссылка	[54, 55]	[56]	[62]
Tectbi	"Приподнятый кре- стообразный лаби- ринт"	Радиолигандный метод	"Приподнятый кре- стообразный лаби- ринт", тест "закапывания шари- ков"
Мишень	Аллостерический моду- лятор ГАМК _А -рецеп- тора	Аллостерический моду- лятор ГАМК _А -рецеп- тора	Положительный алло- стерический модулятор (ПАМ) ГАМК _Б -рецеп- торов
Активность	Анксиолитическая	Анксиолитическая, анальгетическая, когнитивная	Анксиолитическая
Химическая группа	Производное <i>N</i> -про- пилциннолина	Производное имида- зопиридазина	Производноє три- азина
Формула	NH2 O MeO F (4-Амино-8-(2-фтор-6-метоксифенил)- <i>N</i> - пропиллиннолин-3-карбоксиамид	F 0 S 0 N N N S 0 7-Этил-4-(4'-(этилсульфонил)-6-флуоро-2'- метоксибифенил-3-ил)-7 <i>H</i> -имидазо[4,5- с]ппридаян с]ппридаян	О С С С С С С С С С С С С С С С С С С С
Название	AZD7325	PF-06372865	ADV 100 100 100 100 100 100 100 100 100 10

446

Таблица 1. Продолжение

МАЛЬЦЕВ и др.

Ссылка	[63]	[68, 69]	[72]
Тесты	Потенцирующий эффект препарата в тесте <i>іп vivo</i> с баклофе- ном	"Приподнятый кре- стообразный лаби- ринт", "четыре пластины"	"Приподнятый кре- стообразный лаби- ринт", "открытое поле", "Принудитель- ное плавание" по Por- solt
Мишень	Положительный алло- стерический модулятор (ПАМ) ГАМК _Б -рецеп- торов	Селективный ингиби- тор транспортера ГАМК GAT ₁	Антагонист дофамино- вых D ₃ -рецепторов
Активность	Анксиолитическая	Анксиолитическая	Анксиолитическая, антидепрессивная
Химическая группа	Производное пири- мидина	Производное 1,2,5,6- тетрагидропиридин- 3-карбоновой кис- лоты	Производное бензок- сазола
Формула	ОСН3 НN N N CF3 Л-Циклогексил-4-метокси-6-(4-(трифторме- тил)фенил)пиримидин-2-амин	ОН N OH N OH N OH N O N O N O N O N O N O	НN – НN – НN – N – N – CI O – O – O – CI N-[4-[4-(5-Хлор-2-метилфенил)-1-пиперази- нил]бутил]-2,3-дигидро-2-оксо-5-бензокса- золкарбоксиамид
Название	ODEVHNITECK VA ZAWANA 21 21 21 21	1627-W400	YQA-14

Таблица 1. Продолжение

ПОИСК АНКСИОЛИТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

447

Ta6	лица 1. Пр. Название	одолжение Формула	Химическая группа	Активность	Мишень	Тесты	Ссылка
SB2	42084	СІ — NH O —	Производное пири- дина	Анксиолитическая	Антагонист 5-НТ ₂ С	"Приподнятый кре- стообразный лаби - ринт", стресс по Geller–Seifter	[75]
S32	212	N - I марбоксамия карбоксамия	Производное пири- дина	Анксиолитическая, антидепрессивная	Обратный агонист 5-НТ ₂ С	"Принудительное взя- тие воды" по Vogel, "принудительное пла- вание" по Porsolt	[76]
ğ	081ME	НО НО О О О О О О О О О О О О О О О О О	Производное пипера- зина	Анксиолитическая	Агонисты серотонино- вых 5-НТ _{IA} -рецепторов	"Приподнятый кре- стообразный лаби - ринт", "открытое поле", тест пассив- ного избегания со ско- поламином	[81]

448

МАЛЬЦЕВ и др.

Ссылка	[82]	[83]	[84]
Тесты	"Приподнятый кре- стообразный лаби- ринт", "четыре пластины"	"Приподнятый кре- стообразный лаби- ринт"	"Приподнятый кре- стообразный лаби- ринт", "принудительное взя- тие воды" по Vogel, тест "закапывания шариков", "четыре пластины"
Мишень	Агонисты 5-НТ _{IA} -, антагонисты 5-НТ ₇ - и D ₂ -рецепторов	Агонисты серотонино- вых 5-НТ ₁ А- и 5-НТ ₂ А- рецепторов, агонисты дофаминовых D ₁ - и D ₃ -рецепторов	Агонисты 5-НТ _{6/5} - НТ _{7/5} -НТ _{2A} /D ₂ -рецеп- торов
Активность	Анксиолитическая	Анксиолитическая	Анксиолитическая, антикомпульсив- ная, аналытетическая
Химическая группа	Производное пипера- зина	Производное хино- лина	Производное арил- сульфаниламида
Формула	H_3C	ли стана и ст	С
Название		Tow 47 No. 4 2021	ADN-1184

Таблица 1. Продолжение

ПОИСК АНКСИОЛИТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

449

IIpo,	цолжение Формула	Химическая группа	Активность	Мишень	Tecrы	Ссылка
3-Бен	О=S=0 N-N N-N N-N N-N N N Пиримилин-2,6-диамин	Производное пири- мидина	Анксиолигическая	Агонист серотониновых 5-НТ ₆ -рецепторов	"Приподнятый кре- стообразный лаби- ринт"	[85]
гл)ф	Н ₃ С СН ₃ NH N ³ C CH ₃ 0 0 0 4-Фтор- <i>N</i> -(1-{2-[(пропан-2- енокси]этил]-8-азабицикло[3.2.1]октан- 3-ил)-бензенсульфонамид	Производное бен- золсульфонамида	Анксиолитическая, аналыгетическая	Агонисты серотонино- вых 5-НТ ₇ -рецепторов	"Четыре пластины"	[86]
F13.	N H F S99: ((3-Хлор-4-фторфенил)-[4-фтор-4- [[(5-метилпиримидин-2-ил)метил- ино]метил]пиперидин-1-ил]метанон) N N H F N N H F N N H F S14: (3-Хлор-4-фторфенил-(4-фтор-4- (5-метил-6-метиламино-пиридин-2- етил)-амино]-метил]пиперидин-1-ил- метанон)	Производные пипе- ридина	Анксиолигическая	Агонисты серотонино- вых 5-НТ _{IA} -рецепторов	"Приподнятый кре- стообразный лаби- ринт", "принудительное взя- тие воды" по Vogel	[87, 88]

450

МАЛЬЦЕВ и др.

Ссылка	[68]	[06]	[16]
Тесты	Тест "закапывания шариков", "тем- ная/светлая камера"	"Открытое поле", "темная/светлая камера"	"Приподнятый кре- стообразный лаби- ринт"
Мишень	Агонист серотониновых 5-НТ _{IA} - и 5-НТ _{ID} - рецепторов, антагонист 5-НТ ₂ A-рецептора, анта- гонист α_{IA} , α_{IB} - и α_{ID} -адренергических рецепторов	Антагонист серогонино- вых 5-НТ ₁ -, 5-НТ ₂ A/2C ⁻ и 5-НТ _{3А/3} B-рецепторов	Агонист серотониновых 5-НТ ₄ -рецепторов
Активность	Анксиолитическая	Анксиолитическая	Анксиолитическая
Химическая группа	Производное хиназо- лина	Производное фенил- пропенона	Производное пипери- дина
Формула	3-(2-(4-(2-Метоксифенил)пиперазин-1- ил)этил)хиназолин-4(3 <i>H</i>)-он	О Н N-{4'[(2 <i>E</i>)-3-(3-Нитрофенил)-1- (фенил)проп-2-ен-1-он]}ацетамид	H ₂ N
Название	ACH-00029	PAAPMNBA	RS67333

Таблица 1. Продолжение

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 47 № 4 2021

ПОИСК АНКСИОЛИТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

451

Ссылка	[92]	[93, 94]	[95]
Тесты	"Принудительное взя- тие воды" по Vogel	"Принудительное пла- вание" по Porsolt, "четыре пластины"	"Приподнятый кре- стообразный лаби- ринт", "открытое поле", тест потребле- ния глюкозы, водный тест Морриса
Мишень	Агонисты серотонино- вых 5-НТ ₆ -рецепторов	Агонист серотониновых 5-НТ _{IA} -, 5-НТ ₇ в- и D _{2L} -рецепторов	Агонисты серотонино- вых 5-НТ _{IA} -рецепторов
Активность	Анксиолитическая, антидепрессивная, метаболическая	Анксиолитическая, анальгетическая	Анксиолитическая, антидепрессивная
Химическая группа	Производные арилги- дантоин-1,3,5-три- азина	Производное метил- гидантоина	Производное пипери- дина
Формула	$\begin{array}{c} H_{2}N \\ R \\ $	F HN N OH N N N N N N N N N N N N N N N N	О N I-(1-Бензил-4-гидроксипиперидин-4-ил- метил)-2(1 <i>H</i>)-пиридин гидрохлорид
Название	Соединения (18), (26)	ор И И РГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том	6160-1X 47 № 4 2021

Таблица 1. Продолжение

452

МАЛЬЦЕВ и др.
Ссылка	[96]	[66-76]	[105]
Тесты	"Приподнятый кре- стообразный лаби- ринт"	"Приподнятый кре- стообразный лаби- ринт", "принудительное взя- тие воды" по Vogel	"Приподнятый кре- стообразный лаби- ринт"
Мишень	Антагонисты серотони- новых 5-НТ ₃ -рецепто- ров	Агонист серотониновых 5-НТ ₂ А-рецепторов	Ингибиторы моноами- ноксидазы (ИМАО)
Активность	Анксиолитическая	Анксиолитическая	Анксиолигическая
Химическая группа	Производное хинок- салина	Производное имида- зобензимидазола	Производные пира- зола
Формула	о М- <i>п</i> -Пропил-3-этоксихиноксалин- 2-карбоксамил	$ \begin{array}{c} \overbrace{R_{1}}{P_{1}} & \overbrace{N}{R_{2}} \\ \overbrace{R_{1}}{P_{1}} & \overbrace{R_{1}}{P_{1}} \\ R_{1} = C_{2}H_{4}N(C_{2}H_{5})_{2} \\ R_{2} = C_{6}H_{4}OCH_{3} \\ R_{3} = H \\ 9-(2-Диэтиламиноэтил)-2-(4-метоксифе-нил)имидазо[1,2-\alpha]бензимидазол \\ нил)имидазо[1,2-\alpha]бензимидазол \\ \end{array} $	F Ar N-N N-N N-N N-N S NH-R S NH-R S NH-R S NH-R S C Norman C S NH-R S C Norman C Manua amua (10): 3-(4-Фторфенил)-5-(4-бромфенил)- N-Merun-4,5-дигидро-1 <i>H</i> -пиразол-1-карботио- М-метил-4,5-дигидро-1 <i>H</i> -пиразол-1-карбо- N-этил-4,5-дигидро-1 <i>H</i> -пиразол-1-карбо- N-этил-4,5-дигидро-1 <i>H</i> -пиразол-1-карбо-
Название	соединение (6n)	RU 47 No. 4 2021	Соединения (9), (10), (17)

Таблица 1. Продолжение

ПОИСК АНКСИОЛИТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

453

Ссылка	[106]	[107]
Тесты	"Приподнятый кре- стообразный лаби- ринт", "принудительное пла- вание" по Рогѕов, "подвешивание за хвост"	"Приподнятый кре- стообразный лаби- ринт", "принудительное пла- вание" по Porsolt
Мишень	Ингибиторы моноами- ноксидазы (ИМАО)	Ингибитор транслока- торного протеина TSPO
Активность	Анксиолитическая, антидепрессивная	Анксиолитическая, антидепрессивная, анальтетическая, нейропротективная
Химическая группа	Производные 1,3,5- тризамещенного 2-пиразолина	Производное пурина
Формула	PFC-3: 2-[5-(4-EeH3uIDxCn-deHuID)-1-(4-xIDP)-6eH3eH2DAH2D-1H-1-(4-xIDP)-6eH3eH2DAH2D-1H-1-(4-xIDP)-6eH3eH2DAH2D-1H-1-1-(4-xIDP)-6eH3eH2DAH2D-1H-1-1-(4-xIDP)-6eH3eH2DAH2D-1H-1-1-(4-xIDP)-6eH3eH2D-1D-1D-1-1-(4-xIDP)-6eH3eH2D-1D-1D-1D-1D-1D-1D-1D-1D-1D-1D-1D-1D-1D	остоль и польков и по М-Бензил- <i>N</i> -этил-2-(7,8-дигидро-7-бензил- 8-оксо-2-фенил-9 <i>H</i> -пурин-9-ил)ацетамид
Название	PFC-3 и 12	ZBD-2

454

Таблица 1. Продолжение

МАЛЬЦЕВ и др.

Название	Формула	Химическая группа	Активность	Мишень	Тесты	Ссылка
YL-IPA08	СІ / / / / / / / / / / / / / / / / / / /	Производное пири- мидина	Анксиолитическая	Ингибитор транслока- торного протеина TSPO	"Приподнятый кре- стообразный лабиринт", "принуди- тельное взятие воды" по Vogel	[108]
GML-1	№Бензил- <i>№</i> -метил-1-фенилтирроло[1,2- <i>а</i>]пиразин-3-карбоксиамид	Производное пир- роло[1,2- <i>а</i>]пиразина	Анксиолитическая	Ингибитор транслока- торного протеина TSPO	"Приподнятый кре- стообразный лаби- ринт"	[110, 111]
Соединение (25)	СІ Б А-Фенил-3-арил-сульфохинолин	Производное сульфо- хинолина	Анксиолитическая	Селективный негатив- ный аллостерический модулятор метаботроп- ного mGlu5-рецептора	Тест ультразвуковой вокализации, контек- стуальный тест страха	[117]
4-PSQ	СI СI 4-Фенилселенил-7-хлорохинолин	Производное хино- лина	Анксиолитическая	Ингибитор захвага глу- тамата	"Приподнятый кре- стообразный лаби - ринт", "открытое поле", "темная/свет- лая камера"	[118]

ПОИСК АНКСИОЛИТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

455

Таблица 1. Продолжение

	Ссылка	ікре- 1би- ос [124]	ікре- би-	ікре- би- [126]
	Тесты	"Приподнятый - стообразный ла голе", "открыт поле"	"Приподнятый стообразный ла ринт"	"Приподнятый стообразный ла
	Мишень	Антагонист к- и части ^и Ный агонист ц-опиоил ных рецепторов	Агонист d-опиоидногс рецептора	Агонист µ-опиоидногс рецептора
	Активность	Анксиолитическая	Анксиолитическая	Анксиолитическая
	Химическая группа	Производное цикло- пропилметилморфи- нана	Производное наф- тоакридина	Производные 5'-4- алкил/арил-1 <i>H</i> -1,2,3- триазола
одолжение	Формула	НN N HCI R I(-)-3-М-Этиламиногиазоло[5,4-b]- <i>М</i> -цик- лопропилметилморфинана гидрохлорид]	H ₃ C OH N ₂ C N N N N (6 <i>R</i> ,6aS,14a <i>R</i>)-17-метил-5,6,7,14-тетрагидро- 6a <i>H</i> -6,14а-(эпиминоэтано)нафто[2,1- <i>b</i>]акри- дин-2,6а-диол	H ₃ C /
Таблица 1. Про	Название	ATPM-ET	KNT-127	PILAB 8

456

МАЛЬЦЕВ и др.

Габлица 1. Пр Название	одолжение Формула	Химическая группа	Активность	Мишень	Tecrbi	Ссылка
070	НО N N N N N N N N N N N N N N N N N N N	Производноє пурина	Анксиолитическая	Ингибиторы ТRPC4 и TRPC5	"Приподнятый кре- стообразный лаби- ринт"	[21]
84	Р. Бутил-1 <i>H</i> -бензимидазол-2-амин	Производное бенз- имидазола	Анксиолитическая, антидепрессивная	Ингибитор TRPC4 и TRPC5	"Приподнятый кре- стообразный лаби- ринг", "принудительное пла- вание" по Porsolt	[128]
1283	N-N N N N N N N N N N N N N N N N N N N	Производное пири- дина	Анксиолигическая	Антагонист Н ₃ -гистами- нового рецептора	"Приподнятый кре- стообразный лаби- ринт"	[131]
линение (5)	ОНН ОНН О-Пропил-2,2-дифенил-2-гидроксиацетамил	Производное дифе- нила	Анксиолитическая	Ингибигор потенциал- зависимых натриевых каналов	"Приподнятый кре- стообразный лаби- ринт", "подвешивание за хвост"	[132]

ПОИСК АНКСИОЛИТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

457

Ссылка	[133]	- [134]	- [135]	- [135]
Тесты	"Приподнятый кре- сгообразный лаби- ринт", "принудительное пла- вание" по Porsolt	"Открытое поле", "приподнятый кресто- образный лабиринт", "питание в новой обстановке", "тем- ная/светлая камера"	"Открытое поле", "приподнятый кресто образный лабиринт"	"Открытое поле", "приподнятый кресто. образный лабиринт"
Мишень	Ингибитор фосфодиэс- теразы 9-го типа	Ингибитор связывания nNOS-CAPON	Не изучен	Предположительно σ-рецепторы
Активность	Анксиолитическая, антидепрессивная, когнитивная	Анксиолитическая	Анксиолитическая	Анксиолитическая
Химическая группа	Производное пири- мидина	Малая молекула, про- изводное валина	Производное 11 <i>Н-</i> [1, 3]диазепино[1,2- <i>a</i>]- бензимидазолов	Производное 2-мер- каптобензимидазола
Формула	$\begin{array}{c} H & H & H \\ & & & & \\ & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & $	Метиловый эфир <i>N</i> -(2-карбометоксиаце- тил)-D-валина	Гидробромид 4'-(2,3,4,5-тетрагидро-11 <i>H</i> - [1,3]диазепино[1,2-а]бензимидазол-11-илме- тил)бифенил-2-карбоновая кислота	Дигидохлорид 5-метил-2-[(2-мофолино)- этилгио]бензимидазола
Название	WYQ-C36D	Zlc-002	BIF-66	AZH-57

458

Таблица 1. Окончание

МАЛЬЦЕВ и др.

нии соединения (5) (10 мг/кг, интраперитонеально) было выявлено выраженное антифобическое и антидепрессивное действие без изменения локомоторной активности экспериментальных мышей [132].

В работе Huang et al. (2018) описан новый ингибитор фосфодиэстеразы 9-го типа, производное пиримидина **WYQ-C36D**, проявивший *in vivo* антидепрессивный, анксиолитический, позитивный мнестический эффекты в дозах 0.1, 0.5 и 1.0 мг/кг. На клеточной линии HT-22 соединение оказывало протективный эффект в условиях цитотоксичности, индуцированной кортикостероном [133].

Zhu et al. (2020) изучали влияние малой молекулы **Zlc-002** на связывание nNOS-CAPON. Ранее было показано, что при взаимодействии nNOS-CAPON в гиппокампе наблюдается анксиогенный эффект, в то время как ингибирование этого взаимодействия приводит к анксиолизису [134]. При внутрибрюшинном введении **Zlc-002** в дозах 40 и 80 мг/кг на протяжении 14 дней наблюдалось противотревожное действие соединения в условиях тестов "открытое поле", "приподнятый крестообразный лабиринт", "питание в новой обстановке" и "темная/светлая камера". Внутривенное введение вещества в течение 7 дней также приводило к развитию противотревожного эффекта, однако соединение оказалось неактивным при введении *per os* [134].

В работе Spasov et al. (2020) исследованы две группы бензимидазол-содержащих структур, а 11-бифенилметилзамещенные 11*Н*именно [1,3]диазепино[1,2-а]бензимидазолы под шифрами BIF, а также функционально-замещенные по алкильной группе 2-алкилтиобензимидазолы (AZH). Среди изученных соединений наиболее активными в анксиолитическом аспекте стали соединение BIF-66, содержащее карбоксильную группу в бифенильном фрагменте, и соединение АZH-57 с морфоэтильным радикалом в качестве S-заместителя. По результатам тестов in vivo "приподнятый крестообразный лабиринт" и "открытое поле" с препаратами сравнения – диазепамом (1 мг/кг) и афобазолом (5 мг/кг) – для соединений ряда BIF и AZH показана выраженная противотревожная активность. Хотя механизмы действия описанных веществ находятся в процессе исследования, можно предположить тропность соединений АΖН к σ-рецепторам на основании единства меркаптобензимидазольной структуры АZН и фабомотизола [135].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день существует широкий ряд мишеней, воздействие на которые способствует коррекции поведенческих нарушений тревожно-депрессивного генеза. Сохраняется интерес к изучению модуляторов основного тормозного механизма ЦНС, опосредованного ГАМК-рецептор-

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 47 № 4 2021

ным комплексом: для 12 из более чем 50 описанных соединений характерен ГАМКергический механизм действия. В то же время активно разрабатываются препараты серотонинового пути с полимодальным влиянием на широкий спектр подтипов 5-НТ-рецепторов – от 1А до 7, сочетающие серотониновый эффект с дофамин-, гистамин- и адренергическими эффектами. Стоит отметить тенденцию к расширению роли опиоидных рецепторов, ингибиторов TSPO, TRPC и MAO, а также антиглутаматергических соединений в фармакологической коррекции психоневрологических нарушений. Большое внимание уделяется синтезу полициклических структур и их последующей оптимизации, созданию новых препаратов на основе известных привилегированных структур, а также комбинированию химических скаффолдов. Отдельные направления современного поиска транквилизирующих средств посвящены малым молекулам.

Таким образом, пул новых анксиолитиков, находящихся на доклиническом этапе исследования, в настоящее время достаточно широк. Среди них можно выделить перспективные молекулы, представляющие научный интерес для дальнейшего изучения и разработки на их основе новых препаратов для лечения тревожных расстройств.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-015-00164).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Bandelow B., Michaelis S., Wedekind D. // Dialogues Clin. Neurosci. 2017. V. 19. P. 93–107. https://doi.org/10.31887/DCNS.2017.19.2/bbandelow
- 2. Незнанов Н.Г., Мартынихин И.А., Мосолов С.Н. // Современная терапия психических расстройств. 2017. С. 2–13.
 - https://doi.org/10.21265/PSYPH2017.41.6437
- 3. Вознесенская Т.Г. // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2013. № 2. С. 18–22.
- 4. Ладыженский М.Я., Городничев А.В., Костюкова Е.Г. // Современная терапия психических расстройств. 2014. № 2. С. 20–25.
- 5. Воронина Т.А., Середенин С.Б. // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2002. Т. 65. № 5. С. 4–17.

- Дробижев М.Ю., Федотова А.В., Кикта С.В. // Профилактическая медицина. 2013. Т. 16. № 4. С. 34–39.
- Murrough J.W., Yaqubi S., Sayed S., Charney D.S. // Expert Opin. Emerg. Drugs. 2015. V. 20. P. 393–406. https://doi.org/10.1517/14728214.2015.1049996
- Howland R.H. // J. Psychosoc. Nurs. Ment. Health. Serv. 2015. V. 53. P. 21–24. https://doi.org/10.3928/02793695-20151022-01
- Gribel G., Holmes A. // Nat. Rev. Drug. Discov. 2013. V. 12. P. 667–687.
- https://doi.org/10.1038/nrd4075
 10. Kim Y, Baik S.Y., Jin M.J., Choi K.H., Lee S.H. // Psychother. Psychosom. 2020. V. 24. P. 1–3. https://doi.org/10.1159/000506647
- Suarez G.L., Morales S., Metcalf K., Pérez-Edgar K.E. // Infant. Child. Dev. 2019. V. 28. P. e2130. https://doi.org/10.1002/icd.2130
- 12. Eysenck M.W., Fajkowska M. // Cogn. Emot. 2018. V. 32. P. 1391-1400.
 - https://doi.org/10.1080/02699931.2017.1330255
- 13. He Y., Ouyang J., Hu Z., Yang J., Chu Y., Huang S., Yang Y., Lui C. // Psychiatry Res. 2019. V. 271. P. 649– 657.
 - https://doi.org/10.1016/j.psychres.2018.12.025
- 14. Zhuang X., Xu H., Fang Z., Xu C., Xue C., Hong X. // Eur. J. Pharmacol. 2018. V. 834. P. 213–220. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.07.033
- Zarrindast M.R., Khakpai F. // Arch. Iran Med. 2015.
 V. 18. P. 591–603.
- Arbo B.D., Benetti F., Garcia-Segura L.M., Ribeiro M.F. // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2015. V. 154. P. 68–74. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.07.007
- Kim T., Pae A.N. // Expert Opin. Ther. Pat. 2016.
 V. 26. P. 1325–1351. https://doi.org/10.1080/13543776.2016.1230606
- Vakhitova Y.V., Kuzmina U.S., Voronin M.V., Zainullina L.F., Seredenin S.B. // Dokl. Biochem. Biophys. 2019. V. 488. P. 313–315. https://doi.org/10.1134/S1607672919050090
- 19. *Капица И.Г., Иванова Е.А, Воронина Т.А. //* Эксп. и клин. фарм. 2019. Т. 82. С. 3–7.
- Nazeri M., Nezhadi A., Shabani M. // Addict Health. 2019. V. 11. P. 216–222. https://doi.org/10.22122/ahj.v11i4.243
- Just S., Chenard B.L., Ceci A., Strassmaier T., Chong J.A., Blair N.T., Gallaschun R.J., Camino D. del, Cantin S., D'Amours M., Eickmeier C., Fanger C.M., Hecker C., Hessler D.P., Hengerer B., Kroker K.S., Malekiani S., Mihalek R., McLaughlin J., Rast G., Witek J.A., Sauer A., Pryce C.R., Moran M.M. // PLoS One. 2018. V. 13. P. e0191225.
- https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191225 22. *Wang Z.J., Heinbockel T. //* Molecules. 2018. V. 23. P. E1061.
- https://doi.org/10.3390/molecules23051061
 23. *Hill A.S., Ben-Shahar Y. //* Channels (Austin). 2018. V. 12. P. 262–275.
- https://doi.org/10.1080/19336950.2018.1495006
- Кудряшов Н.В., Набиева Г.В., Калинина Т.С., Миронов С.Е., Горбунов А.А., Воронина Т.А. // Эксп. и клин. фарм. 2019. Т. 82. С. 36–43. https://doi.org/10.30906/0869-2092-2019-82-10-36-43
- 25. Alachkar A., Khan N., Łażewska D., Kieć-Kononowicz K.,
- Sadek B. // Neuropsychiatr. Dis. Treat. 2019. V. 15. P. 531–542. https://doi.org/10.2147/NDT.S193125

- Jembrek M.J., Vlainic J. // Curr. Pharm. Des. 2015. V. 21. P. 4943–4959.
- https://doi.org/10.2174/1381612821666150914121624 27. *Olivier B.* // Eur. J. Pharmacol. 2015. V. 753. P. 2–18.
- https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.10.031
 28. Koç G.Ş., Tan O.U., Uçar G., Yildirim E., Erol K., Palaska E. // Drug Res. (Stuttg). 2014. V. 64. P. 591– 598.

https://doi.org/10.1055/s-0033-1363997

- McCracken L.M., Lowes D.C. Salling M.C., Carreau-Vollmer C., Odean N.N., Blednov Y.A., Betz H., Harris R.A., Harrison N.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 114. P. E7179–E7186. https://doi.org/10.1073/pnas.1703839114
- Kalscheuer V.M., Musante L., Fang C., Hoffmann K., Fuchs C., Carta E., Deas E., Venkateswarlu K., Menzel C., Ullmann R., Tommerup N., Dalprà L., Tzschach A., Selicorni A., Lüscher B., Ropers H.-H., Harvey K., Harvey R.J. // Hum. Mutat. 2009. V. 30. P. 61–68. https://doi.org/10.1002/humu.20814
- 31. *de Montigny C.* // Arch. Gen. Psychiatry. 1989. V. 46. P. 511–517.
 - https://doi.org/10.1001/archpsyc.1989.01810060031006
- 32. Griebel G., Holsboer F. // Nat. Rev. Drug. Discov. 2012. V. 11. P. 462–478. https://doi.org/10.1038/nrd3702
- Yamada K., Kobayashi M., Kanda T. // Int. Rev. Neurobiol. 2014. V. 119. P. 373–393. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801022-8.00015-5
- Wang Y., Zhang H., Li Y., Wang Z., Fan Q., Yu S., Lin Z., Xiao Z. // J. Affect. Disord. 2015. V. 186. P. 7–12. https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.07.023
- Davison E.K., Brimble M.A. // Curr. Opin. Chem. Biol. 2019. V. 52. P. 1–8. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.12.007
- Таран А.С., Мальцев Д.В., Яковлев Д.С., Караваева Т.А., Ткаченко Ю.О., Диваева Л.Н., Морковник А.С., Кузьменко Т.А. // Волг. науч.-мед. журн. 2017. Т. 53. С. 24–26.
- 37. Диваева Л.Н., Спасов А.А., Мальцев Д.В., Кузьменко Т.А., Морковник А.С., Яковлев Д.С., Таран А.С., Петров В.И., Анисимова В.А. // Патент RU2629022C1, 2017.
- Спасов А.А., Диваева Л.Н., Мальцев Д.В., Кузьменко Т.А., Морковник А.С., Мирошников М.В., Таран А.С., Золотова Е.А. // Вест. волг. гос. мед. ун-та. 2018. Т. 67. С. 19–23.
- 39. Петров В.И., Озеров А.А., Новиков М.С., Тюренков И.Н., Бугаева Л.И., Багметова В.В. // Совр. пробл. науки и обр. 2015. № 3. С. 13.
- Сажин В.А., Ковалев Г.В. // Эксп. и клин. фарм. 1993. Т. 56. № 2. С. 72–74.
- Trincavelli M.L., Da Pozzo E., Daniele S., Martini C. // Curr. Top. Med. Chem. 2012. V. 12. P. 254–269. https://doi.org/10.2174/1568026799078787
- 42. Brito A.F., Fajemiroye J.O., Neri H.F.S., Silva D.M., Silva D.P. B., Sanz G., Vaz B.G., de Carvalho F.S., Ghedini P.C., Lião L.M., Menegatti R., Costa E.A. // Chem. Biol. Drug Des. 2017. V. 90. P. 432–442. https://doi.org/10.1111/cbdd.12961
- 43. *Milenin V.V.* // Anesteziol. Reanimatol. 2010. V. 1. P. 23–25.
- 44. Rivilli M.J.L., Turina A.V., Bignante E.A., Molina V.H., Perillo M.A., Briñon M.C., Moyano E.L. // Bioorg. Med. Chem. 2018. V. 26. P. 3967–3974. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.06.021

- 45. Тюренков И.Н., Багметова В.В., Маркина Ю.В. // Эксп. и клин. фарм. 2017. Т. 80. № 2. С. 8–13. https://doi.org/10.30906/0869-2092-2017-80-2-8-13
- 46. Тюренков И.Н., Багметова В.В., Робертус А.И., Васильева Е.В., Ковалёв Г.И. // Нейрохимия. 2015. Т. 32. С. 140–152. https://doi.org/10.7868/S1027813315010136
- Maltsev D.V., Spasov A.A., Miroshnikov M.V., Skripka M.O., Divaeva L.N. // Res. Pharmacol. 2020. V. 6 (3). P. 9–14. https://doi.org/10.3897/rrpharmacology.6.55142
- 48. Olsen R.W. // Neuropharmacology. 2018. V. 136. P. 10–22.
- https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.01.036
 49. Sigel E., Ernst M. // Pharmacol. Sci. 2018. V. 39. P. 659–671.
 - https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.03.006
- 50. Семьянов А.В., Казанцев В.Б. // Нейрон-глиальное взаимодействие в мозге. Нижний Новгород: Изд-во Нижегород. гос. ун-та им. Н.И. Лобачевского, 2007. 107 с.
- Borghese C.M., Herman M., Snell L.D., Lawrence K.J., Lee H.-Y., Backos D.S., Vanderlinden L.A., Harris R.A., Roberto M., Hoffman P.L., Tabakoff B. // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 6230. https://doi.org/10.1038/s41598-017-05966-x
- 52. Akbar S., Subhan F., Karim N., Aman U., Ullah S., Shahid M., Ahmad N., Fawad K., Sewell R.D.E. // Eur. J. Pharm. 2017. V. 801. P. 19–27. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.02.047
- Guerrini G., Ciciani G., Crocetti L., Daniele S., Ghelardini C., Giovannoni M.P., Iacovone A., Mannelli L.D.C., Martini C., Vergelli C. // J. Med. Chem. 2017. V. 60. P. 9691–9702.
- https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01151 54. Artelsmair M., Gu C., Lewis R.J., Elmore C.S. // J. La-
- belled Comp. Radiopharm. 2018. V. 61. P. 415–426. https://doi.org/10.1002/jlcr.3602
- 55. Gu C., Artelsmair M., Elmore C.S., Lewis R.J., Davis P., Hall J.E., Dembofsky B.T., Christoph G., Smith M.A., Chapdelaine M., Sunzel M. // Drug Metab. Dispos. 2018. V. 46. P. 303–315. https://doi.org/10.1124/dmd.117.078873
- Nickolls S.A., Gurrell R., van Amerongen G., Kammonen J., Cao L., Brown A.R., Stead C., Mead A., Watson C., Hsu C., Owen R.M., Pike A., Fish R.L., Chen L., Qiu R., Morris E.D., Feng G., Whitlock M., Gorman D., van Gerven J., Reynolds D.S., Dua P., Butt R.P. // Br. J. Pharmacol. 2018. V. 175. P. 708–725. https://doi.org/10.1111/bph.14119
- Fritzius T., Bettler B. // Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 2019. V. 126. P. 25–34. https://doi.org/10.1111/bcpt.13241
- Frangaj A., Fan Q.R. // Neuropharmacology. 2018. V. 136. P. 68–79.
- https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.10.011
 59. Ghanavatian S., Derian A. // StatPearls. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519505/.
- Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020. *George K., Sadiq N.M.* // StatPearls [https://www.no
- George K., Sadiq N.M. // StatPearls [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545230/]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020.
 Denker K. K. Hasherman, C.H. Danker, P.L.
- Brown K.M., Roy K.K., Hockerman G.H., Doerksen R.J., Colby D.A. // J. Med. Chem. 2015. V. 58. P. 6336– 6347.
- https://doi.org/10.1021/jm5018913
- 62. Kalinichev M., Girard F., Haddouk H., Rouillier M., Riguet E., Royer-Urios I., Mutel V., Lütjens R., Poli S. //

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 47 № 4 2021

Neuropharmacology. 2016. V. 114. P. 34–47. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.11.016

63. Porcu A., Lobina C., Giunta D., Solinas M., Mugnaini C., Castelli M.P. // Eur. J. Pharm. 2016. V. 791. P. 115– 123.

https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.08.032

- 64. Soudijn W., van Wijngaarden I. // Curr. Med. Chem. 2000. V. 7. P. 1063–1079. https://doi.org/10.2174/0929867003374363
- Schousboe A., Madsen K.K. // Neurochem. Res. 2017. V. 42. P. 2019–2023. https://doi.org/10.1007/s11064-017-2188-x
- 66. *Fattorini G., Melone M., Conti F. //* Neurosci. 2020. V. 14. P. 9.

https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00009

- Bresnahan R., Martin-McGill K.J. // Cochrane Database Syst. Rev. 2019. V. 10. P. CD001908. https://doi.org/10.1002/14651858.CD001908.pub4
- Sałat K., Podkowa A., Malikowska N., Kern F., Pabel J., Wojcieszak E., Kulig K., Wanner K.T., Strach B., Wyska E. // Neuropharm. 2017. V. 113. P. 331–342. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.10.019
- 69. Hauke T.J., Höfner G., Wanner K.T. // ChemMed-Chem. 2019. V. 14. P. 583–593. https://doi.org/10.1002/cmdc.201800729
- 70. Незнанов Н.Г., Мартынихин И.А., Мосолов С.Н. // Совр. терапия психич. расстройств. 2017. № 2. С. 2–15.
- Сюняков Т.С., Сюняков С.А., Дорофеева О.А. // Психиатрия и психофармакотерапия. 2011. Т. 13. № 6. С. 9–16.
- 72. Rice O.V., Ashby C.R. Jr., Dixon C., Laurenzo W., Hayden J., Song R., Li J., Tiwari A.K., Gardner E.L. // Synapse. 2018. V. 72. P. e22035. https://doi.org/10.1002/syn.22035
- Zmudzka E., Sałaciak K., Sapa J., Pytka K. // Life Sci. 2018. V. 210. P. 106–124. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.08.050
- 74. Heisler L.K., Zhou L., Bajwa P., Hsu J., Tecott L.H. // Genes Brain Behav. 2007. V. 6. P. 491–496. https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2007.00316.x
- 75. *Martin J.R., Ballard T.M., Higgins G.A.* // Pharmacol. Biochem. Behav. 2002. V. 71. P. 615–625. https://doi.org/10.1016/s0091-3057(01)00713-4
- Dekeyne A., Brocco M., Loiseau F., Gobert A., Rivet J.-M., Di Cara B., Cremers T.I., Flik G., Fone K.C.F., Watson D.J.G., Papp M., Sharp T., Serres F., Cespuglio R., Olivier B., Chan J.S.W., Lavielle G., Millan M.J. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2012. V. 340. P. 765–780. https://doi.org/10.1124/jpet.111.187534
- 77. Kurhe Y., Radhakrishnan M., Thangaraj D., Gupta D. // Indian J. Pharmacol. 2014. V. 46. P. 100–104. https://doi.org/10.4103/0253-7613.125186
- Mahesh R., Dhar A.K., Jindal A., Bhatt S. // Can. J. Physiol. Pharmacol. 2013. V. 91. P. 848–854. https://doi.org/10.1139/cjpp-2013-0134
- Adriani W., Travaglini D., Lacivita E., Saso L., Leopoldo M., Laviola G. // Neuropharmacology. 2012. V. 62. P. 833–842.

https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.09.012

- Jastrzębska-Więsek M., Siwek A., Partyka A., Kubacka M., Mogilski S., Wasik A., Kołaczkowski M., Wesołowska A. // Neuropharmacology. 2014. V. 85. P. 253–262. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.05.036
- Brito A.F., Braga P.C.C.S., Moreira L. K.S., Silva D.M., Silva D.P.B., Sanz G., Vaz B.G., de Carvalho F.S., Lião L.M., Silva R.R., Noël F., Neri H.F. S., Ghedini P.C.,

de Carvalho M.F., Gil E.D.S., Costa E.A., Menegatti R. // Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 2018. V. 391. P. 255–269.

- https://doi.org/10.1007/s00210-017-1451-7
- Pytka K., Głuch-Lutwin M., Żmudzka E., Sałaciak K., Siwek A., Niemczyk K., Walczak M., Smolik M., Olczyk A., Gałuszka A., Śmieja J., Filipek B., Sapa J., Kołaczkowski M., Pańczyk K., Waszkielewicz A., Marona H. // Front. Pharmacol. 2018. V. 9. P. 1146. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01146
- Kondej M., Wróbel T.M., Silva A.G., Stępnicki P., Koszła O., Kędzierska E., Bartyzel A., Biała G., Matosiuk D., Loza M.I., Castro M., Kaczor A.A. // Eur. J. Med. Chem. 2019. V. 180. P. 673–689. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.07.050
- Partyka A., Jastrzębska-Więsek M., Antkiewicz-Michaluk L., Michaluk J., Wąsik A., Canale V., Zajdel P., Kołaczkowski M., Wesołowska A. // Behav. Brain Res. 2019. V. 359. P. 9–16. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.10.004
- Łażewska D., Kurczab R., Więcek M., Satała G., Kieć-Kononowicz K., Handzlik J. // Bioorg. Chem. 2019. V. 84. P. 319–325. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.11.046
- Słoczyńska K., Wójcik-Pszczoła K., Canale V., Żmudzki P., Zajdel P., Pekala E. // J. Biochem. Mol. Toxicol. 2018. V. 32. P. e22048. https://doi.org/10.1002/jbt.22048
- Assié M.-B., Bardin L., Auclair A.L., Carilla-Durand E., Depoortère R., Koek W., Kleven M.S., Colpaert F., Vacher B., Newman-Tancredi A. // Int. J. Neuropsychopharmacol. 2010. V. 13. P. 1285–1298. https://doi.org/10.1017/S1461145709991222
- Jastrzębska-Więsek M., Partyka A., Rychtyk J., Śniecikowska J., Kołaczkowski M., Wesołowska A., Varney M.A., Newman-Tancredi A. //ACS Chem. Neurosci. 2017. V. 9. P. 1040–1050. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.7b00443
- Azevedo H., Ferreira M., Costa R.W., Russo V., Russo E., Mascarello A., Guimarães C.R.W. // Prog. Neuropsyc. Biol. Psyc. 2019. V. 95. P. 109707. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.109707
- 90. *Ferreira M.K.A., da Silva A.W., Silva F.C.O.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2020. V. 526. P. 505– 511.
 - https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.129
- Faye C., Hen R., Guiard B.P. // Biol. Psychiatry. 2020. V. 87. P. 514–525. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.08.009
- 92. Kurczab R., Ali W., Łażewska D., Kotańska M., Jastrzębska-Więsek M., Satała ., Więcek M., Lubelska A., Latacz G., Partyka A., Starek M., Dąbrowska M., Wesołowska A., Jacob C., Kieć-Kononowicz K., Handzlik J. // Molecules. 2018. V. 23. P. 2529. https://doi.org/10.3390/molecules23102529
- 93. Kucwaj-Brysz K., Kurczab R., Jastrzębska-Więsek M., Żesławska E., Satała G., Nitek W., Partyka A., Siwek A., Jankowska A., Wesołowska A., Kieć-Kononowicz K., Handzlik J. // Eur. J. Med. Chem. 2018. V. 147. P. 102–114.

https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.093

94. Latacz G., Lubelska A., Jastrzębska-Więsek M., Partyka A., Kucwaj-Brysz K., Ann Wesołowska K., Kieć-Kononowicz K., Handzlik J. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2018. V. 28. P. 878–883. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.02.003

- 95. Ran Y., Hu X.-X., Wang Y.-L., Zhao N., Zhang L.-M., Liu H.-X., Li Y.-F. // Acta Pharm. Sinica. 2018. V. 39. P. 12–23. https://doi.org/10.1038/aps.2017.83
- 96. Bhatt S., Mahesh R., Jindal A., Devadoss T. // J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol. 2017. V. 28. P. 93–100. https://doi.org/10.1515/jbcpp-2016-0057
- Спасов А.А., Яковлев Д.С., Мальцев Д.В., Жуковская О.Н., Анисимова В.А., Ковалев Г.И., Зимин И.А., Морковина Я.В. // Биоорг. химия. 2016. Т. 42. С. 440–447. [Spasov А.А., Yakovlev D.S., Maltsev D.V., Zhukovskaya О.N., Anisimova V.A., Kovalev G.I., Zimin I.A., Morkovina Y.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2016. V. 42. Р. 397–403.] https://doi.org/10.1134/S1068162016040178
- 98. Яковлев Д.С., Спасов А.А., Мальцев Д.В., Васильев П.М., Анисимова В.А., Морковина Я.В. // Сб. трудов науч.практич. конференции профессорско-преподавательского коллектива, посвященной 80-летию Волгоград. гос. мед. ун-та, 2015. С. 54–56.
- 99. Maltsev D.V., Yakovlev D.S., Matokhin D.G., Samsonik Y.V., Spasov A.A., Anisimova V.A.// Eur. Neuropsychopharmacol. 2013. V. 23. P. 519–520. https://doi.org/10.1016/S0924-977X(13)70824-1
- 100. *Tipton K.F.* // J. Neural. Transm. (Vienna). 2018. V. 125. P. 1519–1551. https://doi.org/10.1007/s00702-018-1881-5
- 101. Schiele M.A., Thiel C., Deckert J., Zaudig M., Berberich G., Domschke K. // Int. J. Neuropsychopharmacol. 2020.
 V. 23. P. 319–323. https://doi.org/10.1093/ijnp/pyaa016
- 102. *Ramsay R.R.* // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2016. V. 69. P. 81–89. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2016.02.005
- 103. Fowler J.S., Logan J., Shumay E., Alia-Klein N., Wang G.J., Volkow N.D. // J. Labelled Comp. Radiopharm. 2015. V. 58. P. 51–64. https://doi.org/10.1002/jlcr.3247
- 104. Kasai S., Yoshihara T., Lopatina O., Ishihara K., Higashida H. // Front. Beh. Neurosci. 2017. V. 11. P. 75. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00075
- 105. Koç G.Ş., Tan O.U., Uçar G., Yıldırım E., Erol K., Palaska E. // Drug Res. 2014. V. 64. P. 591–598. https://doi.org/10.1055/s-0033-1363997
- 106. Upadhyay S., Tripathi A.C., Paliwal S., Saraf S.K. // EXCLI J. 2017. V. 16. P. 628. https://doi.org/10.17179/excli2017-250
- 107. Li X., Liu A., Yang L., Zhang K., Wu Y.-M., Zhao M.-G., Liu S.-B. // Mol. Brain. 2018. V. 11. P. 12. https://doi.org/10.1186/s13041-018-0355-x
- 108. Zhang X.Y., Zhang L.-M., Mi W.-D., Li Y.-F. // Neural Regen. Res. 2018. V. 13. P. 1937–1944. https://doi.org/10.4103/1673-5374.239442
- 109. Perkins E.C., Newport D.J. // Curr. Treat. Options Psych. 2018. V. 5. P. 377–400. https://doi.org/10.1007/s40501-018-0159-8
- 110. Novitskii A.A., Bochkov P.O., Shevchenko R.V. // Bull. Exp. Biol. Med. 2018. V. 165. P. 751–753. https://doi.org/10.1007/s10517-018-4257-9
- 111. Яркова М.А., Литвин А.А., Колыванов Г.Б., Жердев В.П., Середенин С.Б., Гегечкори В.И. // Фармакокин. и фармакодин. 2018. № 2. С. 52–58.
- 112. Miller C.K., Krentzel A.A., Patisaul H.B., Meitzen J. // Physiol. Behav. 2020. V. 214. P. 112770. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112770

- 113. Sartori S.B., Singewald N. // Pharmacol. Ther. 2019. V. 204. P. 107402. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107402
- 114. Zoicas I., Kornhuber J. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 1412. https://doi.org/10.3390/ijms20061412
- 115. *Tu C.H., MacDonald I., Chen Y.H.* // Front. Psychiatry. 2019. V. 10. P. 14. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2019.00014
- 116. Harvey B.H., Shahid M. // Pharmacol. Biochem. Behav. 2012. V. 100. P. 775–800. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.06.014
- 117. Galambos J., Bielik A., Krasavin M., Orgován Z., Domány G., Nógrádi K., Wágner G., Balogh G.T, Béni Z., Kóti J., Szakács Z., Bobok A., Kolok S., Mikó-Bakk M.L., Vastag M., Sághy K., Laszy J., Halász A.S., Balázs O., Gál K., Greiner I., Szombathelyi Z., Keserü G.M. // J. Med. Chem. 2017. V. 60. P. 2470-2484. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01858
- 118. Reis A.S., Pinz M., Duarte L.F.B., Roehrs J.A., Alves D., Luchese C., Wilhelm E.A. // J. Psyc. Res. 2017. V. 84. P. 191–199. https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2016.10.007
- 119. *Anderson G.* // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2020. V. 98. P. 109782. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.109782
- Nagase H., Saitoh A. // Pharmacol. Ther. 2020. V. 205. P. 107427.
 - https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107427
- 121. Hang A., Wang Y.J. // Acta Pharmacol. Sin. 2015. V. 36. P. 783–790. https://doi.org/10.1038/aps.2015.32
- 122. Anand J.P., Montgomery D. // Handb. Exp. Pharm. 2018. V. 247. P. 21–51. https://doi.org/10.1007/164_2018_104
- 123. Hassan A.N., Howe A.S., Samokhvalov A.V., Foll B.L., George T.P. // Am. J. Addict. 2017. V. 26. P. 551–563. https://doi.org/10.1111/ajad.12581
- 124. Wang Q., Long Y., Hang A., Zan G.-Y., Shu X.-H., Wang Y.-J., Liu J.-G. // Psychopharmacology (Berl.). 2016. V. 233. P. 2411–2418. https://doi.org/10.1007/s00213-016-4292-z
- 125. Yamada D., Yanagisawa S., Yoshizawa K., Yanagita S., Oka J.-I., Nagase H., Saitoh A. // Neuropharmacolo-

gy. 2019. V. 160. P. 107792.

https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107792

- 126. Montes G., Da Silva B.N.M., Rezende B., Sudo R.T., Ferreira V.F., da Silva F.D., Pinto A.D.C., Da Silva B.V., Zapata-Sudo G. // Molecules. 2017. V. 22. P. 800. https://doi.org/10.3390/molecules22050800
- 127. Minard A., Bauer C.C., Wright D.J., Rubaiy H.N., Muraki K., Beech D.J., Bon R.S. // Cells. 2018. V. 7. P. 52. https://doi.org/10.3390/cells7060052
- 128. Yang L.P., Jiang F.-J., Wu G.-S., Deng K., Wen M., Zhou X., Hong X., Zhu M.X., Luo H.-R. // PLoS One. 2015. V. 10. P. e0136255. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136255
- 129. Zhu Y., Lu Y., Qu C., Miller M., Tian J., Thakur D.P., Zhu J., Deng Z., Hu X., Wu M., McManus O.B., Li M., Hong X., Zhu M.X., Luo H.-R. // Br. J. Pharmacol. 2015. V. 172. P. 3495–3509. https://doi.org/10.1111/bph.13140
- 130. Kárpáti A., Yoshikawa T., Naganuma F., Matsuzawa T., Kitano H., Yamada Y., Yokoyama M., Futatsugi A., Mikoshiba K., Yanai K. // Sci. Rep. 2019. V. 9. P. 16451. https://doi.org/10.1038/s41598-019-52623-6
- 131. Sadek B., Bahi A., Schwed J.S., Walter M., Stark H. // Drug Des. Dev. Ther. 2014. V. 8. P. 627–637. https://doi.org/10.2147/DDDT.S63088
- 132. Pastore V., Wasowski C., Martin P., Enrique A., Higgs J., Bruno-Blanch L.E., Milesi V., Marder M. // Eur. J. Pharm. 2018. V. 819. P. 270–280. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.11.048
- Hughs, J. Jiang W.T., Liu L., Song F.-C., Zhu X., Shi G.-L., Ding S.-M., Ke H.-M., Wang W., O'Donnell J.M., Zhang H.-T., Luo H.-B., Wan Y.-Q., Song G.-Q., Xu Y. // CNS Neurosci. Ther. 2018. V. 24. P. 889–896. https://doi.org/10.1111/cns.12864
- 134. Zhu L.J., Chang L., Shi H.J., Li N. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2020. V. 523. P. 299–306. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.12.037
- 135. Спасов А.А., Жуковская О.Н., Мальцев Д.В., Мирошников М.В., Скрипка М.О., Султанова К.Т., Морковник А.С. // Биоорг. химия. 2020. Т. 46. С. 92–100. [Spasov A.A., Zhukovskaya O.N., Maltsev D.V., Miroshnikov M.V., Skripka M.O., Sultanova K.T., Morkovnik A.S. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. Р. 107–114.]
 https://doi.org/10.1134/S1068162020010124

Current Approaches to the Search of Anxiolytic Drugs

D. V. Maltsev^{*, **, #}, A. A. Spasov^{*, **}, M. V. Miroshnikov^{*}, and M. O. Skripka^{*}

[#]Phone: +7(961)071-12-50; e-mail: maltsevdmitriy@rambler.ru

*Volgograd State Medical University, Department of Pharmacology and Bioinformatics,

pl. Pavshih Bortcov 1, Volgograd, 400131 Russia

** Volgograd Medical Scientific Center, Laboratory of Experimental Pharmacology,

pl. Pavshih Bortcov 1, Volgograd, 400131 Russia

This article presents a review of studies of new pharmacological substances in the aspect of their anxiolytic activity. These substances are derivatives of various chemical classes. The variety of synthesized substances described in this article is a combination of the most interesting and promising projects at the moment. According to the current trend, a further detailed preclinical study of chemical compounds with a multitarget mechanism of action is an extremely relevant issue for researchers in the areas of pharmacology and medicine.

Keywords: anxiolysis, multitarget compounds, GABA, 5-HT, TSPO, preclinical studies



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 4, с. 464–471

— ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ —

УДК 577.151.01

ФОСФОЛИПАЗЫ С БАКТЕРИЙ РОДА *Bacillus*: БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ, СВОЙСТВА И ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

© 2021 г. Ю. А. Меркульева*, **, Д. Н. Щербаков*, **, Е. А. Шарлаева*, В. Ю. Чиркова*, #

*Алтайский государственный университет, Россия, 656049 Барнаул, просп. Ленина, 61 **Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор", Россия, 630559 Кольцово, Новосибирская обл.

> Поступила в редакцию 19.07.2020 г. После доработки 20.08.2020 г. Принята к публикации 26.08.2020 г.

Фосфолипазы — ферменты, катализирующие гидролитическое расщепление связей в фосфолипидах, обнаружены почти у всех организмов. Наибольший интерес вызывают фосфолипазы микробного происхождения. Популярность бактериальных ферментов обусловлена их огромным разнообразием и технологическими свойствами: высокой удельной активностью, термостабильностью, широкой субстратной специфичностью. Получение рекомбинантных бактериальных фосфолипаз и их совершенствование остаются актуальными задачами, для решения которых необходимы углубление и систематизация знаний о ферментах данной группы. В настоящем обзоре описаны свойства, структура и механизм действия бактериальных фосфолипаз С, которые получили широкое применение в различных областях практической деятельности человека: научных исследованиях, медицине, пищевой, химической промышленности и др.

Ключевые слова: фосфолипиды, фосфолипаза, ацилгидролаза, фосфодиэстераза, бактериальные ферменты, Bacillus, промышленные ферменты

DOI: 10.31857/S0132342321030131

введение

Фосфолипазы (PL) (КФ 3.1.1, 3.1.4) – ферменты, осуществляющие гидролиз различных связей в фосфолипидах (рис. 1) и которые наряду с гликолипидами и холестерином относятся к основным компонентам биологических мембран. Действуя на поверхности раздела "липид-вода", фосфолипазы выступают биокатализаторами межфазного катализа [1, 2]. Данные ферменты широко распространены в природе и выполняют разнообразные функции: участвуют в поддержании липидного состава мембран, играют существенную роль в развитии воспалительного процесса, запуская синтез медиаторов воспаления, принимают участие в работе инозитолфосфатной системы, обеспечивающей трансмембранную передачу гормональных сигналов, выступают активными компонентами змеиного яда гемолитического действия и др. [3, 4].

В зависимости от сайта расщепления связи в молекуле фосфолипида выделяют четыре основ-

ных семейства фосфолипаз: А, В, С и D (рис. 2) [5]. Фосфолипазы типов А и В – ацилгидролазы, типов С и D – фосфодиэстеразы. Фосфолипазы A1 (PLA1) и A2 (PLA2) гидролизуют SN-1 или SN-2 ацильную цепь с высвобождением свободной жирной кислоты и 1- или 2-ацил-лизофосфолипида соответственно. В случае отщепления обеих жирных кислот говорят о фосфолипазе типа В (PLB).

Фосфолипаза С (PLC) расщепляет глицерофосфатную связь с образованием диацилглицерола и фосфат-содержащей полярной группы, а фосфолипаза D (PLD) гидролизует связь между фосфатной и спиртовой группами, при этом высвобождаются фосфатидная кислота и спирт.

В зависимости от молекулярной массы, клеточной локализации, способа регуляции и субстратной специфичности выделяют несколько изоформ для каждого типа фосфолипаз [3, 4, 6]. Например, в клетках человека идентифицированы 10 изоформ фосфолипазы С, а у вирусов, бактерий, дрожжей, слизевиков, растений и млекопитающих обнаружены различные изоформы фосфолипазы D [7].

Сокращения: PL – фосфолипаза; PLA1 – фосфолипаза A1; PLA2 – фосфолипаза A2; PLB – фосфолипаза B; PLC – фосфолипаза C; PLD – фосфолипаза D.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (913) 218-47-06; эл. почта: varvara.chirkova@gmail.com).



Полярная "головка"

Рис. 1. Общее строение фосфолипидов: заместители R₁ и R₂ – остатки жирных кислот, X – головная группа: холин, этаноламин, глицерол, инозитол или серин.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ФОСФОЛИПАЗЫ

Большое разнообразие фосфолипаз продуцируется патогенными и непатогенными бактериями. Некоторые из бактериальных фосфолипаз проявляют свойства токсинов, другие, не будучи токсинами, играют важную роль в патогенезе заболеваний. Токсический эффект фосфолипаз проявляется как непосредственно в лизисе, так и в изменении метаболизма клеток хозяина. Накапливающиеся продукты их катализа — лизофосфолипиды — обладают сильными поверхностно-активными свойствами, что приводит к разрушению липопротеиновых структур клетки и активации гидролаз, ответственных за автолитический распад клеточных полимеров [8, 9].

У микроорганизмов обнаружены все типы фосфолипаз, различающиеся по положению гидролизуемой связи. Фосфолипаза A1 (КФ 3.1.1.32), отщепляющая SN-1 ацильную цепь, обладает широкой субстратной специфичностью, кофактором выступает Ca²⁺ [10]. PLA1 обнаружена у бактерий Serratia spp., Yersinia enterocolitica, Streptomyces alboflavus, Escherichia coli, Bacillus subtilis, *В. megaterium*, *Мусоbacterium phlei* [11, 12]. Фосфолипаза A1 грамотрицательных бактерий выступает одним из факторов вирулентности, что вызывает повышенный интерес к изучению этой фосфолипазы. Она усиливает гемолитические свойства клеток бактерий и повышает их инвазивность [13].

Фосфолипаза А2 (КФ 3.1.1.4), отщепляющая SN-2 ацильную цепь, действует на фосфатидилэтаноламин, холинплазмалоген и фосфатиды. Кофактором также выступает Ca²⁺ [14]. PLA2 обнаружена у бактерий *E. coli, Streptomyces coelicolor, St. violaceoruber, Helicobacter pylori* [15], *Yersinia enterocolitica* [16]. У клеток *E. coli* фосфолипаза A2 увеличивает уровень лизофосфолипидов и жирных кислот в мембране, повышая ее проницаемость и участвуя таким образом в выбросе токсина бактериоцина из клетки.

Фосфолипазу В (L) (КФ 3.1.1.5) также называют лизофосфолипаза. Фермент действует на лизолецитин (лизофосфатидилхолин), образующийся в результате действия фосфолипазы A1 на лецитин (фосфатидилхолин) [17]. PLB обладает активностями фосфолипаз A1 и A2 – отщепляет обе SN-1 и SN-2 ацильные цепи фосфолипида. Фосфолипаза В не имеет кофактора. Ингибиторами для некоторых PLB служат диизопропилфторфосфат и *n*-хлормеркурбензойная кислота, для всех без исключения – поверхностно-активные вещества. Фосфолипаза В обнаружена у *Pseudomonas fluorescens, Bacillus subtilis, Streptomyces* sp., *Mycoplasma laidlawii, M. phlei, Serratia plymuthica, Dictyostelium discoideum* [18–20].

Фосфолипаза С (КФ 3.1.4.3) гидролизует глицерофосфатную связь, что приводит к образованию диацилглицерола и фосфат-содержащей полярной группы. PLC – ключевой фермент метаболизма фосфатидилинозитола и липидных сигнальных путей. Она гидролизует фосфатидилинозитол на два вторичных медиатора – инози-



1-Ацил-лизофосфолипид + ЖК

Рис. 2. Реакции, катализируемые фосфолипазами: ЖК – жирная кислота, ФК – фосфатидная кислота, ДАГ – диацилглицерол, Х – головная группа, Р-Х – фосфорилированная головная группа [5].

Источник фосфолипаз	Группа	Микроорганизмы
Грамположительные бактерии	Zn-зависимые металлофосфолипазы C (α-токсин, BC-PLC)	Clostridium perfringens Bacillus cereus
	Сфингомиелиназы	Bacillus cereus Staphylococcus aureus
	Фосфолипазы С, гидролизующие фосфатидилинозитол (PLC-A)	Bacillus cereus Bacillus thuringiensis Listeria monocytogenes
Грамотрицательные бактерии	Фосфолипазы С <i>Pseudomonas</i> sp. (PLC-H и PLC-N) Фосфолипазы С <i>Legionella</i> sp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Legionella</i> sp.

Таблица 1. Группы бактериальных фосфолипаз по схожести структур

толтрифосфат и диацилглицерол, которые, вовлекаясь в сигнальные пути, активируют кальциевые каналы эндоплазматического ретикулума и протеинкиназу С соответственно. Кофактором данного фермента выступает Zn²⁺ [21]. Фосфолипаза С обнаружена у Listeria monocytogenes, Clostridium perfringens, Bacillus cereus, B. mycoides, B. anthracis, Pseudomonas aeruginosa, P. cepacia, P. fluopseudomallei, rescens, Burkholderia Legionella pneumophila, Acinetobacter calcoaceticus, Staphylococcus aureus [22, 23]. Активность PLC зависит не только от состава фосфолипидов клеточных мембран, но и от компонентов среды, например, снижение активности фосфолипазы С микроорганизмов Clostridium perfringens и Bacillus cereus наблюдается под действием фосфат- и глицеролсодержащих соединений, возможно, за счет их конкуренции с субстратом за соответствующие центры связывания с ферментом [2, 24-26].

Фосфолипаза D (КФ 3.1.4.4) гидролизует связь между фосфатной и спиртовой группами фосфатидилхолина, при этом высвобождаются фосфатидная кислота и растворимый холин [27]. Активаторы PLD – анионные поверхностно-активные вещества, а ингибиторы – катионные. Фосфолипаза D обнаружена у Acinetobacter baumanii, E. coli, Neisseria gonorrhoeae, Yersinia pestis, Chlamydia trachomatis, Pseudomonas aeruginosa, Streptomyces sp. PMF, Rickettsia conorii, R. prowazekii [28].

ФОСФОЛИПАЗА С БАКТЕРИЙ РОДА Bacillus: СТРУКТУРА, СВОЙСТВА, МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ

Фосфолипаза С, катализирующая стереоспецифический гидролиз фосфолипидов, обнаружена у широкого спектра грамположительных и некоторых грамотрицательных бактерий. Бактериальные фосфолипазы С, представляющие собой мономерные белки с типичными сигнальными последовательностями в структуре и секретирующиеся во внеклеточное пространство [6], по схожести структур принято разделять на несколько групп (табл. 1).

Гены, кодирующие α -токсин Clostridium perfringens, PLC Bacillus cereus, PLC из Clostridium bifermentans и Listeria monocytogenes, были секвенированы. Для них показана высокая степень гомологии — общие ~250 первых аминокислот. У α -токсина Clostridium perfringens, в отличие от других фосфолипаз грамположительных бактерий, имеется 120 дополнительных аминокислотных остатков на C-конце. PLC со специфичностью к фосфатидилхолину (PC-PLC) B. thuringiensis и B. cereus, входящие в одну группу, имеют высокую степень гомологии.

Наиболее изучены структура и свойства РС-PLC Bacillus cereus. В результате обширных исследований этот белок получил статус прототипа фосфолипазы С [29]. Фермент – небольшой белок (28 кДа), довольно устойчивый к воздействию денатурирующих агентов: мочевине, додецилсульфату натрия и температуре (в присутствии 1 мМ Zn²⁺) [30]. Благодаря стабилизирующим ионам цинка, белок обладает способностью выдерживать нагрев до 100°С в течение коротких периодов времени [31]. Оптимум действия фермента наблюдается при температуре 50°С и рН 8-10. Фосфолипаза С обладает высокой стабильностью, а также толерантностью к замене ионов Zn²⁺ на другие двухвалентные катионы с сохранением (Co²⁺, Ni²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Ba²⁺) либо увеличением (Mn²⁺) активности фермента [31, 32].

Фермент представляет собой единственную полипептидную цепь, свернутую в виде семи спиралей. образующих скрученную структуру (рис. 3a). PLC Bacillus spp. синтезируется с сигпоследовательностью нальной на *N*-конце (24 а.о.), секретируется во внеклеточное пространство в форме пропептида. Активная форма фермента (245 а.о.) образуется при отщеплении 14 *N*-концевых аминокислотных остатков клеточными протеазами (рис. 36) [33-35].



Рис. 3. Модель третичной (*a*) и вторичной (*б*) структуры фосфатидил-специфичной фосфолипазы С *B. cereus* (PDB: 1AH7) [33–35].

В активном центре расположены три иона Zn^{2+} , один из которых слабо связан. Ионы Zn^{2+} поддерживают конформационную стабильность фермента и участвуют в связывании субстрата независимо от его количества [36]. Определены 9 а.о., участвующих в связывании ионов: 5 His, 2 Asp, 1 Glu и 1 Trp. Считается, что первая аминокислота (Trp) в зрелом пептиде — незаменима для ферментативной активности, поскольку она способствует координации с основными ионами цинка. Ионы связываются с аминокислотными остатками из разных спиралей и, следовательно, стабилизируют конформацию молекулы.

РLС бактерий рода *Bacillus* обладает широкой субстратной специфичностью — распознает разные фосфолипидные субстраты, которые отличаются только структурой головной группы: фосфатидилицилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилинозитол, фосфатидилглицерол, фосфатидилсерин (рис. 4) [37—39]. Фосфатидилхолин с шестью атомами углерода в каждой из ацильных боковых цепей подвергается воздействию фермента с большей каталитической эффективностью, чем субстрат, содержащий C2—C4 жирные кислоты [40, 41]. Пространственная ориентация боковых цепей глицерола на фосфатидилхолине, по-видимому, — важный фактор, способствующий связыванию и катализу [42].

Эукариотические и бактериальные фосфолипазы имеют общий механизм реакции — "пингпонг" с промежуточным звеном, в ходе которого субстратная фосфатная группа ковалентно связывается с нуклеофильным аминокислотным остатком из активного центра [23]. Остатки аминокислот, составляющие активный сайт (Glu4, Туг56 и Phe66), образуют каркас для связывания с основанием субстрата [43]. Карбоксильная группа Glu4 взаимодействует с атомом азота в головной группе холина с помощью полярной или ионной связи, а Phe66 — через катион-π-взаимодействие [44, 45]. Предполагается, что Туг56 может стабилизировать положительный заряд на ингибиторе или субстрате и, по-видимому, определяет специфичность фермента [46].

В отношении молекулярного механизма действия PLC *B. cereus* существуют две точки зрения. Согласно первой, Asp55 играет роль основания, которое атакует нуклеофильную молекулу воды посредством депротонирования; вода, в свою очередь, запускает атаку на фосфор фосфолипида (рис. 5*a*) [38, 41].

Согласно второй точке зрения, Zn1 и Zn3 инициируют нуклеофильную атаку на фосфор, в то время как Zn2 активирует молекулу воды для протонирования уходящей группы (рис. 56) [47, 48].

ПОЛУЧЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ФОСФОЛИПАЗ С

В качестве источников получения ферментов могут выступать растения, животные и микроорганизмы. Но выделять ферменты из растительных или животных источников экономически и технологически менее выгодно, чем получать их с помощью микроорганизмов. Использование *E. coli* позволяет нарабатывать большое количество неактивной формы данного фермента в тельцах включения. Для получения активного фермента и активного фермента дополнительно осуществляют стадии разрушения клеток, очистки, рефолдинга и активации белка, что повышает стоимость конечного продукта [49].

Первая попытка внеклеточного синтеза PLC была проведена с использованием системы *Pichia pastoris*. *N*-Конец фермента объединяли с сигнальным пептидом α-фактора из *Saccharomyces*



Рис. 4. Спектр субстратов для фосфолипазы С *B. cereus*: (*a*) – общее строение фосфолипида; (δ) – головная группа [37].

сегеvisiae для секреции и His_6 -тегом, с дальнейшей очисткой после отщепления сигнального пептида [50]. Однако культивирование этого продуцента требует присутствия метанола в качестве индуктора и дорогих сред, что делает его использование невыгодным. Ферментативная активность PLC зависит от цинка, однако активность роста *P. pastoris* ингибируется избытком Zn²⁺ (5 мМ). Учитывая это, а также длительность культивирования *P. pastoris* (несколько суток), для получения PLC в промышленных масштабах предпринимаются попытки использовать экспрессионную систему *B. subtilis*. Как правило, для секреции применяется сигнальная последовательность α -амилазы атуЕ *B. subtilis* [51].

ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ФОСФОЛИПАЗ С

Бактериальные фосфолипазы С используются для исследования механизмов активации арахидоновой кислоты и протеинкиназы С в клетках млекопитающих. Кроме того, они могут выступать в качестве реагентов для изучения структуры клеточных мембран, например, мембран эритроцитов [52, 53]. В отличие от многих бактериальных токсинов, для PLC не требуется интернализация белка, что привлекло внимание ученых к исследованию возможности применения фермента для доставки лекарственных средств. PLC, связанная с подходящим антителом, может составлять основу активного цитотоксического агента. На сегодняшний день фосфолипаза С считается одним из ключевых ферментов системы доставки лекарств по пути эндоцитоза, по-



Рис. 5. Предполагаемые механизмы гидролиза фосфолипидов фосфолипазой С *B. cereus:* (*a*) – депротонирование воды, запускающее атаку на фосфор фосфолипида [38, 41]; (δ) – нуклеофильная атака на фосфор фосфолипида и активирование молекулы воды [47, 48].

468

скольку может катализировать мембранное слияние между клеточными мембранами и фосфолипидами средств доставки — липосом [54].

PLC имеет терапевтический потенциал при тромбогеморрагическом синдроме, т.к. способна инактивировать тромбопластин, запускающий процесс свертывания крови [31]. Гемолитическая фосфолипаза С (α-токсин) *Clostridium perfringens* играет основную роль в патогенезе газовой гангрены, в связи с чем выступает перспективным компонентом вакцины против данного заболевания [23].

В пищевой промышленности фосфолипаза С используется для рафинирования масел: соевого. пальмового, подсолнечного, рапсового и др. Неочищенное растительное масло состоит преимущественно из триглицеридов, но может содержать до 3% фосфолипидов, которые вызывают потемнение масла и изменение вкуса при хранении [55]. Для удаления фосфолипидов при рафинировании используют фосфолипазы. Участие PLC в процессе рафинирования не приводит к образованию свободных жирных кислот, которые необходимо удалять. Это позволяет сократить потери сырья, поэтому использование PLC предпочтительнее, чем PLA. В настоящее время для производства рафинированного растительного масла предложен препарат PLC из B. anthracis (Purifine[™], Verenium) [56]. PLC из *B. cereus* – оптимальный фермент для использования в промышленном рафинировании растительных масел. Он обладает высокой удельной активностью, наиболее подходящим спектром субстратной специфичности и термостабильностью [5].

Фосфолипазу С применяют также для предварительной обработки масла при получении биодизельного топлива. При одновременном использовании PLC и лизофосфолипаз наблюдается эффект синергии, который делает ферментативный процесс производства биодизельного топлива более экономичным и экологичным. Сочетание рафинирования и трансэтерификации высвободившихся жирных кислот в этом процессе возможно осуществлять с одновременным использованием фосфолипаз и жидкой липазы Callera Trans L. [57].

При формировании структурно-механических свойств молока, а также в процессах созревания сыров важную роль играют фосфолипиды, в связи с чем фосфолипазы находят широкое применение в сыроделии. В настоящее время используют коммерческий препарат PLA1 из *A. oryzae* (YieldMAX® PL, Novozymes), PLC *B. cereus* и PLD *St. chromofuscus*. При производстве сыра большая часть фосфолипидов удаляется вместе с сывороткой. При использовании фосфолипаз в результате гидролиза фосфолипидов удаляется только полярная группа, что позволяет увеличить выход продукта [58]. Еще одна перспективная область использования фосфолипазы С – получение диацилглицеридов с определенной энантиомерной структурой, которые находят применение в синтезе стереоспецифичных соединений, а также выступают клеточными медиаторами [59]. Последовательное действие двух классов фосфолипаз С и D может быть использовано, например, для синтеза дигидроксиацетонфосфата (DHAP) – интермедиата тонкого химического синтеза, или такого важного для медицины и фармацевтики биоактивного соединения, как сфингозин-1-фосфат (S1P), – главного регулятора сосудистой и иммунной системы [60, 61].

Повышение эффективности PLC может быть достигнуто путем иммобилизации фермента, т.к. катализаторы, полученные путем ковалентного присоединения, имеют более высокую удельную активность и пригодны для многократного использования [62].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бактериальные фосфолипазы не только играют ют важную роль в биологических процессах, но и находят широкое применение в научных исследованиях, медицине, пищевой, химической и других отраслях промышленности. Полученные в настоящее время рекомбинантные ферменты отличаются улучшенными технологическими свойствами (высокой удельной активностью, термостабильностью, широкой субстратной специфичностью), что открывает дополнительные возможности для их использования, поэтому создание эффективных продуцентов фосфолипаз на основе непатогенных бактерий остается важной биотехнологической задачей.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (номер темы FZMW-2020-0002, "Разработка продуцентов рекомбинантных ферментов для сыроделия").

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований, выполненных авторами данной работы, с участием людей и животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aloulou A., Ali Y.B., Bezzine S., Gargouri Y., Gelb M.H. // Methods in Molecular Biology. 2012. V. 861. P. 63–85. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_4
- Литвинко Н.М. // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия химических наук. 2015. № 4. С. 109–121.
- 3. Ulbrich-Hofmann R. // ChemBioChem. 2012. V. 13. P. 2148–2149. https://doi.org/10.1002/cbic.201200542
- Филькин С.Ю., Липкин А.В., Федоров А.Н. // Усп. биол. химии. 2020. № 60. С. 369-410.
- Borrelli G.M., Trono D. // Int. J. Mol. Sci. 2015. V. 16. P. 20774–20840. https://doi.org/10.3390/iims160920774
- Titball R.W. // Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol. 1998. V. 27. P. 127S–137S.
- Ramenskaia G.V., Melnik E.V., Petukhov A.E. // Biomed. Khim. 2018. V. 64. P. 84–93. https://doi.org/10.18097/PBMC20186401084
- 8. Titball R.W. // Microbiol. Rev. 1993. V. 57. P. 347-366.
- Songer J.G. // Trends Microbiol. 1997. V. 5. P. 156– 161.
- Scandella C.J., Kornberg A. // Biochemistry. 1971. V. 10. P. 4447–4456.
- Richmond G.S., Smith T.K. // Int. J. Mol. Sci. 2011. V. 12. P. 588–612. https://doi.org/10.3390/ijms12010588
- Murayama K., Kano K., Matsumoto Y., Sugimori D. // J. Struct. Biol. 2013. V. 182. P. 192–196. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2013.02.003
- Bakholdina S.I., Tischenko N.M., Sidorin E.V., Isaeva M.P., Likhatskaya G.N., Dmitrenok P.S., Kim N.Yu., Chernikov O.V., Solov'eva T.F. // Biochemistry. 2016. V. 81. P. 47–57. https://doi.org/10.1134/s0006297916010053
- 14. Hanahan D.J., Brockerhoff H., Barron E.J. // J. Biol. Chem. 1960. V. 235. P. 1917–1923.
- 15. *Ishiwata S.* // Dainihon Sanshi Kaiho. 1901. V. 114. P. 1–5.
- Köhler G.A., Brenot A., Haas-Stapleton E., Agabian N., Deva R., Nigam S. // Biochim. Biophys. Acta. 2006. V. 1761. P. 1391–1399. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.09.011
- Saito K., Sugatani J., Okumura T. // Methods in Enzymology. 1991. V. 197. P. 446–456. https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)97170-4
- Jiang F, Huang S., Imadad K., Li C. // Bioresour. Technol. 2012. V. 104. P. 518–522. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.112
- Matsumoto Y., Mineta S., Murayama K., Sugimori D. // FEBS J. 2013. V. 280. P. 3780–3796. https://doi.org/10.1111/febs.12366
- Masayama A., Kato S., Terashima T., Mølgaard A., Hhemmi H., Yoshimura T., Moriyama R. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2010. V. 74. P. 24–30. https://doi.org/10.1271/bbb.90391
- Taguchi R., Ikezawa H. // Arch. Biochem. Biophys. 1978. V. 186. P. 196–201.

- 22. *Djordjevic J.T.* // Front. Microbiol. 2010. V. 1. P. 1–13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00125
- Pokotylo I., Pejchar P., Potocký M., Kocourková D., Krčková Z., Ruelland E., Kravets V., Martinec J. // Prog. Lipid Res. 2013. V. 52. P. 62–79. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2012.09.001
- 24. Ивинскене В.Л. // Энтомопатогенные бактерии и их роль в защите растений: сб. науч. тр. ВАСХНИЛ. Сиб. отд-ние. Новосибирск, 1987. С. 57-75.
- Ikezawa H., Nakabayashi T., Suzuki K., Nakajima M., Taguchi T., Taguchi R. // J. Biochem. 1983. V. 93. P. 1717–1719. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134315
- 26. Volwerk J.J., Koke J.A., Wetherwax P.B., Griffith O.H. // FEMS Microbiol. Lett. 1989. V. 61. P. 237–241. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1989.tb03629.x
- Jenkins M.G., Frohman M.A. // Cell. Mol. Life Sci. 2005. V. 62. P. 2305–2316. https://doi.org/10.1007/s00018-005-5195-z
- Selvy P.E., Lavieri R.R., Lindsley C.W., Brown H.A. // Chem. Rev. 2011. V. 111. P. 6064–6119. https://doi.org/10.1021/cr200296t
- 29. Sakurai J., Nagahama M., Oda M. // J. Biochem. 2004. V. 136. P. 569–574. https://doi.org/10.1093/ib/mvh161
- González-Bulnes P., González-Roura A., Canals D., Delgado A., Casas J., Llebaria A. // Bioorg. Med. Chem. 2010. V. 18. P. 8549–8555. https://doi.org/10.1016/i.bmc.2010.10.031
- Otnaess A.-B., Little C., Sletten K., Wallin R., Johnsen S., Flengsrud R., Prydz, H. // Eur. J. Biochem. 1977. V. 79. P. 459–468. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1977.tb11828.x
- Elleboudy N.S., Aboulwafa M.M., Hassouna N.A. // Asian Pacific J. Trop. Med. 2014. V. 7. P. 860–866. https://doi.org/10.1016/s1995-7645(14)60150-4
- Hough E., Hansen L.K., Birknes B., Jynge K., Hansen S., Hordvik A., Little C., Dodson E., Derewenda Z. // Nature. 1989. V. 338. P. 357–360. https://doi.org/10.1038/338357a0
- 34. Rose A.S., Bradley A.R., Valasatava Y., Duarte J.M., Prlić A., Rose P.W. // Proceedings of the 21st International Conference on Web3D Technology – Web3D'16. 2016. P. 185–186. https://doi.org/10.1145/2945292.2945324
- Rose A.S., Hildebrand P.W. // Nucleic. Acid Res. 2015. V. 43. P. W576–W579. https://doi.org/10.1093/nar/gkv402
- 36. Beecher D.J., Wong A.C.L. // Microbiology. 2000. V. 146. P. 3033–3039. https://doi.org/10.1099/00221287-146-12-3033
- Lyu Y., Ye L., Xu J., Yang X., Chen W., Yu H. // Biotechnol. Lett. 2016. V. 38. P. 23–31. https://doi.org/10.1007/s10529-015-1962-6
- Antikainen N.M., Hergenrother P.J., Harris M.M., Corbett W., Martin S.F. // Biochem. 2003. V. 42. P. 1603–1610. https://doi.org/10.1021/bi0267285
- 39. Shinitzky M., Friedman P., Haimovitz R. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 14109–14115.

- El-Sayed M.Y., DeBose C.D., Coury L.A., Roberts M.F. // Biochim. Biophys. Acta. 1985. V. 837. P. 325–335. https://doi.org/10.1016/0005-2760(85)90056-6
- Martin S.F., Follows B.C., Hergenrother P.J., Trotter B.K. // Biochemistry. 2000. V. 39. P. 3410–3415. https://doi.org/10.1021/bi9919798
- Snyder W.R. // Biochim. Biophys. Acta. 1987. V. 920. P. 155–160.
- 43. Benfield A.P., Goodey N.M., Phillips L.T., Martin S.F. // Arch. Biochem. Biophys. 2007. V. 460. P. 41–47.
- 44. Burley S.K., Petsko G.A. // Advances in Protein Chemistry. 1988. V. 39. P. 125–189. https://doi.org/10.1016/s0065-3233(08)60376-9
- Dougherty D.A. // Science. 1996. V. 271. P. 163–168. https://doi.org/10.1126/science.271.5246.163
- 46. Celandroni F., Salvetti S., Senesi S., Ghelardi E. // FEMS Microbiol. Lett. 2014. V. 361. P. 95–103. https://doi.org/10.1111/1574-6968.12615
- 47. Sundell S., Hansen S., Hough E. // Protein Eng. 1994. V. 7. P. 571–577. https://doi.org/10.1093/protein/7.4.571
- 48. Liao R.Z., Yu J.G., Himo F. // Phys. Chem. B. 2010. V. 114. P. 2533–2540. https://doi.org/10.1021/jp910992f
- 49. Martin S.F., Spaller M.R., Hergenrother P.J. // Biochem. 1996. V. 35. P. 12970–12977. https://doi.org/10.1021/bi961316
- 50. Seo K.H., Rhee J.I. // Biotechnol. Lett. 2004. V. 26. P. 1475–1479. https://doi.org/10.1023/b:bile.0000044447.15205.90
- Durban M.A., Silbersack J., Schweder T., Schauer F., Bornscheuer U.T. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 74. P. 634–639. https://doi.org/10.1007/s00253-006-0712-z

- Kent C., Evers A., Haun S.S.L. // Arch. Biochem. Biophys. 1986. V. 250. P. 519–525.
- Parkinson E.K. // Carcinogenesis. 1987. V. 8. P. 857– 860. https://doi.org/10.1093/carcin/8.6.857
- Shimanouchi T., Kawasaki H., Fuse M., Umakoshi H., Kuboi R. // Colloids Surf. B Biointerfaces. 2013. V. 103. P. 75–83.
- Mounts T.L., Nash A.M. // J. Am. Oil Chem. Soc. 1990. V. 67. P. 757–760. https://doi.org/10.1007/bf02540486
- 56. De Maria L., Vind J., Oxenboll K.M., Svendsen A., Patkar S. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 74. P. 290–300. https://doi.org/10.1007/s00253-006-0775-x
- 57. Cesarini S., Haller R.F., Diaz P., Nielsen P.M. // Biotechnol. Biofuels. 2014. V. 7. P. 1–12. https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-29
- Casado V., Martín D., Torres C., Reglero G. // Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols. New York: Springer, 2012. V. 861. P. 495–523.
- Arrigo P.D., Servi S. // Trends in Biotechnology. 1997.
 V. 15. P. 90–96. https://doi.org/10.1016/s0167-7799(97)01012-3
- Schümperli M., Pellaux R., Panke S. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 75. P. 33–45. https://doi.org/10.1007/s00253-007-0882-3
- Morigaki E., Miura Y., Takahata K., Tada M., Nakajima S., Baba N. // J. Chem. Res. 1998. V. 12. P. 774–775. https://doi.org/10.1039/a804770g
- Anthonsen T., D'Arrigo P., Pedrocchi-Fantoni G., Secundo F., Servi S., Sundby E. // J. Mol. Catal. B Enzym. 1999. V. 6. P. 125–132. https://doi.org/10.1016/s1381-1177(98)00141-6

Phospholipases C from *Bacillus*: Biological Role, Properties and Fields of Application

Yu. A. Merkulyeva*, **, D. N. Shcherbakov*, **, E. A. Sharlaeva*, and V. Yu. Chirkova*,

*Phone: +7(913) 218-47-06; e-mail: varvara.chirkova@gmail.com

*Altai State University, prosp. Lenina 61, Barnaul, 656049 Russia

**State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia

Phospholipases – enzymes of the class of hydrolases that catalyze the cleavage of bonds in phospholipids, they are found in almost all organisms. Enzymes of microbial origin are of the greatest interest. The popularity of bacterial enzymes is due to their huge variety and technological properties: high specific activity, thermal stability, and wide substrate specificity. The production of recombinant bacterial phospholipases and their improvement remain an urgent task, for which it is necessary to deepen and systematize knowledge about the enzymes of this group. This review describes the properties, structure, and mechanism of action of bacterial phospholipases C, which are widely used in various areas of human practice: scientific research, medicine, food, chemical industry, etc.

Keywords: phospholipids, phospholipase, acyl hydrolase, phosphodiesterase, bacterial enzymes, Bacillus, industrial enzymes





——— ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ ——

УДК 57.012.5+612.1

РЕЦЕПТОРЫ ВАЗОПРЕССИНА В КРОВЕНОСНЫХ СОСУДАХ И ПРОЛИФЕРАЦИЯ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ

© 2021 г. И.И. Хегай*, #

*Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, 630090 Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 10 Поступила в редакцию 07.05.2020 г.

> После доработки 13.12.2020 г. Принята к публикации 14.12.2020 г.

Пролиферативные эффекты вазопрессина относятся к наименее исследованной области молекулярной биохимии пептидных гормонов. В то же время синтетические препараты вазопрессина достаточно широко применяются в терапии сосудистых заболеваний и в онкологии. В ряде случаев вазопрессин оказывает пролиферативные эффекты, однако в последнее время более активно обсуждаются появившиеся сведения об антипролиферативных свойствах гормона. Любая пролиферация сопровождается неоваскуляризацией тканей. В кровеносных сосудах экспрессируются два основных типа рецепторов вазопрессина. В этой связи актуален анализ механизмов действия вазопрессина с выходом на митогенные и секреторные эффекты в клетках кровеносных сосудов. В обзоре рассмотрены тканеспецифичные особенности экспрессии рецепторов вазопрессина и последние данные по организации сигнальной трансдукции гормональной рецепции. Внимание сосредоточено на гладкомышечных клетках и тромбоцитах, экспрессирующих рецепторы V₁₄-типа, и эндотелиоцитах, экспрессирующих V₂-рецепторы вазопрессина. Подробно проанализирована структура гликопептидов и ферментов, играющих роль посредников в неканонической трансдукции гормонального сигнала. Особое внимание уделено молекулярной организации тромбоцитарно-эндотелиального адгезивного белка РЕСАМ-1. Интегральный гликопептид РЕСАМ-1 выполняет одновременно структурную и сигнальную функцию, преобразуя вазоконстрикторный эффект V_{1A}-рецепторов вазопрессина в реакцию других мембранных рецепторов и внутриклеточных ферментов кровеносных сосудов. Цитоплазматический отдел PECAM-1 участвует в ингибировании VEGFR-2-рецептора васкулоэндотелиального фактора роста VEGF, основного стимулятора пролиферации эндотелиоцитов. Межклеточные димеры РЕСАМ-1 активируют интегрины. В эндотелиоцитах экспрессируется интегрин αУВЗ и фактор фон Виллебранда. Мультимерные молекулы фактора фон Виллебранда участвуют в кооперации между эндотелием и интерстицием при локальной реорганизации сосудистой сети, сопровождающей репарацию кровеносных сосудов при травмах и прогрессию опухолей. Фактор фон Виллебранда агрегирует комплексы интегринов сХУВЗ с другими лигандами и мембранными рецепторами эндотелиоцитов и тромбоцитов, фиксируя клетки на базальной мембране. V_{1A}-рецепторы вазопрессина активируют секрецию VEGF в тромбоцитах и пролиферацию миоцитов. V₂-рецепторы стимулируют экзоцитоз телец Вейбеля-Паладе и секрецию фактора фон Виллебранда в эндотелиоцитах, вызывая хемотаксис гладкомышечных клеток и эндотелиоцитов. Активированные интегрины αVβ3 физически взаимодействуют с VEGFR-2-рецепторами эндотелиоцитов и модулируют стимуляцию ангиогенных эффектов.

Ключевые слова: пролиферация, рецептор VEGFR-2, V_{1A} -рецептор вазопрессина, V_2 -рецептор, тромбоцит, эндотелиоцит, тромбоцитарно-эндотелиальный PECAM-1, интегрин $\alpha V \beta 3$ **DOI:** 10.31857/S0132342321040126

введение

Вазопрессин синтезируется в крупноклеточных нейронах гипоталамуса и транспортируется по аксонам в нейрогипофиз, где депонируется и секретируется в ответ на стимуляцию осморецепторов гипоталамуса и волюморецепторов артери-

[#]Автор для связи: (эл. почта: khegay@bionet.nsc.ru).

Сокращения: АКАР – якорный белок протеинкиназы A (A kinase anchoring protein); АКТ – протеинкиназа B (AKR thymoma oncogene); AVP – аргинин-вазопрессин (arginine-vasopressin); CRE – сАМР-чувствительный элемент (сАМР response element); CREB – белок, связывающий сАМР-чувствительный элемент (сАМР response element binding protein); DDAVP – дезамино-D-аргинин-вазопрессин (deamino D arginine-vasopressin); Epac – транслоцирующий фактор, активируемый сАМР (exchange factor activated by сАМР); ERK1/2 – киназа, peryлируемая внеклеточными сигналами (extracellular signal-regulated kinase); GPCR – peцептор, coпряженный с G-белком (G protein-coupled receptor); ITIM – иммунорецепторный ингибиторный мотив на основе тирозина (immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif); LVL – лизин-вазопрессин (lysine-vasopressin); MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа (mitogen-activated protein kinase); MEK – киназа митоген-активируемой протеинкиназы (mitogen-activated protein kinase); SH2 – домен, гомологичный домену 2 саркомы Payca (Sarcoma Raus Homology 2); SHB – связующий адаптер, содержащий SH2-домен (SH2 containing protein binding adapter); SHP – тирозиновая фосфатаза с SH2-доменом (SH2 containing protein tyrosine phosphatase); VEGF – васкулоэндотелиальный фактор роста (vascular endothelial growth factor); VEGFR-2 – peцептор 2 васкулоэндотелиального фактора роста (vascular endothelial growth factor receptor 2).

ального каротидного синуса и левого предсердия [1]. Химическая структура гормона представляет нанопептид, шесть аминокислот которого замкнуты в кольцо дисульфидным мостиком между цистеинами, локализованными в 1-й и 6-й позиаминокислотной последовательности. пиях Остальные три аминокислоты формируют примыкающий к кольцу С-концевой трипептид. У большинства видов, в том числе у человека, в центре трипептида расположен Arg-8. Крайне редко, в частности у свиней, в этой позиции зафиксирован Lys-8. Природные изоформы гормона обозначают, соответственно, как аргинин-вазопрессин (AVP) и лизин-вазопрессин (LVP) [2]. В клинической и экспериментальной практике широко применяется синтетический гормональный препарат DDAVP, представляющий собой нанопептид после деаминирования Cys-1 и замены L-Arg-8 на стереоизомер D-аргинин в молекуле аргинин-вазопрессина. У химически модифицированного соединения повышена устойчивость к действию пептидаз и существенно увеличен период полувыведения из организма с исходных 15 до 75 мин. Другое важное свойство DDAVP – избирательность действия по отношению к рецепторам вазопрессина [3].

Существуют три типа рецепторов вазопрессина, все они относятся к семейству мембранных рецепторов, сопряженных с G-белками (GPCR). Два из них действуют через G_а-белки и активируют гидролиз фосфоинозитидов с последующим высвобождением внутриклеточного кальция, но между ними имеется ряд различий в первичной последовательности, влияющий на локализацию в тканях. На основании сходства сигнального механизма данные рецепторы классифицируются как гомологичные V_{lA} - и V_{lB} - рецепторы. Третий тип рецепторов сопряжен с G_s-белком и стимулирует сАМР-зависимое фосфорилирование, вследствие чего определяется как отдельный V₂-тип рецепторов вазопрессина. Гормональный препарат DDAVP – высокоспецифичный лиганд только для рецепторов V₂-типа.

ТКАНЕСПЕЦИФИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ ВАЗОПРЕССИНА

Суммарно, экспрессия рецепторов вазопрессина наблюдается в большинстве тканей организма, от клеточных элементов крови до структур головного мозга. На рис. 1 показана каноническая схема действия вазопрессина на гормональные рецепторы. Рецепторы V_{1A} -типа представлены наиболее широко. Количественный анализ транскриптомов методом секвенирования PHK (RNA-seq) выявил пики экспрессии V_{1A} -рецепторов в печени, почках, подкожной клетчатке, матке, простате, сердце, кишечнике, щитовидной

железе и надпочечниках [5]. Ранее методом авторадиографии с использованием селективных радиоактивных лигандов V_{1А}-рецепторы были идентифицированы в тромбоцитах и гладкомышечных клетках кровеносных сосудов [6, 7]. Рецепторы V_{1А}-типа связаны с пролиферацией и адгезией клеток, а также с регуляцией сократительных и секреторных процессов [3, 8]. Для рецепторов V_{1В} характерна более узкая специализация и локализация преимущественно в аденогипофизе головного мозга, где они модулируют секрецию адренокортикотропного гормона [9]. Рецепторы V₂, в свою очередь, определяются в основном в почках и осуществляют контроль реабсорбции молекул воды, натрия и мочевины в почечных канальцах [10]. Вне почек рецепторы V₂-типа экспрессируются в эндотелии кровеносных сосудов [11]. Данный тип рецепторов также выявлен в опухолевых тканях легких [12], молочной железы [13], простаты [14] и ряда других опухолей эпителиального происхождения [15, 16]. Действие рецепторов V₂-типа, локализованных вне почек, связано с регуляцией секреторных процессов, синтезом белка и пролиферацией клеток в зависимости от уровня гормона в кровеносном русле [3].

Влияние вазопрессина на пролиферацию клеток установлено достаточно давно, однако до сих пор в этой области возникают вопросы и появляются работы с внешне противоречивыми результатами. Первые эксперименты были связаны с изучением репаративного потенциала печени в условиях частичной гепатоэктомии. У крыс линии Brattleboro с генетическим дефектом синтеза вазопрессина процесс регенерации протекает крайне неэффективно. Введение экзогенного гормона восстанавливало скорость регенерации печени до нормы [17]. Антагонисты V_{1A}-рецепторов снижали уровень синтеза ДНК в гепатоцитах и существенно замедляли восстановление массы печени. Пролиферативный эффект вазопрессина был выявлен в мелкоклеточной карциноме легких, экспрессирующей рецепторы вазопрессина. Как и в гепатоцитах, вазопрессин усиливал митотическую активность опухолевых клеток, действуя через V_{1А}-рецепторы [18]. Важные детали были установлены в опытах на культурах ооцитов китайского хомячка, трансфицированных экспрессирующимся V_{1А}-рецептором вазопрессина. Вазопрессин существенно увеличивал уровень включения ³[Н]тимидина. Стимулирующий эффект блокировался антагонистами V_{1A}-рецепторов, но не зависел от антагонистов V₂-рецепторов [19]. Было обнаружено, что вазопрессин активирует связывание рецептора с G_q-белком, мобилизацию внутриклеточного кальция, активацию протеинкиназы С и фосфорилирование белка p42/p44 (ERK1/2) -ключевого фермента каскада



Рис. 1. Рецепция вазопрессина и трансдукция гормонального сигнала. Рецепция вазопрессина AVP на V₂-рецептор инициирует присоединение GTP к гетеротримерному белку G_s и его диссоциацию на две части. Комплекс α_s -субъединица–GTP мигрирует к локализованной на мембране аденилатциклазе и стимулирует наработку сAMP. Повышение концентрации сAMP в цитоплазме активирует сAMP-зависимую протеинкиназу, катализирующую реакции фосфорилирования белковых субстратов, выполняющих конечные эффекторные функции, в частности это белки водных пор аквапорины AQP-2. Димер β - γ -субъединиц G_s-белка способен стимулировать активность фосфолипазы C (PLC*b*), но основной сигнальный каскад данного фермента связан с рецепторами V_{1A}-типа. Посадка гормона AVP на V_{1A} стимулирует образование комплекса Gq–GTP и диссоциацию β - γ -субъединиц. Комплекс α_q –GTP присоединяется к фосфолипазе C и активирует ферментативный гидролиз фосфатидилинозитол бифосфатов (PIP2) на диацилглицерин (DAG) и инозитол(1,4,5)-трифосфат (IP3). Взаимодействие IP3 с рецепторами инозитолтрифосфата (IP3R) открывает лиганд-зависимые кальциевые каналы в эндоплазматическом ретикулуме (ER) и вызывает повышение уровня Ca²⁺ в цитоплазме. Диацилглицерин является основным активатором мембранных кальциевых каналов trp, реагирующих на опустошение внутриклеточных кальциевых депо обратным захватом внеклеточного кальция. Рисунок адаптирован из статьи Birnbaumer [4].

митоген-активируемых протеинкиназ. Медленнее, но также достоверно возрастало фосфорилирование белков альтернативного сигнального пути фосфатидилинозитол-3-киназа – протеинкиназа В (АКТ) – рибосомальная p70-S6-киназа [20]. Киназа р70-S6 фосфорилирует рибосомальный белок S6 и индуцирует белковый синтез и пролиферацию клеток [21]. Аналогичная реакция на вазопрессин была продемонстрирована на первичных культурах мезангиальных клеток почки. При исследовании действия ингибиторов киназ стимулированная вазопрессином пролиферация гломерулярных мезангиальных клеток не останавливалась в случае раздельного использования селективных ингибиторов киназы ERK1/2 и фосфатидилинозитол-3-киназы, но блокировалась при их совместном использовании. Действие

вазопрессина распространялось одновременно на два сигнальных канала, активируя и каскад митоген-активируемых протеинкиназ, и фосфатидилинозитол-3-киназный путь [22].

Митогенное действие вазопрессина получило подтверждение в опытах на клетках кишечного эпителия, экспрессирующих нативные V_{1A} -рецепторы. Связывание вазопрессина с гормональным рецептором вызывало быстрое дозозависимое увеличение концентрации Ca²⁺ в цитоплазме и активацию протеинкиназ С и D. Анализ фосфорилируемых субстратов показал, что вазопрессин стимулировал фосфорилирование белков митоген-активируемого комплекса ERK1/2 и действовал как независимый ростовой фактор, индуцирующий синтез ДНК и клеточную пролиферацию. Вазопрессин стимулировал одновременно

деление и миграцию клеток [23]. Активированная вазопрессином протеинкиназа С фосфорилирует ERK1/2 на внутренней стороне клеточной мембраны. Комплекс ERK1/2 освобождается от ингибиторов и начинает фосфорилировать цитоплазматические сигнальные и эффекторные белки, в том числе р90-киназу рибосомального белка S6 (p90 ribosomal S6 kinase). Далее действие фермента переносится в околоядерное пространство, где он активирует факторы транскрипции генов, ответственных за пролиферацию и подвижность клеток [24, 25]. Сигнальные пути фосфатидилинозитол-3-киназа – протеинкиназа В и кальций-зависимая протеинкиназа С – киназа ERK1/2 пересекаются на уровне фосфорилирования рибосомального белка S6, выступающего общим субстратом для МАРК-независимой киназы р70 и МАРК-активируемой киназы р90. Механизм взаимодействия киназ в отдельных типах клеток влияет на набор синтезируемых структурных белков и транскрипционных факторов [26]. Показано, что пролиферативный эффект вазопрессина в мелкоклеточной карциноме легких связан с усилением фосфорилирования киназы ERK1/2 и рибосомальной p90-S6-киназы [27]. Установлена прямая корреляция между экспрессией V_{1А}-рецепторов вазопрессина и агрессивностью опухоли. В агрессивных андроген-независимых опухолях простаты происходит многократное увеличение уровня экспрессии гена V_{1А}-рецептора и активация ферментов киназного комплекса ERK [28]. Синтетические аналоги вазопрессина, блокирующие V_{1А}-рецепторы, восстанавливают чувствительность этопозид-резистентной мелкоклеточной карциномы легких к действию противоопухолевого препарата [29]. В отсутствие вазопрессина в крови угнетается рост опухолевой ткани и изменяется спектр белков протеасом [30].

Антагонисты V_{1A}-рецептора вазопрессина оказывают антипролиферативные эффекты и широко используются в онкологической практике. Наиболее часто для этой цели применяют синтетический препарат SR 49059 с коммерческим названием релковаптан [31]. Релковаптан блокирует фосфорилирование ERK1/2 и пролиферацию опухолей молочной железы [32]. В присутствии релковаптана ингибируется стимулированный вазопрессином злокачественный рост опухолей простаты [33]. Использование других синтетических аналогов вазопрессина неожиданно выявило обратный феномен, связанный с пролиферацией опухолей. Клиническое применение DDAVP, специфического агониста V2-рецептора, угнетало рост опухолей толстого кишечника и молочной железы [34, 35]. Следующий препарат этой серии [V4Q5]dDAVP обладал еще более выраженными антипролиферативными свойствами и оказался эффективен в лечении опухолей легких, простаты

и прямой кишки [14, 16]. Эксперименты с агонистами V₂-рецепторов вазопрессина продемонстрировали двойственность действия вазопрессина по отношению к пролиферации клеток. В дополнение к V_{1А}-рецепторным механизмам, активирующим пролиферацию, существуют V₂-рецептор-зависимые антипролиферативные эффекты. V_{1А}-рецепторы распространены шире и обладают более высоким сродством к вазопрессину, вступая первыми в реакцию взаимодействия с гормоном [19, 36]. Вследствие таких тканеспецифичных особенностей экспрессии и кинетики V_{1A}- и V₂-рецепторов преимущественно проявляется стимулирующая роль вазопрессина. Ингибирующие процессы, связанные с V₂-рецепторами, способны корректировать направление и амплитуду пролиферативной активности, но остаются в целом менее исследованными и требуют дальнейшего анализа [37].

Кровеносные сосуды – структуры, в равной мере экспрессирующие оба типа рецепторов вазопрессина [7]. Особенность пролиферативных процессов, сопровождающих ангиогенез, - интеграция сигнальных путей различных ростовых факторов, регулирующих митотическую активность. Образование новых кровеносных сосудов происходит при тесном контакте эндотелиальных и гладкомышечных клеток [38]. Миоциты экспрессируют V_{1А}-рецепторы вазопрессина. Рост миоцитов коррелирует с активностью протеинкиназы В и фосфорилированием р70-киназы рибосомального белка S6, представляющих центральное звено в молекулярном механизме V_{1A}-рецепторов [21]. Для эндотелиоцитов главный инициирующий сигнал — действие васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF) на рецепторы VEGFR-1 и VEGFR-2, экспрессирующиеся преимущественно в эндотелиальных клетках [39, 40]. Экспрессия ростового фактора VEGF в различной степени стимулируется в большинстве тканей, находящихся в условиях гипоксии [41-43]. Усиление экспрессии VEGF наблюдается в прогрессирующих солидных опухолях [44]. Важную роль играют клетки крови, секретирующие VEGF [45]. Тромбоциты – основные источники VEGF на начальной стадии пролиферации эндотелия. Синтезированный VEGF депонируется в составе альфа-гранул и высвобождается при активации тромбоцитов [46]. Тромбоциты экспрессируют V_{1А}-рецепторы вазопрессина и реагируют на гормон экзоцитозом альфа-гранул и секрецией VEGF.

VEGF секретируется в форме гомодимера. Регуляция функции эндотелия преимущественно связана с VEGFR-2-рецепторами [47]. Связывание димера VEGF с рецептором VEGFR-2 способствует димеризации рецепторного комплекса и инициации реципрокной тирозинкиназной активности между гомологами внутри рецепторного димера. Присутствующий в молекуле VEGFR-2 фосфорилируемый тирозин в позиции 1175 образует в прилегающем аминокислотном мотиве сайт для посадки белков, экспрессирующих SH2домен (Src Homology 2). Фосфолипаза С относится к SH2-домен-содержащим белкам и непосредственно взаимодействует с аутофосфорилированным димером VEGFR-2, запуская сигнальный механизм протеинкиназа С – митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК) и инициацию синтеза ДНК. В эндотелиоцитах экспрессируется еще один SH2-домен-содержащий белок – SHB (SH2 domain-containing protein binding adapter B), выполняющий функцию адаптера между рецептором VEGFR-2 и фосфатидилинозитол-3-киназой. SH2-домен белка SHB располагается на С-конце молекулы, а *N*-конец содержит последовательность, богатую пролином и служащую для связи с SH3-домен-содержащими белками, в том числе с фосфатидилинозитол-3-киназой [48]. Активация сигнального пути фосфатидилинозитол-3-киназа протеинкиназа В с участием адаптерного белка SHВ развивается медленнее киназного каскада протеинкиназа С – МАРК, но приводит к дальнейшему росту эндотелиальных клеток и их миграции [49]. VEGFR-2 регулирует пролиферацию и миграцию эндотелиоцитов. Рецепторы VEGFR-1 не обладают собственной тирозинкиназной активностью и оказывают только модулирующие эффекты за счет конкурентного связывания с VEGF при совместной экспрессии с VEGFR-2 [50]. В онкологической практике пролиферативная функция VEGF подавляется использованием золедроновой кислоты, селективного ингибитора экспрессии VEGFR-2, и антителами бевацизумаб [51].

СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО БЕЛКА РЕСАМ-1

Важный структурный и сигнальный белок, участвующий в ангиогенезе, - PECAM-1 (platelet/endothelial cell adhesion molecule-1), экспрессирующийся в эндотелиоцитах. РЕСАМ-1 регулирует активность VEGFR-2-рецепторов. Антитела к белку полностью блокируют стимулирующее действие васкулоэндотелиального фактора роста, цитокина IL-8 и ангиогенина на ангиогенез [52]. Белок относится к трансмембранным гликопептидам и состоит из внеклеточной *N*-концевой регуляторной последовательности, содержащей шесть иммуноглобулин-подобных доменов, и протяженного цитоплазматического С-конца [53]. РЕСАМ-1 экспрессируется в области межклеточных контактов вместе с клаудином, окклюдином, соединительным белком JAM (Junctional adhesion molecule) и VE-кадгерином (Vascular endothelial cadherin). Все эти белки обладают адгезивными свойствами и способны собираться в межклеточные гомофильные димеры, фиксирующие на разных уровнях связь между эндотелиоцитами [54, 55]. Наиболее крупный белок PECAM-1 образует длинный связующий димер, обладающий гибкой конформацией и функционирующий также как механосенсор, реагирующий на физическое напряжение в эндотелии [56, 57]. Показано, что давление на стенки кровеносных сосудов, оказываемое током крови, влияет на характер пролиферативных процессов в эндотелии [58, 59]. Сигнальная функция PECAM-1 реализуется с участием сайтов ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif), локализованных в цитоплазматическом сегменте молекулы (рис. 2).

У мономеров РЕСАМ-1 в релаксированном состоянии на поверхности одиночных клеток преобладают дефосфорилированные тирозиновые сайты ITIM. При адгезии клеток происходит димеризация РЕСАМ-1 и создаются условия для возникновения механосенсорного эффекта и перехода тирозинов ITIM в фосфорилированную форму [53]. Сигнальный механизм имеет следующую структуру. Механосенсорное напряжение в связующем межклеточном димере РЕСАМ-1 изменяет конформацию всей молекулы и экспонирует скрытые фосфорилируемые сайты в цитоплазматической части белка. Протеинкиназа С фосфорилирует Ser-702 и инициирует выход Туг-686 из ассоциированного с мембраной состояния, облегчая доступ для тирозинкиназ [60]. Туг-686 и Туг-663 — высококонсервативные аминокислоты у млекопитающих. Фосфорилированные Tyr-686 и Tyr-663 входят в состав регуляторных мотивов ITIM и образуют спаренный активный сайт для посадки SH2-домен-содержащих белков. Важнейшими белками, мобилизуемыми сайтами ITIM, выступают фосфатазы SHP-1 и SHP-2 (SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatases) [61]. При агрегации и переключении SH2-домена на ITIM снимается аутоингибирующий эффект SH2-домена с внутреннего протеин-тирозинфосфатазного домена, и тирозинфосфатаза переходит в каталитически активное состояние [62]. Тирозинфосфатазы совместно с тирозинкиназами регулируют кинетику фосфорилирования сигнальных молекул. SHP-1 определяется преимущественно в клетках крови и, в отличие от SHP-2, слабо представлена в эндотелии [63]. Экспрессирующаяся в эндотелиоцитах фосфатаза SHP-2 играет ключевую роль в сигнальной функции РЕСАМ-1. Активированная фосфатаза SHP-2 дефосфорилирует фосфотирозины рецепторных тирозинкиназ (RTK) и прерывает внутриклеточную трансдукцию сигнала [64, 65]. Рецепторные тирозинкиназы составляют основной пул рецепторов ростовых факторов. Ингибирующий эффект РЕСАМ-1, реализуемый через ингибиторные мотивы ITIM, распространяется на рецепторы ростовых факторов, в том числе на



Рис. 2. Структура тромбоцитарно-эндотелиального адгезивного белка PECAM-1. Внеклеточный сегмент содержит шесть иммуноглобулин-подобных доменов, два из которых ответственны за гомофильное связывание с другой молекулой PECAM-1 при образовании межклеточного связующего димера. В цитоплазматическом сегменте выделяются два ассоциированных с мембраной липофильных региона, разделенных гидрофильной петлей. Фосфорилируемые Туг-663 и Туг-686 входят в состав регуляторных сайтов ITIM, взаимодействующих с SH2-домен-содержащими белками. Рисунок адаптирован из статьи Lertkiatmongkol et al. [57].

VEGFR-2. Сигнальная функция PECAM-1 – важное звено в тонкой регуляции ангиогенеза [66].

В ангиогенезе условно можно выделить несколько составляющих процессов: индукцию пролиферации эндотелиоцитов, миграцию клеток во взаимодействии с интерстицием, адгезию и сборку в конечные васкулярные образования. Функция PECAM-1 заключается в своевременном ингибировании стимулирующих эффектов ростовых факторов и переключении клеток на миграцию и взаимодействие с окружающим интерстицием [67]. Показано, что в мигрирующих эндотелиоцитах существенно возрастает концентрация PECAM-1 в тритон-нерастворимой фрак-

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 47 № 4 2021

ции цитоскелета, и две трети молекул PECAM-1 находятся в ассоциированном состоянии с фибриллярным актином. Ассоциация PECAM-1 с актином происходит независимо от VE-кадгерина и реализуется через прямое взаимодействие со скаффолд-белком β-катенином. Повышенный уровень PECAM-1 рекрутирует и фиксирует молекулы β-катенина в области межклеточных контактов, предотвращая их транспорт в ядро и сигнальную функцию. PECAM-1 функционирует как акцепторный белок и через активность SHP-2-фосфатазы регулирует фосфорилированиеβ-катенина при сборке и реорганизации актиновых филаментов в мигрирующих клетках [53, 60]. Предполагается, что концентрация адгезивных комплексов PECAM-1 и VE-кадгерина с β-катенином возрастает на стадии образования эндотелиоцитами многоклеточных структур [68, 69].

РОЛЬ ИНТЕГРИНА αVβ3 В ПРОЛИФЕРАЦИИ И МИГРАЦИИ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ

Формирование нового эндотелия тесно связано с реорганизацией соединительной ткани. Взаимодействие клеток с интерстицием осуществляется при участии интегринов. Интегрины относятся к трансмембранным рецепторным гликопротеинам с высоким сродством к белковым лигандам в составе интерстиция. Интегрины имеют структуру облигатных гетеродимеров, состоящих из α-субъединицы, ответственной за связывание с лигандом, и β-субъединицы, осуществляющей связь с цитоскелетом. В эндотелиоцитах экспрессируется интегрин αVβ3. Ангиогенез сопровождается резким усилением экспрессии интегрина αVβ3 [70]. Для образования связи с лигандами необходима активация интегринов. Интегрин αVβ3 активируется прямым цис-взаимодействием с РЕСАМ-1 на мембране клетки [71]. У мономеров РЕСАМ-1 отсутствует способность активировать интегрины, эта функция появляется только после образования димеров РЕСАМ-1 между эндотелиоцитами [72]. Активированные интегрины αVβ3 связываются с белками, содержащими в своем составе аминокислотный триплет аргинин-глицин-аспарагиновая кислота (RGD), в частности с коллагеном и ламинином [73, 74]. Коллаген и ламинин составляют основную массу белков в фибриллярной фракции базальной мембраны, служащей субстратом для мигрирующих клеток [75, 76].

Связывание интегрина аVB3 с белками базальной мембраны запускает процесс адгезии эндотелиоцитов и образования трехмерного эндотелия [77]. На этой стадии важную функцию выполняет лиганд интегринов αVβ3 – секретируемый эндотелиоцитами фактор фон Виллебранда. Домены фактора фон Виллебранда содержат аминокислотный триплет RGD, необходимый для распознавания интегринами [78]. Эндотелиоциты перманентно синтезируют и секретируют на базальном уровне олигомеры фактора фон Виллебранда, участвующие в агрегации тромбоцитов [79]. Первичные гликозилированные димеры фактора фон Виллебранда формируются в эндоплазматическом ретикулуме за счет образования межцепочечных цистеиновых дисульфидных мостиков. Большая часть белков далее собирается в более крупные мультимерные комплексы, включающие десятки копий мономеров, компактизуется и депонируется в составе телец Вейбеля-Паладе. Компактизация осуществляется в несколько этапов. Сначала отдельные димеры соединяются в области N-концов и образуют плоскую структуру с центром из объединившихся *N*-концевых гликозилированных доменов и расходящимися от него в виде лучей *С*-концами. Аналогичная сборка происходит в параллельных плоскостях. Между соприкасающимися лучами по вертикали возникают новые сшивающие дисульфидные связи. Процесс распространяется вверх и вниз по оси, проходящей через центры из объединенных *N*-концевых доменов, и напоминает складывание монетных столбиков. Слияние планарных слоев происходит со сдвигом вокруг оси, и в итоге формируется спиралевидная трубчатая мегамолекула [80].

Секреция ультравысокомолекулярного фактора фон Виллебранда в составе телец Вейбеля-Паладе регулируется агонистами мембранных рецепторов и зависит от физиологического состояния эндотелия [81]. В стабильных условиях фактор фон Виллебранда выполняет преимущественно функцию поддержания гемостаза. При механическом повреждении эндотелия либо онкологии фактор фон Виллебранда переключается на пролиферативные процессы. Молекулы фактора фон Виллебранда прикрепляют тромбоциты к эндотелию. Активированные тромбоциты и эндотелиоциты секретируют VEGF и другие ростовые факторы, вызывая хемотаксис и пролиферацию гладкомышечных клеток и клеточных элементов соединительной ткани. Мультимерные комплексы фактора фон Виллебранда участвуют в кооперации между эндотелием и интерстицием при локальной реорганизации сосудистой сети. В составе фактора фон Виллебранда аннотированы домены агрегации с коллагеном и гликопротеином GPIb тромбоцитов и несколько мотивов для связи с интегрином $\alpha V\beta 3$ [82]. Взаимодействие фактора фон Виллебранда с интегрином сVB3 фиксирует эндотелиоциты на базальной мембране и создает условия для образования новых связей с другими лигандами [83]. Активированные интегрины аVB3 способны физически взаимодействовать с VEGFR-2-рецепторами и модулировать стимуляцию ангиогенных эффектов [84]. Внеклеточный домен субъединицы αV непосредственно контактирует с VEGFR-2-рецептором. Стимулированная VEGF пролиферация и миграция эндотелиоцитов реализуется только при условии адгезии клетки на базальной мембране и совместной локализации рецепторов VEGFR-2 с активированными интегринами αVβ3 [85]. В зависимости от локальной концентрации различных лигандов, интегрины αVβ3 опосредуют разные стадии ангиогенеза, чередуя фазы активной пролиферации с паузами в делении клеток [86]. Кооперация между лигандами интегрина αVβ3 и рецепторами VEGFR-2 имеет важное значение для всего процесса васкулогенеза [87]. Показано, что ингибирование экспрессии фактора фон Виллебранда малыми интерферирующими РНК (siRNA) снижает количество интегринов αVB3 на мембране эндотелиоцитов и дестабилизирует ка-

Гликопротеин	Локализация	Функция	Взаимодействие	Ссылка
V _{1A}	Миоцит	Вазоконстрикция, митоз	Gq	[4]
	Тромбоцит	Секреция VEGF	Gq	[46]
PECAM-1	Эндотелиоцит	Ингибирование VEGFR-2	SHP-2	[61]
		Адгезия, миграция	β-Катенин	[60]
		Активация интегрина αVβ3	Фактор фон Виллебранда	[79]
	Тромбоцит	Адгезия	Фактор фон Виллебранда	[79]
αVβ3	Эндотелиоцит	Активация миграции	PECAM-1	[70, 71]
		Адгезия	Коллаген, ламинин	[74]
			Фактор фон Виллебранда	[79]
		Модуляция VEGF	VEGFR-2	[84]
Фактор фон	Эндотелиоцит	Прикрепление тромбоцитов	GPIb	[82]
Виллебранда		Агрегация эндотелиоцитов	Коллаген	[82]
		Связывание интегрина αVβ3	Сайт RGD	[78, 79]
V ₂	Эндотелиоцит	Секреция фактора фон Виллебранда	G _s , AKAP	[11, 89]
		Пролиферация	G _s , Epac	[95, 96]

Таблица 1. Белок-белковые взаимодействия в микроокружении кровеносных сосудов

пиллярную сеть, вызывая дисплазию кровеносных сосудов [88].

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ВАЗОПРЕССИНА В ЭНДОТЕЛИИ

Вазопрессин относится к гормональным регуляторам функционального состояния эндотелия. Эндотелиоциты экспрессируют полноразмерные V₂-рецепторы вазопрессина, участвующие в активации секреции фактора фон Виллебранда [11. 89]. Рецепция вазопрессина запускает в эндотелиоцитах сигнальные механизмы, опосредованные сАМР. Регулируемый вазопрессином экзоцитоз телец Вейбеля-Паладе реализуется при участии белка AKAP (A kinase anchoring protein) и цитоплазматических GTPаз семейства Rab [80, 90]. Зрелые тельца Вейбеля-Паладе находятся в состоянии адгезии с актиновыми филаментами цитоскелета совместно с комплексом GTPa3 Rab3, Rab27a, Rab35 и ряда других ферментов и белков. Адаптерный белок АКАР фиксирует на комплексе органелл протеинкиназу А. Вазопрессин инициирует сАМР-зависимую активацию каталитических субъединиц протеинкиназы А и фосфорилирование GTРазы Rab27a. Фосфорилирование Rab27a активирует мобилизацию транспортных и моторных белков цитоскелета, осуществляющих экзоцитоз прикрепленных органелл [91, 92]. Секретируемый в составе телец Вейбеля-Паладе фактор фон Виллебранда взаимодействует на внешней стороне мембраны с интегринами αVβ3 и аккумулирует синергическое действие на рецептор VEGFR-2 васкулоэндотелиального фактора роста. Участие фактора фон Виллебранда в ангиогенезе формирует локальное микроокружение, необходимое для нормального процесса созревания сети кровеносных капилляров [83]. Ключевые мембранные гликопротеины, участвующие в данном процессе совместно с фактором фон Виллебранда, представлены в табл. 1.

Действие V₂-рецепторов вазопрессина не ограничено регуляцией секреторной функции эндотелия. Сушествуют как минимум два сАМР-зависимых механизма прямого пути реализации пролиферативных эффектов вазопрессина (рис. 3). В геноме зафиксировано ~4000 сайтов CRE (cAMP response element), локализованных в промоторных областях генов. Большинство из них метилированы и находятся в неактивном состоянии [93]. Рецепция вазопрессина инициирует сАМР-зависимую диссоциацию регуляторных субъединиц протеинкиназы А, транспорт каталитических субъединиц в ядро и фосфорилирование транскрипционного фактора CREB (сАМР response element-binding protein). Связывание **CREB с CRE** зависит от метилированного статуса ДНК, уровня экспрессии самого CREB и уровня киназной активности протеинкиназы А. Показано, что повышение концентрации фосфорилированного CREB коррелирует с интенсивностью пролиферации опухолевых клеток [94].

сАМР-зависимый механизм пролиферации также может быть реализован без участия протеинкиназы А. Молекула сАМР способна непосредственно взаимодействовать с белком Ерас (Exchange factor activated by сАМР), выполняющим функцию сАМР-регулируемого гуанинтранслоцирующего фактора для малых GTPa3 семейства Rap [95, 96]. В *N*-концевой части Ерас расположены два сАМР-связывающих домена, стерически перекрывающих и аутоингибирую-

щих каталитический домен на С-конце в отсутствие сАМР. Связывание сАМР изменяет конформацию Ерас и открывает каталитический домен для реакции с GTPазой Rap1 (Ras-proximate related protein 1) [97, 98]. Rap1, связанный с GDP, неактивен. Каталитический домен Ерас меняет GDP на GTP и переводит Rap1 в активное состояние [99]. Активированная GTPаза Rap1 взаимодействует с эффекторными белками, имеющими в своем составе RA/RBD-домен (Ras-associating/Ras-binding domain), и до момента собственной аутоинактивации вследствие гидролиза GTP опосредует дальнейшую трансдукцию сигнала [100]. Протеинкиназа B-Raf – один из эффекторных белков GTPазы Rap1 [101, 102]. Регуляторный домен протеинкиназы B-Raf содержит субдомен RBD (Ras-binding domain). В отсутствие функционально активной GTPазы Rap1 регуляторный домен протеинкиназы аутоингибирует каталитическую активность. Взаимодействие субдомена RBD с активированной GTPазой Rap1 снимает аутоингибирующий эффект и переключает B-Raf на фосфорилирование MEK (Mitogenactivated protein kinase kinase). Аналогичным образом на MEK действует протеинкиназа Raf-1. Оба фермента обладают серин/треониновой субстратной специфичностью [103]. Фосфорилирование Ser-218 и Ser-222 активирует собственную киназную активность МЕК [104]. Протеинкиназа МЕК фосфорилирует треонины и тирозины в составе ключевой митоген-активируемой киназы МАРК1,2, фосфорилирующей широкий спектр эффекторных белков, ферментов и транскрипционых факторов, участвующих в пролиферации и миграции клеток [24, 105]. Фосфорилирование МАРК1,2 инициирует диссоциацию аутоингибирующего дуплекса МАРК1,2/р90-киназа рибосомального белка S6 и переводит обе киназы в активное состояние [106]. Протеинкиназа МАРК1,2 интегрирует разнообразные внеклеточные сигналы и переносит их действие в ядро. Трансляция в ядро осуществляется через киназу Mnk1 (MAP kinase-interacting kinase 1) [107]. Киназа Mnk1 фосфорилирует транскрипционный фактор CREB, участвующий в активации экспрессии сАМР-зависимых генов. Аналогично действию протеинкиназы А, фосфорилируется Ser-133 в домене KID (Kinase-inducible domain). Фосфорилирование CREB необходимо для взаимодействия транскрипционного фактора с ДНК [108]. Показано, что пролиферация эндотелиальных звездчатых клеток печени и холангиоцитов зависит от уровня фосфорилирования СREB [109]. Внутриядерный сигнальный механизм CREB распространяется на экспрессию гена циклина D1 в эпителиальных клетках млекопитающих и интегрирует митогенный сигнальный каскад с клеточным циклом [110]. Циклин D1 регулирует активность циклинзависимых киназ CDK4 и CDK6. Гомологичные



Рис. 3. Белки и ферменты, вовлеченные в пролиферативные эффекты V₂-рецептора вазопрессина. G α_s и G $\beta\gamma$ – субъединицы α_s и $\beta\gamma$ белка G_s; AC – аденилатциклаза; PDE – фосфодиэстераза; сAMP – циклический аденозинмонофосфат; PKA – протеинкиназа A; Epac – фактор, активируемый сAMP; Rap1 – GTPаза Rap1; B-Raf – протеинкиназа B-Raf; Raf1 – протеинкиназа Raf1; MEK – киназа митоген-активируемой протеинкиназы [MAPK1,2 – митоген-активируемая протеинкиназа 1,2; CREB – сAMP-чувствительный транскрипционный фактор.

киназы CDK4 и CDK6 акцептируют циклин D1 и фосфорилируют белок Rb (Retinoblastoma protein), контролирующий переход клеток в S-фазу митоза [111].

Очевидно, что реализация пролиферативных эффектов вазопрессина связана с локализацией, распознаванием и взаимодействием сигнальных молекул и ферментов. Изменение данных параметров — одна из причин малигнизации тканей. В то же время химическая модификация кинетических характеристик белок-белкового взаимодействия — одна из ключевых стратегий антионкогенной терапии. Химические соединения, конкурирующие с сигнальными лигандами, рассматриваются как перспективные противоопухолевые препараты. Примерно треть всех новообразований связана с сигнальной системой суперсемейства GTPa3 Ras. Соединения, обладающие свойствами бифармакофорных реагентов, способны ингибировать онкогены Ras [112]. Также показано, что использование химических реагентов, атакующих нуклеофильные атомы азота или серы, приводит к образованию гетероциклических систем, проявляющих противоопухолевую активность. Исследованные синтезированные производные пиразолилоксазолонов и пиразолдигидротриазинонов входят в список перспективных онколитических агентов [113].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пролиферативные эффекты вазопрессина не относятся к перманентным свойствам гормона. Основной физиологический стимул для секреции вазопрессина - снижение концентрации осмотически активных веществ в плазме крови. Нейрорефлекторная секреция вазопрессина в первую очередь обеспечивает быструю коррекцию водно-электролитного баланса [1]. Болевые ощущения, возникающие при травмах и росте опухоли, дополнительно повышают уровень секреции вазопрессина в кровь [114]. После достижения определенного порога афферентной стимуляции начинает проявляться вазоконстрикторное действие вазопрессина на тонус кровеносных сосудов, оказывающее влияние на механосенсорные свойства эндотелия. При продолжительных патологических состояниях, сопровождающихся локальной реструктуризацией тканей, происходит включение вазопрессина в регуляцию пролиферативных процессов и ангиогенез.

Пролиферативные эффекты реализуются через вазопрессиновые рецепторы V_{1A}- и V₂-типов. В гладкомышечных клетках кровеносных сосудов осуществляется прямое пролиферативное действие V_{1А}-рецепторов вазопрессина. В тромбоцитах V_{1А}-рецепторы участвуют в активации секреции VEGF. Взаимодействие между рецепторами и мембранными гликопротеинами обеспечивает цикличность пролиферации и синхронность в делении, миграции и адгезии клеток. Вазоконстрикторный эффект V_{1A}-рецепторов транслируется на механосенсорные димеры РЕСАМ-1, локализованные в эндотелии. Цитоплазматический отдел РЕСАМ-1 активирует тирозинфосфатазу SHP-2. Фосфатаза SHP-2 инактивирует тирозинкиназные рецепторы VEGFR-2. РЕСАМ-1 и SHP-2-фосфатаза регулируют фосфорилирование и внутриклеточную локализацию β-катенина в процессе реорганизации актиновых филаментов [60]. РЕСАМ-1 участвует в переключении клеточного деления на миграцию и взаимодействие с окружающим интерстицием [67]. Димеры РЕСАМ-1 активируют интегрины αVβ3 [71].

Интегрины осуществляют контакт эндотелиоцитов с фибриллярными белками соединительной ткани. Рецепторная субъединица интегрина αVβ3 физически контактирует с VEGFR-2. Интегрины αVβ3 могут стимулировать либо ингибировать VEGFR-2 в зависимости от состава лигандов микроокружения [86]. Лигандное взаимодействие с фактором фон Виллебранда стабилизирует экспрессию интегринов αVβ3 на клеточной мембране [88]. V₂-рецепторы регулируют секрецию фактора фон Виллебранда в эндотелиоцитах. Макромолекулярные мультимеры фактора фон Виллебранда выполняют функцию скаффолда, связывающего рецепторные и адгезивные гликопептиды в функциональные комплексы, контролирующие агрегацию и фиксацию клеток.

Цикличные изменения в составе взаимодействующих белков определяют скорость фазовых переходов и направление миграционных процессов при формировании кровеносных сосудов. Пролиферативные эффекты вазопрессина модулируют и синхронизируют в эндотелии отдельные стадии ангиогенеза, инициированного васкулоэндотелиальным фактором роста. В отсутствие вазопрессина происходит остановка роста трансплантированных перевиваемых опухолей [115]. Регрессия опухолевой ткани сопровождается изменением структуры соединительнотканных белков [116]. Можно предположить, что фармакологическое или генетическое выключение вазопрессина существенно изменяет локальную динамику ангиогенеза.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке бюджетного проекта Института цитологии и генетики СО РАН № 0259-2021-0014.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Acher R., Chauvet J. // Front. Neuroendocrinol. 1995.
 V. 16. P. 237–289. https://doi.org/10.1006/frne.1995.1009
- Wallis M. // Gen. Comp. Endocrinol. 2012. V. 179. P. 313–318.
 - https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.07.030
- 3. Juul K.V., Bichet D.G., Nielsen S., Nørgaard J.P. // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 2014. V. 306. P. F931– F940.
 - https://doi.org/10.1152/ajprenal.00604.2013
- 4. Birnbaumer M. // Trends Endocrinol. Metab. 2000.
 V. 11. P. 406–410. https://doi.org/10.1016/s1043-2760(00)00304-0
- Fagerberg L., Hallström B.M., Oksvold P., Kampf C., Djureinovic D., Odeberg J., Habuka M., Tahmasebpoor S., Danielsson A., Edlund K., Asplund A., Sjöstedt E., Lundberg E., Szigyarto C.A., Skogs M., Takanen J.O., Berling H., Tegel H., Mulder J., Nilsson P., Schwenk J.M., Lindskog C., Danielsson F., Mardinoglu A., Sivertsson A., von Feilitzen K., Forsberg M., Zwahlen M., Olsson I., Navani S., Huss M., Nielsen J., Ponten F., Uhlén M. // Mol. Cell. Proteomics. 2014. V. 13. P. 397–406. https://doi.org/10.1074/mcp.M113.035600
- Phillips P.A., Abrahams J.M., Kelly J.M., Mooser V., Trinder D., Johnston C.I. // Endocrinol. 1990. V. 126. P. 1478–1484. https://doi.org/10.1210/endo-126-3-1478
- Holmes C.L., Landry D.W., Granton J.T. // Crit. Care. 2003. V. 7. P. 427–434. https://doi.org/10.1186/cc2337
- Koshimizu T.A., Nakamura K., Egashira N., Hiroyama M., Nonoguchi H., Tanoue A. // Physiol. Rev. 2012. V. 92. P. 1813–1864. https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2011
- 9. Garcia-Martinez A., Sottile J., Fajardo C., Riesgo P., Camara R., Simal J.A., Lamas C., Sandoval H., Aranda I., Pico A. // PLoS One. 2018. V. 13. P. e0198877. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198877
- Greenberg A., Verbalis J.G. // Kidney Int. 2006. V. 69. P. 2124–2130. https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000432
- Kaufmann J.E., Oksche A., Wollheim C.B., Gunther G., Rosenthal W., Vischer U.M. // J. Clin. Invest. 2000. V. 106. P. 107–116. https://doi.org/10.1172/JCI9516
- 12. Péqueux C., Breton C., Hagelstein M., Geenen V., Legros J. // Lung Canc. 2005. V. 50. P. 177–188. https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2005.05.027
- Iannucci N.B., Ripoll G.V., Garona J., Cascone O., Ciccia G.N., Gomez D.E., Alonso D.F. // Future Med. Chem. 2011. V. 3. P. 1987–1993. https://doi.org/10.4155/fmc.11.152
- 14. Pifano M., Garona J., Capobianco C.S., Gonzalez N., Alonso D.F., Ripoll G.V. // Front Oncol. 2017. V. 7. P. 11. https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00011
- Noh J.M., Park W., Huh S.J., Cho E.Y., Choi Y., Lee J.H., Bae D.S. // J. Gynecol. Oncol. 2009. V. 20. P. 215–220. https://doi.org/10.3802/jgo.2009.20.4.215

- 16. Garona J., Sobol N.T., Pifano M., Segatori V.I., Gomez D.E., Ripoll G.V., Alonso D.F. // Canc. Res. Treat. 2019. V. 51. P. 438–450. https://doi.org/10.4143/crt.2018.040
- Russell W.E., Bucher N.L. // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. 1983. V. 245. P. G321–G324. https://doi.org/10.1152/ajpgi.1983.245.2.G321
- North W.G., Fay M.J., Longo K.A., Du J. // Canc. Res. 1998. V. 58. P. 1866–1871.
- Thibonnier M., Plesnicher C.L., Berrada K., Berti-Mattera L. // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2001. V. 281. P. E81–E92. https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.281.1.E81
- Thibonnier M., Conarty D.M., Plesnicher C.L. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2000. V. 279. P. H2529–H2539. https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.279.5.H2529
- Van Dyke J.M., Bain J.L., Riley D.A. // Muscle Nerve. 2014. V. 49. P. 98–107. https://doi.org/10.1002/mus.23880
- 22. Ghosh P.M., Mikhailova M., Bedolla R., Kreisberg J.I. // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 2001. V. 280. P. F972– F979. https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.280.6.F972
- Chiu T., Wu S.S., Santiskulvong C., Tangkijvanich P., Yee H.F., Razengurt E. // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2002. V. 282. P. C434–C450. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00240.2001
- 24. *Mendoza M.C., Er E.E., Blenis J.* // Trends Biochem. Sci. 2011. V. 36. P. 320–328. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.03.006
- Yang S.H., Sharrocks A.D., Whitmarsh A.J. // Gene. 2013. V. 513. P. 1–13. https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.10.033
- 26. Abe Y., Yoon S.O., Kubota K., Mendoza M.C., Gygi S.P., Blenis J. // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. P. 14939– 14948. https://doi.org/10.1074/jbc.M900097200
- Péqueux C., Keegan B.P., Hagelstein M.T., Geenen V., Legros J.J., North W.G. // Endocr. Relat. Canc. 2004.
 V. 11. P. 871–885. https://doi.org/10.1677/erc.1.00803
- Zhao N., Peacock S.O., Lo C.H., Heidman L.M., Rice M.A., Fahrenholtz C.D., Greene A.M., Magani F., Copello V.A., Martinez M.J., Zhang Y., Daaka Y., Lynch C.C., Burnstein K.L. // Sci. Transl. Med. 2019. V. 11. P. eaaw4636. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw4636
- MacKinnon A.C., Tufail-Hanif U., Wheatley M., Rossi A.G., Haslett C., Seckl M., Sethi T. // Br. J. Pharmacol. 2009. V. 156. P. 36–47. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2008.00003.x
- Sharova N.P., Melnikova V.I., Khegai I.I., Karpova Y.D., Dmitrieva S.V., Astakhova T.M., Afanaseva M.A., Popova N.A., Ivanova L.N., Zakharova L.A. // Dokl. Biochem. Biophys. 2008. V. 419. P. 93–97. https://doi.org/10.1134/S1607672908020129
- Steinwall M., Bossmar T., Brouard R., Laudanski T., Olofsson P., Urban R., Wolff K., Le-Fur G., Akerlund M. // Gynecol. Endocrinol. 2005. V. 20. P. 104–109. https://doi.org/10.1080/09513590400021144

482

- 32. Keegan B.P., Akerman B.L., Péqueux C., North W.G. // Breast. Canc. Res. Treat. 2006. V. 95. P. 265–277. https://doi.org/10.1007/s10549-005-9024-8
- 33. Zhao N., Peacock S.O., Lo C.H., Heidman L.M., Rice M.A., Fahrenholtz C.D., Greene A.M., Magani F, Copello V.A., Martinez M.J., Zhang Y., Daaka Y., Lynch C.C., Burnstein K.L. // Sci. Transl. Med. 2019. V. 11. P. eaaw4636. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw4636
- 34. *Ripoll G.V., Garona J., Hermo G.A., Gomez D.E., Alonso D.F.* // Anticanc. Res. 2010. V. 30. P. 5049–5054.
- 35. Ripoll G.V., Garona J., Pifano M., Farina H.G., Gomez D.E., Alonso D.F. // Breast. Canc. Res. Treat. 2013. V. 142. P. 9–18. https://doi.org/10.1007/s10549-013-2724-6
- Tahara A., Saito M., Sugimoto T., Tomura Y., Wada K., Kusayama T., Tsukada J., Ishii N., Yatsu T., Uchida W., Tanaka A. // Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol. 1998. V. 357. P. 63–69. https://doi.org/10.1007/p100005139
- Ripoll G.V., Pifano M., Garona J., Alonso D.F. // Front. Oncol. 2020. V. 9. P. 1490. https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01490
- 38. Carmeliet P. // Nat. Med. 2000. V. 6. P. 389–395. https://doi.org/10.1038/74651
- Ferrara N. // Kidney Int. 1999. V. 56. P. 794–814. https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.00610.x
- 40. Apte R.S., Chen D.S., Napoleone Ferrara N. // Cell. 2019. V. 176. P. 1248–1264. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.021
- Liu E., Morimoto M., Kitajima S., Koike T., Yu Y., Shiiki H., Nagata M., Watanabe T., Fan J. // J. Am. Soci. Nephrol. 2007. V. 18. P. 2094–2104. https://doi.org/10.1681/ASN.2006010075
- Okabe K., Kobayashi S., Yamada T., Kurihara T., Tai-Nagara I., Miyamoto T., Mukouyama Y.S., Sato T.N., Suda T., Ema M., Kubota Y. // Cell. 2014. V. 159. P. 584–596. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.025
- Rashidi B.H., Sarhangi N., Aminimoghaddam S., Haghollahi F., Naji T., Amoli M.M., Shahrabi-Farahani M. // Mol. Biol. Rep. 2019. V. 46. P. 3445–3450. https://doi.org/10.1007/s11033-019-04807-6
- 44. Jayson G.C., Kerbel R., Ellis L.M., Harris A.L. // Lancet. 2016. V. 388. P. 518–529. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01088-0
- 45. Amoli M.M., Amiri P., Alborzi A., Larijani B., Saba S., Tavakkoly-Bazzaz J. // Mol. Biol. Rep. 2012. V. 39. P. 8595–8599. https://doi.org/10.1007/s11033-012-1713-x
- 46. Battinelli E.M., Markens B.A., Italiano J.E. // Blood. 2011. V. 118. P. 1359–1369. https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-334524
- Olsson A.K., Dimberg A., Kreuger J., Claesson-Welsh L. // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2006. V. 7. P. 359–371. https://doi.org/10.1038/nrm1911
- 48. Morel M., Vanderstraete M., Cailliau K., Hahnel S., Grevelding C.G., Dissous C. // PLoS One. 2016. V. 11. P. e0163283. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163283

- 49. Holmes K., Roberts O.L., Thomas A.M., Cross M.J. // Cell. Signall. 2007. V. 19. P. 2003–2012. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.05.013
- 50. *Shibuya M.* // Angiogenesis. 2006. V. 9. P. 225–230. https://doi.org/10.1007/s10456-006-9055-8
- Nakagawa T., Ohta K., Uetsuki R., Kato H., Naruse T., Murodumi H., Yokoyama S., Sakuma M., Ono S., Takechi M. // Biochem. Gen. 2020. V. 58. P. 473–489. https://doi.org/10.1007/s10528-020-09961-2
- Zhou Z., Christofidou-Solomidou M., Garlanda C., DeLisser H.M. // Angiogenesis. 1999. V. 3. P. 181–188. https://doi.org/10.1023/a:1009092107382
- Newman P.J., Newman D.K. // Arterioscler. Thromb. Vas. Biol. 2003. V. 23. P. 953–964. https://doi.org/1161/01.ATV.0000071347.69358.D9
- 54. *Dejana E.* // Nat. Rev. Mol. Biol. 2004. V. 5. P. 261–270. https://doi.org/10.1038/nrm1357
- 55. Naik T.U., Naik M.U., Naik U.P. // Front. Biosci. 2008. V. 13. P. 258–262. https://doi.org/10.2741/2676
- 56. Tzima E., Irani-Tehrani M., Kiosses W.B., Dejana E., Schultz D.A., Engelhardt B., Cao G., DeLisser H., Schwartz M.A. // Nature. 2005. V. 437. P. 426–431. https://doi.org/10.1038/nature03952
- Lertkiatmongkol P., Liao D., Mei H., Hu Y., Newman P.J. // Curr. Opin. Hematol. 2016. V. 23. P. 253–259. https://doi.org/10.1097/MOH.00000000000239
- 58. Osawa M., Masuda M., Kusano K., Fujiwara K. // J. Cell. Biol. 2002. V. 158. P. 773–785. https://doi.org/10.1083/jcb.200205049
- 59. Conway D.E., Breckenridge M.T., Hinde E., Gratton E., Chen C.S., Schwartz M.A. // Curr. Biol. 2013. V. 23. P. 1024–1030. https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.04.049
- Ilan N., Cheung L., Pinter E., Madri J.A. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 21435–21443. https://doi.org/10.1074/jbc.M001857200
- 61. *Hua C.T., Gamble J.R., Vadas M.A., Jackson D.E. //* J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 28332–28340. https://doi.org/10.1074/jbc.273.43.28332
- 62. Pumphrey N.J., Taylor V., Freeman S., Douglas M.R., Bradfield P.F., Young S.P., Lord J.M., Wakelam M.J., Bird I.N., Salmon M., Buckley C.D. // FEBS Lett. 1999. V. 450. P. 77–83. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)00446-9
- 63. *Lorenz U.* // Immunol. Rev. 2009. V. 228. P. 342–359. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00760.x
- 64. *Qu C.K.* // Cell. Res. 2000. V. 10. P. 279–288. https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290055
- Schulze W.X., Deng L., Mann M. // Mol. Syst. Biol. 2005. V. 1. P. E1–E13. https://doi.org/10.1038/msb4100012
- 66. Masuda M., Osawa M., Shigematsu H., Harada N., Fujiwara K. // FEBS Lett. 1997. V. 408. P. 331–336. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00457-2
- Cao G., O'Brien C.D., Zhou Z., Sanders S.M., Greenbaum J.N., Makrigiannakis A., DeLisser H.M. // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2002. V. 282. P. C1181–C1190. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00524.2001
- 68. Matsumura T., Wolff K., Petzelbauer P. // J. Immunol. 1997. V. 158. P. 3408–3416.

- Yang S., Graham J., Kahn J.W., Schwartz E.A., Gerritsen M.E. // Am. J. Pathol. 1999. V. 155. P. 887–895. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65188-7
- 70. Leu S.J., Lam S.C., Lau L.F. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 46248–46255. https://doi.org/10.1074/jbc.M209288200
- Wong C.W.Y., Wiedle G., Ballestrem C., Wehrle-Haller B., Etteldorf S., Bruckner M., Engelhardt B., Gisler R.H., Imhof B.A. // Mol. Biol. Cell. 2000. V. 11. P. 3109– 3121. https://doi.org/10.1091/mbc.11.9.3109
- 72. Zhao T., Newman P.J. // J. Cell. Biol. 2001. V. 152. P. 65–74.
- https://doi.org/10.1083/jcb.152.1.65
- 73. Horton M.A. // Int. J. Biochem. Cell. Biol. 1997. V. 29. P. 721–725. https://doi.org/10.1016/S1357-2725(96)00155-0
- 74. Liu Z., Wang F., Chen X. // Drug. Dev. Res. 2008. V. 69. P. 329–339. https://doi.org/10.1002/ddr.20265
- 75. Sasaki T., Fässler R., Hohenester E. // J. Cell. Biol. 2004. V. 164. P. 959–963. https://doi.org/10.1083/jcb.200401058
- 76. Franzke C.W., Bruckner P., Bruckner-Tuderman L. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 4005–4008. https://doi.org/10.1074/jbc.R400034200
- 77. Schottelius M., Laufer B., Kessler H., Wester H.-J. // Acc. Chem. Res. 2009. V. 42. P. 969–980. https://doi.org/10.1021/ar800243b
- Beacham D.A., Wise R.J., Turci S.M., Handin R.I. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 3409–3415.
- 79. Lopes da Silva M., Cutler D.F. // Blood. 2016. V. 128. P. 277285.
- https://doi.org/10.1182/blood-2015-10-677054
 80. Lenting P.J., Christophe O.D., Denis C.V. // Blood. 2015. V. 125. P. 2019–2028.
- https://doi.org/10.1182/blood-2014-06-528406
 81. Metcalf D.J., Nightingale T.D., Zenner H.L., Lui-Roberts W.W., Cutler D.F. // J. Cell. Sci. 2008. V. 121. P. 19–27.
 - https://doi.org/10.1242/jcs.03494
- Zhou Y.F., Eng E.T., Zhu J., Lu C., Walz T., Springer T.A. // Blood. 2012. V. 120. P. 449–458. https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-405134
- Randi A.M., Smith K.E., Castaman G. // Blood. 2018.
 V. 132. P. 132–140. https://doi.org/10.1182/blood-2018-01-76901
- 84. Mahabeleshwar G.H., Chen J., Feng W., Somanath P.R., Razorenova O.V., Byzova T.V. // Cell. Cycle. 2008. V. 7. P. 335–347. https://doi.org/10.4161/cc.7.3.5234
- Borges E., Jan Y., Ruoslahti E. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 39867–39873. https://doi.org/10.1074/jbc.M007040200
- Reynolds A.R., Hart I.R., Watson A.R., Welti J.C., Silva R.G., Robinson S.D., Da Violante G., Gourlaouen M., Salih M., Jones M.C., Jones D.T., Saunders G., Kostourou V., Perron-Sierra F., Norman J.C., Tucker G.C., Hodivala-Dilke K.M. // Nat. Med. 2009. V. 15. P. 392–400. https://doi.org/10.1038/nm.1941

- Somanath P.R., Malinin N.L., Byzova T.V. // Angiogenesis. 2009. V. 12. P. 177–185. https://doi.org/10.1007/s10456-009-9141-9
- Starke R.D., Ferraro F., Paschalaki K.E., Dryden N.H., McKinnon T.A., Sutton R.E., Payne E.M., Haskard D.O., Hughes A.D., Cutler D.F., Laffan M.A., Randi A.M. // Blood. 2011. V. 117. P. 1071–1080. https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-264507
- Turner N.A., Moake J.L. // PLoS One. 2015. V. 10. P. e0140740. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140740
- 90. Biesemann A., Gorontzi A., Barr F., Gerke V. // J. Biol. Chem. 2017. V. 292. P. 11631–11640. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.773333
- Goehring A.S., Pedroja B.S., Hinke S.A., Langeberg L.K., Scott J.D. // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 33155– 33167. https://doi.org/10.1074/jbc.M705167200
- 92. Carnegie G.K., Means C.K., Scott J.D. // IUBMB Life. 2009. V. 61. P. 394–406. https://doi.org/10.1002/iub.168
- 93. Zhang X., Odom D.T., Koo S.-H., Conkright M.D., Canettieri G., Best J., Chen H., Jenner R., Herbolsheimer E., Jacobsen E., Kadam S., Ecker J.R., Emerson B., Hogenesch J.B., Unterman T., Young R.A., Montminy M. // PNAS. 2005. V. 102. P. 4459–4464. https://doi.org/10.1073/pnas.0501076102
- 94. Conkright M.D., Montminy M. // Trends Cell. Biol. 2005. V. 15. P. 457–459. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.07.007
- 95. Grandoch M., Roscioni S.S., Schmidt M. // Br. J. Pharmacol. 2010. V. 159. P. 265–284. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00458.x
- 96. Mansilla Pareja M.E., Gaurón M.C., Robledo E., Aguilera M.O., Colombo M.I. // PLoS One. 2019. V. 14. P. e0212202. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212202
- 97. Rehmann H., Das J., Knipscheer P., Wittinghofer A., Bos J.L. // Nature. 2006. V. 439. P. 625–628. https://doi.org/10.1038/nature04468
- 98. Sugawara K., Shibasaki T., Takahashi H., Seino S. // Gene. 2016. V. 575. P. 577–583. https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.09.029
- 99. Raaijmakers J.H., Bos J.L. // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. P. 10995–10999. https://doi.org/10.1074/jbc.R800061200
- 100. Gupta V.K., Rajala A., Rajala R.V. // Adv. Exp. Med. Biol. 2012. V. 723. P. 777–782. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0631-0_99
- 101. Qiu W, Zhuang S., von Lintig F.C., Boss G.R., Pilz R.B. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 31921–31929. https://doi.org/10.1074/jbc.M003327200
- 102. Rodriguez-Viciana P., Sabatier C., McCormick F. // Mol. Cell. Biol. 2004. V. 24. P. 4943–4954. https://doi.org/10.1128/MCB.24.11.4943-4954.2004
- 103. Xu S., Khoo S., Dang A., Witt S., Do V., Zhen E., Schaefer E.M., Cobb M.H. // Mol. Endocrinol. 1997. V. 11. P. 1618–1625. https://doi.org/10.1210/mend.11.11.0010

- 104. Roskoski R., Jr. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2012. V. 417. P. 5–10. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.145
- 105. Gardner A.M., Vaillancourt R.R., Lange-Carter C.A., Johnson G.L. // Mol. Biol. Cell. 1994. V. 5. P. 193–201. https://doi.org/10.1091/mbc.5.2.193
- 106. Roux P.P., Richards S.A., Blenis J. // Mol. Cell Biol. 2003. V. 23. P. 4796–4804. https://doi.org/10.1128/MCB.23.14.4796-4804.2003
- 107. Waskiewicz A.J., Flynn A., Proud C.G., Cooper J.A. // EMBO J. England. 1997. V. 16. P. 1909–1920. https://doi.org/10.1093/emboj/16.8.1909
- 108. Johannessen M., Delghandi M.P., Moens U. // Cell. Signal. 2004. V. 16. P. 1211–1227. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.05.001
- 109. Li G., Jiang Q., Xu K. // Biochim. 2019. V. 163. P. 94–100. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.05.014
- 110. D'Amico M., Hulit J., Amanatullah D.F., Zafonte B.T., Albanese C., Bouzahzah B., Fu M., Augenlicht L.H., Donehower L.A., Takemaru K.-I., Moon R.T., Davis R., Lisanti M.P., Michael Shtutman M., Zhurinsky J., Ben-

Ze'ev A., Troussard A.A., Dedhar S., Pestell R.G. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 32649–32657. https://doi.org/10.1074/jbc.M000643200

- 111. Tigan A.-S., Bellutti F., Kollmann K., Tebb G., Sexl V. // Oncogene. 2016. V. 35. P. 3083–3091. https://doi.org/10.1038/onc.2015.407
- 112. Klochkov S.G., Neganova M.E., Aleksandrova Yu.R. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 891–902. https://doi.org/10.1134/S1068162020050118
- 113. Salem M.S., El-Helw E.A.E., Derbala H.A.Y. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 77–84. https://doi.org/10.1134/S1068162020010094
- 114. Mavani G.P., DeVita M.V., Michelis M.F. // Front. Med. 2015. V. 2. P. 19. https://doi.org/10.3389/fmed.2015.00019
- 115. Khegay I.I., Popova N.A., Ivanova L.N. // Tumour Biol. 2010. V. 31. P. 569–573. https://doi.org/10.1007/s13277-010-0070-4
- 116. Khegay I.I., Ivanova L.N. // Biochem. Gen. 2015. V. 53. P. 1–7. https://doi.org/10.1007/s10528-015-9665-1

Vasopressin Reception in Blood Vessels and Proliferation of Endotheliocytes

I. I. Khegay*,#

[#]*Phone:* +7 (383) 363-49-63; e-mail: khegay@bionet.nsc.ru

*Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, prosp. Acad. Lavrentieva 10, Novosibirsk, 630090 Russia

Proliferative effects of vasopressin related to a less investigated field of molecular biochemistry of peptide hormones. At the same time, synthetic vasopressin preparations are widely utilized in clinical practice of vessel medicine and oncology. In several cases, vasopressin induces proliferative effects, but this time, it is more actively discussed appeared data concerning antiproliferative features of hormone. Any proliferation is accompanied by tissue neovascularization. Blood vessels express two main types of vasopressin receptors. In this case, it needs actual analysis of vasopressin action mechanisms with pathes to mitogenic and secretory effects in blood vessel cells. The review presented tissue-specificity of vasopressin receptors expression and last data concerning organization of signal transduction of hormonal reception. The attention is focused on smooth muscle cells and platelets expressing V1A types of receptors, and endotheliocytes expressing V2 vasopressin receptors. Detail analysis was done for stucture of glycopeptides and enzymes playing the role of intermediators in noncanonical transduction of hormone signal. Particular attention was paid to molecular organization of platelet-endothelium adhesive protein PECAM-1. The integrative glucopeptide PECAM-1 carries out simultaneously structural and signal function, and convert vasoconstrictory effect of V_{1A} reception of vasopressin into reaction of other membrane receptors and intracellular enzymes of blood vessels. Cytoplasmic part of PECAM-1 takes part in inhibition of VEGFR-2 receptor of vascular endothelial growth factor VEGF, the base stimulator of endotheliocytes proliferation. Intercellular PECAM-1 dimers activate integrins. Endotheliocytes express integrin $\alpha V\beta$ 3 and factor von Willebrand. Multimeric molecules of factor von Villebrand take part in cooperation between endothelium and interstitium during local reorganization of vessel network accompanying blood vessels reparation in trauma and tumor progression. Factor von Willebrand aggregates compaund of aVB3 integrins with other ligands and membrane receptors of endotheliocytes and platelets, and fixes cells on basal membrane. V_{1A} receptors of vasopressin activate secretion of VEGF in platelets and pro-liferation of myocytes. V_2 receptors stimulate exocytosis of Weibel-Palade bodies and secretion of factor von Willebrand in endotheliocytes inducing hemotaxis of smooth muscle cells and endotheliocytes. Activated $\alpha V\beta$ 3 integrins interact physically with VEGFR-2 receptors of endotheliocytes and modulate stimulation of angiogenic effects.

Keywords: proliferation, VEGFR-2 receptor, vasopressin receptor V_{1A} , vasopressin receptor V_2 , platelet, endotheliocyte, platelet-endothelium PECAM-1, integrin $\alpha V\beta 3$



УДК 547.995.15

ПОЛУЧЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННОЙ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ С КОНТРОЛИРУЕМЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ВИНИЛЬНЫХ ГРУПП С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ СКАФФОЛДОВ МЕТОДОМ ФОТОИНДУЦИРУЕМОЙ РЕАКЦИИ СШИВКИ

© 2021 г. А. В. Сочилина^{*, **, #}, А. Г. Савельев^{**, ***}, Р. А. Акасов^{*, **, ***}, В. П. Зубов^{*}, Е. В. Хайдуков^{*, **, ***}, А. Н. Генералова^{*}

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

**Федеральный научно-исследовательский центр "Кристаллография и фотоника" РАН, Россия, 119333 Москва, Ленинский просп., 59

***Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8/2

Поступила в редакцию 17.08.2020 г. После доработки 20.08.2020 г. Принята к публикации 26.08.2020 г.

Материалы на основе гиалуроновой кислоты (ГК) активно используют в качестве скаффолдов для решения задач тканевой инженерии. Один из способов их получения – реакция фотоиндуцируемой сшивки, которая требует модификации ГК винильными группами, способными вступать в радикальную реакцию под действием света. Важная характеристика модифицированной ГК (мГК) – количество привитых винильных групп, представленное в виде степени замещения (СЗ), отвечающей за механические, химические и биологические свойства скаффолдов. В данной работе показана возможность контролируемого управления СЗ путем изменения параметров реакции (состава и концентрации компонентов, условий реакции), а также влияние СЗ на вязкость растворов мГК. Продемонстрирован пример фотоиндуцированной реакции мГК в присутствии флавинмононуклеотида в качестве инициатора для создания методом 3D-печати скаффолдов, которые не проявляют цитотоксических свойств. Изучен характер роста фибробластов на поверхности скаффолда.

Ключевые слова: гиалуроновая кислота, глицидилметакрилат, скаффолды, полимераналогичные реакции **DOI:** 10.31857/S0132342321040199

введение

В настоящее время активно развивается такое инновационное направление науки, как тканевая инженерия, цель которой — создание конструкций, способных поддерживать, восстанавливать и замещать поврежденные ткани и органы. Основой таких конструкций служат скаффолды, представляющие собой трехмерные каркасные структуры, на поверхности и внутри которых могут закрепляться и пролиферировать клетки [1–3]. После имплантации скаффолдов в месте дефекта формируется новая биоткань, а изначальный каркас деградирует или удаляется хирургически. Для применения в сфере тканевой инженерии скаффолды должны удовлетворять ряду требований [4, 5]: 1) биосовместимость, отсутствие цитотоксичности, иммуногенности и пирогенности как самих изделий, так и продуктов их распада; 2) биодеградируемость, которая определяет возможность замещения искусственных конструкций собственными тканями организма; 3) свойства поверхности, способствующие адгезии, пролиферации и сохранению функций клеток; 4) механическая прочность, аналогичная таковой у замещаемой ткани; 5) оптимальная пористость для свободного распределения клеток и вырабатываемого ими межклеточного матрикса, а также для эффективного обмена веществ; при этом должен соблюдаться баланс между пористостью и механической прочностью.

Помимо перечисленных требований, методика изготовления скаффолдов должна быть хоро-

Сокращения: ГК – гиалуроновая кислота; мГК – модифицированная гиалуроновая кислота; ГМА – глицидилметакрилат; ДМФА – диметилформамид; МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид; ПЭГДА – диакрилат полиэтиленгликоля; СЗ – степень замещения; ТЭА – триэтиламин; ТЭАБ – тетраэтиламмоний бромид; ФОК – фотоотверждаемая композиция.

[#] Автор для связи: (эл. почта: ddraig@yandex.ru).

шо воспроизводимой, масштабируемой и экономически целесообразной. Скаффолды могут быть изготовлены на основе металлов, керамики, синтетических и природных полимеров, а также их композитов. Скаффолды на основе металлов и керамики не подвергаются деградации, что может вызывать осложнения при длительном применении. Использование для формирования скаффолдов синтетических полимеров, имеющих преимущественно гидрофобную поверхность, затрудняет прикрепление клеток, а также приводит к появлению токсичных продуктов деградации, как, например, в случае сополимера лактида с гликолидом, допущенного FDA к применению [4-6]. В последнее время большое внимание уделяют материалам на основе природных полимеров и их производных, особенно эндогенным соединениям, поскольку они a priori обладают хорошей биосовместимостью и способностью к ферментативной деградации в организме. Один из таких полимеров – линейный полисахарид – гиалуроновая кислота (ГК), состоящая из повторяющихся неразветвленных звеньев глюкуроновой кислоты и *N*-ацетилглюкозамина. ГК – один из основных компонентов внеклеточного матрикса, входит в состав соединительной, эпителиальной и нервной тканей, содержится во многих биологических жидкостях (слюне, синовиальной жидкости и др.), а также принимает активное участие в пролиферации и миграции клеток [7, 8]. Однако изготовление скаффолдов на ее основе затруднено из-за чрезвычайно высокого коэффициента набухания и неспособности полисахарида удерживать заданную форму гидрогеля.

Разработаны методы получения композитных скаффолдов на основе ГК за счет образования нековалентных связей, например, с коллагеном, фиброином шелка, комплементарной ДНК или поливиниловым спиртом [9–12], а также за счет модификации ГК термочувствительными полимерами [13]. Однако нековалентная сшивка не способна решить проблему слабой механической прочности гидрогелей ГК, поэтому перспективное направление – разработка методов получения скаффолдов ГК за счет реакции ковалентной внутри- и межмолекулярной сшивки цепей ГК. Один из подходов – модификация ГК путем введения винильных групп и проведение радикальной реакции сшивки, которая может быть реализована не только с участием химических реагентов, но и под действием света. Фотоиндуцированные реакции сшивки позволяют создавать материалы с требуемыми физико-химическими свойствами при сохранении биосовместимости и способности к биодеградации. Изготовление скаффолдов может проводиться методом микромолдинга или лазерной 3D-печати [14–17], кроме того, формирование конструкции может быть реализовано непосредственно в живом организме без предварительной стадии in vitro [18].

Для получения производных ГК, содержащих винильные группы, активно используют реакции полимераналогичных преврашений с участием ангидрида метакриловой кислоты или глицидилметакрилата (ГМА) [19-22]. Ключевой параметр при получении таких производных - концентрация винильных групп, которая может быть представлена в виде степени замещения (СЗ) групп полимера остатками ГМА. СЗ влияет не только на степень сшивки, но и на цитотоксичность, биодеградируемость и механические свойства получаемых скаффолдов. Управление СЗ – настраиваемый инструмент для получения скаффолдов с заданными свойствами. СЗ может быть оценена с помощью ИК- [23] и ¹Н-ЯМР-спектроскопии [20, 22], однако точное определение СЗ такими методами затруднено вследствие высокой гигроскопичности и полимерной природы модифицированной ГК (мГК), что приводит к уширению пиков и появлению многочисленных шумов. В данной работе количественное определение СЗ проводили с помощью разработанного ранее [24] титриметрического анализа при участии перманганата калия. СЗ использовали в качестве параметра, позволяющего сравнивать образцы мГК и, соответственно, влияние условий на протекание реакции полимераналогичных превращений.

Цель данной работы — анализ влияния параметров реакции ГК с ГМА (условия и состав реакционной смеси) на СЗ, которая определяет свойства мГК и скаффолдов на ее основе. В работе продемонстрирован способ получения скаффолдов в процессе фотоотверждаемой реакции при использовании в качестве инициатора эндогенного нетоксичного соединения флавинмононуклеотида. Исследованы цитотоксические свойства полученных скаффолдов и возможность культивирования клеток на их поверхности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полимераналогичная реакция ГК с ГМА для введения звеньев с двойной связью может проходить как гетерофазная реакция в водной среде со слабо растворимым в воде ГМА [19], гомофазная реакция в органических растворителях после замены иона натрия в ГК на липофильный ион тетрабутиламмония [20] или гомофазная реакция в водно-органической среде [21]. В данной работе для модификации ГК с помощью ГМА была выбрана простая и легко управляемая реакция в водно-органической среде [21]. В результате проведения данной реакции в среде вода/ДМ $\Phi A = 1.6:1$ (ГК 0.36 мас. %, тетраэтиламмоний бромид (ТЭАБ) 0.36 мас. %, 18 мл ГМА на 1 г ГК) при 25°С в течение 4 сут были получены образцы, в которых степень замещения групп ГК звеньями с двойной связью (СЗ) составила 40%. Для анализа влияния параметров реакции ГК с ГМА на СЗ и использование их в качестве инструмента управ-



Рис. 1. Схема реакции модификации гиалуроновой кислоты с помощью глицидилметакрилата: 1 – необратимая реакция раскрытия эпоксидного кольца; 2 – обратимая реакция переэтерификации; 3 – гидролиз. R₁ = CH₂, R₂ = C=O.

ления C3 исследовали изменение pH, времени проведения реакции, температуры и соотношения ГК/ГМА в реакционной смеси, а также роль катализатора межфазового переноса.

Влияние рН на СЗ в мГК. Влияние рН на СЗ в мГК оценивали в исходной реакционной смеси при нейтральном рН 6-7, в щелочной среде (рН 12), полученной при замене катализатора ТЭАБ на триэтиламин (ТЭА), и кислой среде (рН 4.5), полученной при добавлении НСІ к исходной реакционной смеси. Показано, что в щелочной среде СЗ в образцах была в 2 раза ниже (21%), чем в кислой и нейтральной средах (~40-41%) при остальных одинаковых условиях. Согласно литературным данным [21], полимераналогичная реакция ГК с ГМА в водно-органической среде может протекать по двум основным механизмам: за счет обратимой переэтерификации остатка метакриловой кислоты ГМА и за счет необратимой реакции с раскрытием эпоксидного кольца глицидила (рис. 1). Подтверждение таких механизмов представлено в работе Reis et al. [25] на примере модельных полимеров, содержащих только гидроксильные функциональные группы (поливиниловый спирт) или только карбоксильные группы (полиакриловая кислота). Было показано, что при рН 3.5 ГМА взаимодействует как с гидроксильными, так и с карбоксильными группами через раскрытие эпоксидного кольца, а при pH 10.5 ГМА подвергается гидролизу и реагирует лишь с гидроксильными группами по обоим механизмам, при этом предпочтительным механизмом выступает раскрытие эпоксидного цикла. Сложный механизм реакции полисахаридов с ГМА рассмотрен в работе Li et al. [26]. Авторы исследовали реакцию хондроитинсульфата с ГМА, в результате которой при щелочных (pH 8.5) и близких к нейтральным (рН 6.4) условиям образуются различные продукты благодаря одновременному протеканию нескольких процессов: сначала проходят переэтерификация и модификация через раскрытие эпоксидного кольца, затем полученные продукты могут подвергаться гидролизу с образованием немодифицированного полисахарида, полисахарида со звеньями глицерина, метакриловой кислоты и глицидила. Следует отметить, что гидролиз и переэтерификация протекают в меньшей степени при рН 6.4, чем при рН 8.5, а при рН 3.0 гидролиз сложноэфирных связей практически отсутствует, поэтому модификация преимущественно протекает через раскрытие эпоксигруппы.

С учетом описанных механизмов можно сделать вывод, что при щелочном pH наряду с реакцией присоединения винильных групп протекает гидролиз, что снижает C3 в конечном продукте. Кроме того, практически одинаковые значения C3, полученные в нейтральных и кислых условиях (~40-41%), свидетельствуют о незначительном гидролизе при нейтральном pH. Таким образом, оптимальный процесс реализуется при проведении реакции модификации ГК в нейтральной


Рис. 2. Зависимость степени замещения в мГК от времени проведения реакции с глицидилметакрилатом (18 мл на 1 г ГК) при 25 и 40°С, а также при соотношении вода/ДМФА = 1.6 : 1 (с ТЭАБ) и вода/ДМФА = = 1.2 : 1 (без ТЭАБ). Приведены усредненные значения трех независимых измерений.

среде, в которой возможно контролируемо управлять C3 благодаря минимизации вклада побочных реакций. В случае данного процесса наиболее подходящий катализатор — ТЭАБ, не повышающий рН среды и служащий катализатором фазового переноса, позволяющим проводить процесс как в водной, так и органической среде.

Влияние времени и температуры на СЗ в мГК. Реакцию модификации ГК проводили в течение 4 сут. в отличие от описанных в литературе процессов, время проведения которых составляло 5-10 сут при рН 12 [21]. Такой протокол был выбран, исходя из результатов измерения СЗ в продукте каждые сутки в течение 6 сут реакции, которые опубликованы нами ранее [24]. Выявлено, что после 4 сут СЗ значительно не изменялась при дальнейшем протекании реакции. Результаты имели хорошую воспроизводимость по СЗ и обеспечивали требуемую сшивку при фотоиндуцированном формировании гидрогелей. Проведение реакции при нейтральном рН значительно снижает гидролиз, а значит, повышает СЗ, поэтому время проведения реакции в течение 4 сут – оптимально при температуре 25°С.

Повышение температуры проведения процесса с 25 до 40°С позволило уменьшить время реакции и повысить СЗ (рис. 2). Так, для получения 40% СЗ в ГК при 25°С требуется проведение реакции в течение 4 сут, а при 40°С – в течение 2 сут. Это может быть связано с тем, что при более высокой температуре соблюдается принцип Вант-Гоффа, и происходит увеличение скорости необратимой реакции раскрытия эпоксидного кольца, кроме того, может увеличиваться растворимость ГМА в реакционной смеси. Дальнейшее увеличение температуры реакции может приводить к тер-



Рис. 3. Зависимость степени замещения от количества глицидилметакрилата в реакционной смеси и времени проведения реакции (все реакции проводились при 40° С и соотношении вода/ДМФА = 1.2 : 1). Приведены усредненные значения трех независимых измерений.

могидролизу ГК и снижать молекулярную массу продуктов [27].

Влияние соотношения компонентов и времени на СЗ в мГК. Один из эффективных инструментов управления СЗ при проведении реакции полимераналогичных превращений ГК – изменение концентрации компонентов в исходной смеси. Показано, что увеличение концентрации органической фазы от соотношения вода/ДМФА = 1.6 : 1 до 1.2: 1 позволяет получать мГК практически с тем же содержанием винильных групп на 4-е сут при 25°С (~40%) без добавления ТЭАБ (рис. 2). Такой эффект может быть связан с увеличением содержания ДМФА, который повышает растворимость ГМА и, соответственно, приводит к получению более гомогенной системы, в которой не требуется участие катализатора фазового переноса ТЭАБ.

Изменение концентрации ГМА в реакционной смеси при прочих равных условиях позволяет эффективно управлять СЗ. Как видно на рис. 3, повышение концентрации ГМА в системе приводит к увеличению СЗ, которая может достигать 64%. Эксперимент проводили при 40°С и соотношении фаз вода/ДМФА = 1.2: 1.

При этом важно отметить, что повышение концентрации ГМА > 18 мл на 1 г ГК не приводит к значительному росту СЗ в данном временном интервале, что делает неэффективным дальнейшее увеличение количества ГМА в реакционной смеси. Также стоит отметить, что увеличение концентрации ГК с 0.36 до 0.56 мас. % при неизменности всех остальных параметров значительно не влияет на конечную СЗ, однако позволяет снизить расход всех остальных реагентов в реакционной смеси.

Таким образом, для получения мГК с максимальной СЗ необходимо проводить реакцию в нейтральной среде при повышенной температуре (40°С) с содержанием ГМА \geq 18 мл на 1 г ГК не менее 4 сут.

Влияние СЗ на вязкость растворов модифицированной ГК. Важная характеристика мГК – вязкость ее растворов, оказывающая сильное влияние на полвижность раликалов при провелении реакции фотоиндуцируемой сшивки. Была измерена кинематическая вязкость разбавленных растворов мГК (0.5 мас. %) в зависимости от СЗ (рис. 4) с использованием метода капиллярной вискозиметрии. Снижение вязкости при повышении СЗ может быть связано с увеличением количества гидрофобных звеньев ГМА. В результате происходит снижение числа водородных связей, что, соответственно, приводит к уменьшению гидратных оболочек молекул ГК и снижению межмолекулярного трения. Несмотря на то что измерение проводили для разбавленных растворов мГК, данная тенденция, связанная со снижением вязкости при повышении СЗ, сохраняется и для фотоотверждаемых композиций (ФОК) с высоким содержанием мГК (20 мас. %), что оказывает большое влияние на параметры 3D-печати.

Скаффолды на основе мГК. Определено, что для экструзионной 3D-печати оптимальный диапазон C3 мГК - 30-55%, что соответствует вязкости, необходимой для получения скаффолдов с требуемыми свойствами. При СЗ < 30% высокая вязкость образцов затрудняет экструзию и не позволяет получать скаффолды требуемой степени сшивки. При СЗ > 55% невозможно получить образцы, сохраняющие форму при экструзии. В качестве оптимального варианта СЗ для экструзии была выбрана мГК с содержанием винильных групп 40%; на ее основе были получены ФОК для 3D-печати, как описано в работе Savelyev et al. [15]. В качестве фотоинициатора для данных ФОК использовали флавинмононуклеотид (также известный как витамин В2), который, как и ГК, – эндогенный биосовместимый компонент в композиции. В ФОК также добавляли диакрилат полиэтиленгликоля (ПЭГДА) как инструмент для тонкой настройки свойств скаффолдов - для уменьшения набухания и деформации формы готовых скаффолдов после контакта с водными растворами, в частности с клеточной средой [17]. Следует отметить, что при использовании ГК с СЗ > 60% коэффициент набухания значительно снижается, и в этом случае скаффолды могут быть получены без участия ПЭГДА. Были напечатаны 7-слойные скаффолды в виде решетки с периодом 1.9 мм (рис. 5).

Полученные решетчатые скаффолды были проинкубированы с культурой фибробластов человека Вј-5ta в течение 14 сут. На 7-е и 14-е сут с некоторыми образцами был проведен МТТ-тест. Он показал не только отсутствие цитотоксичности, но и значительный прирост количества клеток во времени (рис. 6).



Рис. 4. Кинематическая вязкость водных растворов мГК (0.5 мг/мл) в зависимости от степени замещения. Приведены усредненные значения трех независимых измерений.

Как видно из микрофотографий, приведенных на рис. 7, прикрепление клеток к скаффолдам происходит неравномерно, как правило — в виде клеточных агрегатов в узлах решетки, что согласуется с данными о слабой адгезии клеток к немодифицированной ГК [28, 29]. Однако за 14 сут клетки способны колонизировать поверхность скаффолдов не только на узлах, но и на балках решетки.

Данные микроскопии и МТТ-теста показывают отсутствие цитотоксичности, умеренную адгезию клеток к поверхности скаффолдов и рост клеток в течение 14 сут инкубирования. Адгезия клеток к поверхности скаффолдов может быть повышена за счет ее покрытия другими биосовместимыми веществами, формирующими поли-электролитный комплекс с ГК, например, коллагеном, хитозаном или поли-L-лизином [30].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. Натриевую соль гиалуроновой кислоты (ГК, ~100 кДа), глицидилметакрилат (ГМА), триэтиламин (ТЭА), тетраэтиламмоний бромид (ТЭАБ), перманганат калия (КМпО₄) и полиэтиленгликоль диакрилат (ПЭГДА, ~575 Да) (Merck, Германия), а также ацетон, диметилформамид (ДМФА), диметилсульфоксид, концентрированную соляную кислоту (Химмед, Россия) применяли без дополнительной очистки. Использовали коммерческие препараты флавинмононуклеотид (Фармстандарт, Россия) и Амфотерицин В (ОАО "Синтез", Россия). Пенициллинстрептомицин, фосфатно-солевой буфер (рН 7.4), среда DMEM с 10% фетальной бычьей сыворотки и 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (краситель МТТ) были получены из ПанЭко (Россия).

Получение мГК. Для проведения реакции ГК растворяли в дистиллированной воде в концентрации 0.50 или 0.77 мас. %. После полного рас-

490



Рис. 5. Изображение скаффолда из мГК, полученное методом сканирующей электронной микроскопии. Масштабный отрезок – 1 мм.

творения ГК добавляли ДМФА в объемном соотношении вода/ДМФА = 1.6:1 (или 1.2:1) для получения водно-органической среды для растворения ГМА. Для предотврашения роста микроорганизмов в реакционную смесь также добавляли на 100 мл 500 МКЛ пенициллин-стрептомицина волы (5000 ед./мл пенициллина G и 5000 мкг/мл стрептомицина) и 128 мкл амфотерицина В (5 мг/мл). Для изучения влияния катализаторов межфазного переноса в реакционную смесь добавляли ТЭА или ТЭАБ в массовом соотношении ГК/катализатор = 1: 4.2 или 1: 0.64 соответственно. После тщательного перемешивания всех компонентов вводили ГМА в различном соотношении ГК/ГМА (г/мл): 1:6, 1:8, 1:12, 1:14, 1:18 и 1:24. После растворения ГМА реакционную смесь оставляли при



Рис. 6. Рост иммортализованных фибробластов человека Вј-5ta на поверхности скаффолдов. Представлены результаты МТТ-теста. Приведены усредненные значения пяти независимых измерений.

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 47 № 4 2021

постоянном перемешивании при 25 или 40°С на 1, 2, 3 или 4 сут. Для остановки реакции и выделения мГК продукт осаждали в 7-кратном избытке ацетона и отделяли осадок центрифугированием. Для очистки продукта осадок растворяли в дистиллированной воде и диализовали против 10-кратного избытка дистиллированной воды в течение 3 сут с ежедневной сменой воды. После очистки продукт замораживали и лиофильно высушивали в течение 2 сут до полного удаления воды.

Определение степени замещения мГК реакцией Вагнера. Для количественного определения привитых винильных групп использовали реакцию КМпO₄ с двойными связями мГК, контролируемую по изменению цвета. Для этого 1 мл 0.025%-ного водного раствора КМпO₄ (стандарт) титровали 0.5%-ным водным раствором мГК до полного изменения окраски (от фиолетовой к желтой). Окончание реакции подтверждали спектрофотометрически по исчезновению пиков поглощения КМпO₄ в области 450–600 нм. Все спектры поглощения регистрировали на УФ-ВИД-спектрофотометре Evolution 201 (Thermo Fisher Scientific, США).

Степень замещения (СЗ) ГК винильными группами определяли как отношение количества привитых звеньев с двойной связью к суммарному количеству дисахаридных звеньев в исследуемых образцах. Количество двойных связей, которое необходимо для полного восстановления стандартного раствора КМпО₄, определяли титрованием этого стандарта водным раствором свободного ГМА, как описано в работе Sochilina et al. [24]. Количество дисахаридных звеньев определяли по тому количеству аналита мГК, которое



Рис. 7. Оптическая микроскопия скаффолдов с культурой фибробластов человека Bj-5ta в течение 1 сут (*a*), 6 сут (*b*), 9 сут (*b*) и 14 сут (*c*) инкубации. Стрелки указывают на клеточные агрегаты. Масштабный отрезок – 300 мкм.

требовалось для полного восстановления стандартного раствора KMnO₄.

Вискозиметрия растворов мГК. Для измерения кинематической вязкости разбавленных растворов мГК (0.5%) использовали вискозиметры ВПЖ-2 0.34 и ВПЖ-2 0.56 (ЭКРОСХИМ, Россия). Для подсчета вязкости высчитывали время истечения жидкости из камеры вискозиметра при 37°С, затем использовали следующую формулу:

$$V = \frac{g}{9.807} \times K \times T,$$

где V — кинематическая вязкость жидкости, мм/c²; g — ускорение свободного падения в месте измерений, м/c²; K — постоянная вискозиметра, мм²/c²; T — время истечения жидкости, с. Константы вискозиметров составляли 0.003410 мм²/c² для ВПЖ-2 0.34 и 0.008745 мм²/c² для ВПЖ-2 0.56. Ввиду широкого разброса вязкостей образцов мГК для C3 > 45% использовали вискозиметр ВПЖ-2 0.34, а для C3 < 45% и немодифицированной ГК — ВПЖ-2 0.56.

Получение фотоотверждаемых композиций (ФОК) и скаффолдов на основе мГК. Для приготовления композиций, способных к фотоотверждению, мГК, ПЭГДА и флавинмононуклеотид смешивали вместе в фосфатно-солевом буфере и обрабатывали в ультразвуковой ванне в течение 1 ч. Затем смесь оставляли на 24 ч в темноте и снова обрабатывали в ультразвуковой ванне 1 ч до приготовления гомогенной ФОК. Манипуляции при необходимости повторяли, если композиции не сразу получались гомогенными. Конечные соотношения компонентов составляли: 20 мас. % мГК, 5 мас. % ПЭГДА и 0.01 мас. % флавинмононуклеотида, аналогично работе Savelvev et al. [15]. Все манипуляции с ФОК проводили при желтом свете, чтобы избежать преждевременного фотоотверждения. Скаффолды печатали на 3D-принтере в виде решетчатых структур. Сначала ФОК загружали в шприц с фильерой в виде капилляра длиной 5 мм и диаметром 250 мкм. Экструзию ФОК запускали поршнем шприца. Скорость движения поршня, как и позицию шприца Х-Ү-Z, контролировали G-кодом в программе Repetier. Фотоотверждение экструдируемой ФОК проводили лазерным облучением синим светом при 450 нм (интенсивность облучения составляла 70 мВ/см²). После изготовления скаффолды дополнительно оставляли в герметичной емкости под лазерным облучением 450 нм интенсивностью 5 мВт/см² на 3 ч для обеспечения полного протекания кросс-сшивки.

Испытания мГК скаффолдов с клетками in vitro. Скаффолды мГК помещали на неадгезивную (агарозную) поверхность 24-луночного планшета и вносили в каждую лунку по 10^5 клеток иммортализованных фибробластов человека Вj-5ta (клетки были получены из Банка опухолевых штаммов ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина" Минздрава России) в 1 мл среды DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки. Клетки инкубировали при 37°С и 5% CO₂ в течение 14 сут, каждые 3 сут проводили полную замену среды. Прикрепление и рост клеток контролировали с использованием инвертированного микроскопа Olympus CKX53 (Olympus, Япония).

МТТ-тест. Количественную оценку роста клеток на поверхности скаффолдов, а также исследование динамики колонизации матриксов проводили с помощью MTT-теста. Для этого в лунки 24-луночного планшета, содержащие скаффолды с прикрепленными к ним клетками, добавляли краситель МТТ до финальной концентрации 0.5 мг/мл и инкубировали при 37°С и 5% СО₂ в течение 3 ч. Затем скаффоллы с окрашенными клетками переносили в чистые лунки, промывали в фосфатно-солевом буфере для удаления неприкрепившихся клеток и элюировали образовавшийся формазан с использованием диметилсульфоксида (400 мкл на лунку, 20 мин при комнатной температуре). Концентрацию формазана определяли спектрофотометрически (Multiskan FC, США) при длине волны 570 нм. Скаффолды, не заселенные клетками, использовали в качестве контроля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе предложен подход для эффективного управления степенью замещения гиалуроновой кислоты, модифицированной глицидилметакрилатом, путем изменения различных параметров реакции (pH, время, температура, тип катализатора, соотношение ГК/ГМА). Такой подход позволяет точно контролировать свойства получаемых производных гиалуроновой кислоты в зависимости от конечных целей использования. В результате проведенного исследования были получены фотоотверждаемые композиции, оптимизированные под 3D-печать, и изготовлены скаффолды, способные обеспечивать адгезию, рост и пролиферацию клеток на своей поверхности.

Проведенное исследование — базовая платформа для дальнейшего развития технологии получения скаффолдов на основе гиалуроновой кислоты, в том числе создаваемых *in situ* в живом организме. Кроме того, разработанный подход позволяет получать скаффолды уникальной архитектуры, например, в виде полых цилиндров для замещения поврежденных сосудов, что открыва-

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 47 № 4 2021

ет новые возможности их использования в регенеративной медицине.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность Д.А. Хоченкову за предоставление иммортализованных фибробластов человека Bj-5ta.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-33-90285-аспиранты – модификация гиалуроновой кислоты и изучение ее свойств) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках выполнения работ по госзаданию Федерального научно-исследовательского центра "Кристаллография и фотоника" РАН (фотоотверждение полимерных композиций).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Langer R., Vacanti J. // Science. 1993. V. 260. P. 920– 926.

https://doi.org/10.1126/science.8493529

- Howard D., Buttery L.D., Shakesheff K.M., Roberts S.J. // J. Anat. 2008. V. 213. P. 66–72. https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00878.x
- Almouemen N., Kelly H.M., O'Leary C. // Comput. Struct. Biotechnol. J. 2019. V. 17. P. 591–598. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.04.008
- Collins M.N., Birkinshaw C. // Carbohydr. Polym. 2013. V. 92. P. 1262–1279. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.028
- Nikolova M.P., Chavali M.S. // Bioact. Mater. 2019. V. 4. P. 271–292.
- https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2019.10.005 *Qu H., Fu H., Han Z., Sun Y. //* RSC Adv. 2019. V. 9. P. 26252–26262.
- https://doi.org/10.1039/C9RA05214C 7. Хвостов М.В., Толстикова Т.Г., Борисов С.А., Душкин А.В. // Биоорг. химия. 2019. Т. 46. С. 563–575. [Khvostov M.V., Tolstikova T.G., Borisov S.A., Dushkin A.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 438–450.] https://doi.org/10.1134/S1068162019060219
- Kin H., Jeong H., Han S., Beack S., Hwang B.W., Shin M., Oh S.S., Hahn S.K. // Biomaterials. 2017.
 V. 123. P. 155–171. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.01.029

- Mohammadi F, Samani S.M., Tanideh N., Ahmadi F. // Adv. Pharm. Bull. 2018. V. 8. P. 11–19. https://doi.org/10.15171/apb.2018.002
- Guan Y., You H., Cai J., Zhang Q., Yan S., You R. // Carbohydr. Polym. 2020. V. 239. P. 116232. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116232
- Fujita S., Hara S., Hosono A., Sugihara S., Uematsu H., Suye S. // Adv. Polym. Technol. 2020. V. 2020. P. 1–7. https://doi.org/10.1155/2020/1470819
- Fahmy A., Kamoun E.A., El-Eisawy R., El-Fakharany E.M., Taha T.H., El-Damhougy B.K., Abdelhai F. // J. Braz. Chem. Soc. 2015. V. 26. P. 1466–1474. https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150115
- Khunmanee S., Jeong Y., Park H. // J. Tissue Eng. 2017.
 V. 8. P. 204173141772646. https://doi.org/10.1177/2041731417726464
- Poldervaart M.T., Goversen B., de Ruijter M., Abbadessa A., Melchels F.P.W., Öner F.C., Dhert W.J.A., Vermonden T., Alblas J. // PLoS One. 2017. V. 12. P. e0177628. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177628
- Savelyev A.G., Sochilina A.V., Akasov R.A., Mironov A.V., Semchishen V.A., Generalova A.N., Khaydukov E.V., Popov V.K. // Sovrem. Tehnol. Med. 2018. V. 10. P. 88. https://doi.org/10.17691/stm2018.10.1.11
- Lam T., Dehne T., Krüger J.P., Hondke S., Endres M., Thomas A. // J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. 2019. V. 107. P. 2649–2657. https://doi.org/10.1002/jbm.b.34354
- Savelyev A.G., Bardakova K.N., Khaydukov E.V., Generalova A.N., Popov V.K., Chichkov B.N., Semchishen V.A. // J. Photochem. Photobiol. A Chem. 2017. V. 341. P. 108–114. https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2017.03.026
- Guo C., Qu X., Rangaswamy N., Leehy B., Xiang C., Rice D. // PLoS One. 2018. V. 13. P. e0196529. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196529

- Baier L.J., Bivens K.A., Patrick C.W., Jr., Schmidt C.E. // Biotechnol. Bioeng. 2003. V. 82. P. 578–589. https://doi.org/10.1002/bit.10605
- Oudshoorn M.H.M., Rissmann R., Bouwstra J.A., Hennink W.E. // Polymer. 2007. V. 48. P. 1915–1920. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2007.01.068
- Bencherif S.A., Srinivasan A., Horkay F., Hollinger J.O., Matyjaszewski K., Washburn N.R. // Biomaterials. 2008. V. 29. P. 1739–1749. https://doi.org/10.1016/i.biomaterials.2007.11.047
- Tsanaktsidou E., Kammona O., Kiparissides C. // Eur. Polym. J. 2019. V. 114. P. 47–56. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.02.024
- 23. Yousefi F, Kandel S., Pleshko N. // Appl. Spectrosc. 2018. V. 72. P. 1455–1466. https://doi.org/10.1177/0003702818785353
- Sochilina A.V., Savelyev A.G., Demina P.A., Sizova S.V., Zubov V.P., Khaydukov E.V., Generalova A.N. // Meas. Sci. Technol. 2019. V. 30. P. 075102. https://doi.org/10.1088/1361-6501/ab0fb4
- Reis A.V., Fajardo A.R., Schuquel I.T.A., Guilherme M.R., Vidotti G.J., Rubira A.F., Muniz E.C. // J. Org. Chem. 2009. V. 74. P. 3750–3757. https://doi.org/10.1021/jo900033c
- Li Q., Wang D., Elisseeff J.H. // Macromolecules. 2003.
 V. 36. P. 2556–2562. https://doi.org/10.1021/ma021190w
- Lowry K.M., Beavers E.M. // J. Biomed. Mater. Res. 1994. V. 28. P. 1239–1244. https://doi.org/10.1002/jbm.820281014
- Pavesio A., Renier D., Cassinelli C., Morra M. // Med. Device Technol. 1997. V. 8. No 7. P. 20–21, 24–27.
- Morra M., Cassineli C. // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 1999. V. 10. P. 1107–1124. https://doi.org/10.1163/156856299X00711
- Yamanlar S., Sant S., Boudou T., Picart C., Khademhosseini A. // Biomaterials. 2011. V. 32. P. 5590–5599. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.04.030

Preparation of Modified Hyaluronic Acid with Controlled Content of Vinyl Groups for Scaffold Production by Photoinduced Cross-Linking Method

A. V. Sochilina^{*, **, #}, A. G. Savelyev^{**, ***}, R. A. Akasov^{*, **, ***}, V. P. Zubov^{*}, E. V. Khaydukov^{*, **, ***}, and A. N. Generalova^{*}

[#]E-mail: ddraig@yandex.ru

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

Federal Scientific Research Centre "Crystallography and Photonics" RAS, Leninskiy prosp. 59, Moscow, 119333 Russia *Sechenov First Moscow State Medical University, ul. Trubetskaya 8/2, Moscow, 119991 Russia

Materials based on hyaluronic acid (HA) are actively used as scaffolds for tissue engineering tasks. One of the methods for their preparation is the reaction of photoinduced crosslinking, which requires modification of HA with vinyl groups capable of radical reactions under light irradiation. An important characteristic of modified HA (mHA) is the amount of grafted vinyl groups represented as the degree of substitution (DS), which is responsible for mechanical, chemical, and biological properties of scaffolds. In this work the possibility of controlled DS regulation via reaction parameters change (composition and concentration of chemical agents, reaction conditions) is shown, as well as the effect of DS on the viscosity of mHA solutions. An example of photoinduced reaction of mHA in the presence of flavin mononucleotide as initiator for noncytotoxic scaffold production by 3D printing is demonstrated. Aspects of fibroblast growth on scaffold surface were studied.

Keywords: hyaluronic acid, glycidyl methacrylate, scaffolds, polymer analagous reactions



УДК 595.461:577.112.6:615.919

ПРОИЗВОДНОЕ НЕЙРОТОКСИНА СКОРПИОНА ВеМ9, СЕЛЕКТИВНОЕ В ОТНОШЕНИИ ПОТЕНЦИАЛ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ НАСЕКОМЫХ

© 2021 г. М. А. Черных*, Н. А. Кульдюшев*, С. Пеньёр**, А. А. Беркут*, Я. Титгат**, Р. Г. Ефремов*, ***, А. А. Василевский*, ***, [#], А. О. Чугунов*, ***

*ФГБУН "Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова" РАН,

Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

**KU Leuven, ON II, Belgium, 3000 Leuven, Herestraat 49, box 922

***Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),

Россия, 141701 Долгопрудный, Институтский пер., 9, стр. 3

Поступила в редакцию 01.10.2020 г.

После доработки 23.10.2020 г.

Принята к публикации 25.10.2020 г.

α-Нейротоксины скорпионов – небольшие белки, способные ингибировать инактивацию потенциал-чувствительных натриевых каналов. Они могут селективно действовать на каналы млекопитающих (млекотоксины), каналы насекомых (инсектотоксины) либо на оба типа каналов (α-подобные токсины). Модель, полноценно объясняющая селективность исходя из аминокислотной последовательности, еще не предложена, однако уже установлены некоторые закономерности. Так, у большей части млекотоксинов имеется остаток D8, участвующий в формировании так называемого мотива гнезда, но до сих пор не ясно, участвует ли этот остаток во взаимодействии с каналами. Задачей нашего исследования было получить производное α-подобного токсина ВеМ9 с заменой лизина в 8-м положении на глутамат (К8Е), изменив заряд, но при этом исключив образование мотива гнезда. Кроме того, мы заменили тирозин в 17-м положении на характерный для млекотоксинов глицин (Y17G). Неожиданно оказалось, что производное с двумя заменами BeM9^{EG} утратило активность на каналах млекопитающих, став инсектотоксином. Чтобы объяснить эти изменения, мы построили пространственные модели комплексов BeM9 и BeM9^{EG} с каналами, а также провели расчеты молекулярной динамики изолированных токсинов. Анализ межмолекулярных контактов в комплексах не позволил объяснить причину изменения селективности. Тем не менее структура внутримолекулярных контактов и данные по молекулярной подвижности указывают на важную роль остатков К8 и У17 в стабилизации определенной конформации петель ВеМ9. Мы предполагаем, что замена этих остатков аллостерически влияет на эффективность связывания токсинов с каналами.

Ключевые слова: нейротоксины, потенциал-чувствительные натриевые каналы, белковая инженерия, молекулярная динамика

DOI: 10.31857/S0132342321040060

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время продолжается разработка соединений, способных избирательно воздействовать на мишени в нервной системе насекомых, такие как потенциал-чувствительные натриевые каналы (ПЧНК). ПЧНК – трансмембранные белки, состоящие из четырех гомологичных повторов (D I–IV). Первые четыре спирали (S1–S4) каждого повтора и петли между ними составляют потенциал-чувствительный домен (ПЧД), реагирующий на изменение трансмембранного потенциала; еще две спирали (S5 и S6) входят в состав единого по́рового домена (ПД), пропускающего ионы. Активация ПЧД I–III необходима для открытия ПД, в то время как активация ПЧД IV приводит к быстрой инактивации каналов [1, 2].

Среди природных нейротоксинов находят модуляторы и блокаторы ионных каналов, зачастую имеющие белковую природу и селективно действующие на определенный вид каналов у определенных организмов. В частности, в яде скорпионов найдены так называемые α-токси-

Сокращения: ПД – поровый домен; ПЧД – потенциалчувствительный домен; ПЧНК – потенциал-чувствительные натриевые каналы; ВеМ9^{EG} – производное α-подобного токсина скорпиона; α-NaTx – α-нейротоксины скорпионов.

[#] Автор для связи: (эл. почта: avas@ibch.ru).

ны (α -NaTx), ингибирующие инактивацию ПЧНК за счет связывания с ПЧД IV (петли S1–S2 и S3–S4) и ПД I (петля S5–S6) каналов [3]. Некоторые α -NaTx могут избирательно воздействовать на каналы млекопитающих (их называют млекотоксинами), другие — на каналы насекомых (инсектотоксины), а третьи (α -подобные) характеризуются широким спектром активности [4, 5]. Изучение природы селективности α -NaTx может помочь не только в фундаментальных исследованиях: специфичные инсектотоксины, по-видимому, могут использоваться в качестве инсектицидов, безопасных для позвоночных [6].

В 2013 г. после сравнительного анализа свойств молекулярной поверхности разных групп α-NaTx была выдвинута гипотеза, что их селективность определяется прежде всего модулем специфичности – частью токсина, образованной N-концевой областью (называемой также RT-петлей), петлей в шпильке $\beta_2 - \beta_3$ и *С*-концевой областью токсина, скрепленной с *N*-концевой частью дисульфидной связью (рис. 1а) [7]. Исследованная недавно с помощью криоэлектронной микроскопии структура комплекса млекотоксина Aah2 из яда скорпиона Androctonus australis с химерным ПЧНК показала, что модуль специфичности действительно формирует контакты с каналом, тогда как остальная часть токсина (сердцевинный модуль) практически не взаимодействует с каналом [3].

α-Подобный токсин М9 (BeM9) из яда скорпиона Mesobuthus eupeus (ранее назывался Buthus eupeus) — один из наиболее изученных α -NaTx; его пространственная структура была исследована в Институте биоорганической химии еще в 1980-х гг., став первой изученной структурой α-NaTx [8, 9]. Ранее мы использовали этот α-NaTx для получения на его основе специфичного млекотоксина: на каркас ВеМ9 был перенесен модуль специфичности токсина Aah2; кроме того, потребовалась замена нескольких аминокислотных остатков сердцевинного модуля [10]. Внимательное изучение пространственного строения ВеМ9 выявило ключевое значение остатка R60 в С-концевой области токсина для организации модуля специфичности за счет формирования сети водородных связей с образованием особого варианта мотива "ниши" – так называемой "аргининовой руки" [11]. Мутант R60K теряет возможность взаимодействовать с каналами млекопитающих, становясь инсектотоксином.

В данном исследовании мы сосредоточились на роли другой части модуля специфичности (RT-петле; рис. 16) и получили новое производное BeM9, обладающее избирательностью в отношении ПЧНК насекомых.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор аминокислотных замен для модификации ВеМ9. Сравнение аминокислотных последовательностей α-NaTx показало, что у млекотоксинов в RT-петле присутствует высококонсервативный остаток аспарагиновой кислоты в 8-м положении. У инсектотоксинов и α-подобных токсинов в этом положении обычно имеется нейтральный (Q) или положительно заряженный остаток (К, как у ВеМ9). Интересно при этом, что у классического инсектотоксина ВјαΙТ из яда Hottentotta judaicus здесь, как и у млекотоксинов, находится остаток аспарагиновой кислоты [12]. Внимательный анализ пространственной структуры различных α-NaTx показал, что у млекотоксинов данный остаток участвует в поддержании определенной конформации RT-петли за счет формирования множества водородных связей с –NH-группами основной цепи (так называемый мотив гнезда [13], рис. 1в). Мы решили узнать, играет ли непосредственно отрицательный заряд остатка в 8-м положении важную роль во взаимодействии с каналами млекопитающих. Чтобы при этом предотвратить образование мотива гнезда, мы провели замену К8 у ВеМ9 на остаток не аспаргиновой. а глутаминовой кислоты. длина боковой цепи которой не оптимальна для этого мотива.

Как было обнаружено ранее [7], RT-петля у млекотоксинов характеризуется сравнительно высокой подвижностью. Отчасти это объясняется тем, что на участке, соединяющем RT-петлю с α -спиралью, у млекотоксинов встречается характерный остаток глицина G17 (по нумерации Aah2). На основании анализа аминокислотных последовательностей и пространственной структуры α -NaTx мы предположили, что изменение заряда и подвижности RT-петли за счет двух мутаций (K8E и Y17G, рис. 1*г*) придаст α -подобному токсину BeM9 специфичность к каналам млекопитающих. Для проверки этого предположения мы приступили к получению производных BeM9 с указанными заменами.

Получение рекомбинантного BeM9 и его производных. Для получения достаточного материала для исследования активности мы использовали бактериальную экспрессионную систему и плазмиду, кодирующую BeM9, полученную в предыдущем исследовании [7, 11]. ДНК, кодирующая BeM9-K8E (BeM9^E) и BeM9-K8E,Y17G (BeM9^{EG}), была получена с помощью ПЩР с перекрывающимися синтетическими олигонуклеотидами. Гены целевых полипептидов клонировали в одной рамке считывания с геном белка-носителя тиоредоксина (Trx). Слитные белки Trx-BeM9, Trx-BeM9^E и Trx-BeM9^{EG} выделяли из общего лизата бактериальных клеток с помощью металл-хелатной хроматографии. Целевые полипептиды отделяли от Trx с



Рис. 1. Структура α -NaTx. (*a*) – Общий план строения на примере α -подобного токсина BeM9 (PDB ID: 5MOU [11]). Зеленым цветом выделен модуль специфичности согласно гипотезе [7], состоящий из RT-петли, $\beta_2 - \beta_3$ -петли и *C*-концевого участка, тогда как остальная часть называется сердцевинным модулем; голубым цветом показан β -лист из трех β -тяжей ($\beta_1 - \beta_3$), оранжевым – α -спираль, желтым – связи атомов серы, участвующих в построении дисульфидных мостиков, фиолетовым – аминокислотные остатки, подверженные заменам; (*б*, *в*) – строение RT-петли у BeM9 и типичного млекотоксина Aah2 (PDB ID: 1PTX [14]). У Aah2 наблюдается мотив гнезда: боковая цепь остатка D8 ориентирована внутрь RTпетли и образует водородные связи (показаны красным пунктиром) с –NH-группами основной цепи остатков V10 и N11, тогда как у BeM9 K8 ориентирован наружу и систему связей не образует; (*г*) – сравнение аминокислотных последовательностей BeM9, его двойного мутанта BeM9^{EG} и Aah2. Цветовые обозначения аналогичны панели (*a*).

использованием бромциана. Хроматографическая чистота полипептидов более 95% была достигнута с помощью двух раундов ВЭЖХ.

Корректный синтез целевых полипептидов с образованием дисульфидных связей был подтвержден путем измерения молекулярной массы очищенных продуктов методом MALDI-массспектрометрии: измеренные массы BeM9, BeM9^E и BeM9^{EG} составляли 7335.1, 7336.1 и 7230.1 Да соответственно (расчетные массы 7335.2, 7336.2 и 7230.0 Да); выход – 2 мг с 1 л среды LB. Существенная проблема при гетерологической экспрессии белков — правильное формирование дисульфидных связей. В случае ВеМ9 и его производных эта проблема решается за счет Trx: известно, что он способствует корректному фолдингу дисульфид-содержащих белков [15]. Недавно решенная с помощью спектроскопии ЯМР пространственная структура рекомбинантного ВеМ9 подтверждает корректность образования S–S-мостиков [11].

Изучение активности производных BeM9 на ПЧНК. Эффекты производных BeM9 были изучены в сравнении с исходным токсином в кон-



Рис. 2. Активность токсина BeM9 и его производных на изоформах потенциал-чувствительных натриевых каналов. Показаны токи через мембрану ооцитов, экспрессирующих клонированные изоформы ПЧНК, в контроле и после инкубации с токсинами в концентрации 1 мкМ. Пунктирная линия показывает нулевой уровень тока. Амплитуда тока приведена в условных единицах $I/(|I_{min}|)$ (см. пояснения в "Эксперим. части"). Представлены репрезентативные записи по крайней мере трех независимых экспериментов.

центрации 1 мкМ в отношении ряда ПЧНК. Был применен стандартный подход, подразумевающий экспрессию генов каналов (α -субъединиц и соответствующих вспомогательных β -субъединиц) в ооцитах *Xenopus laevis* (рис. 2). Как и исходный токсин, BeM9^E и BeM9^{EG} не проявляли активности в отношении Na_v1.2, но были активны на канале таракана BgNa_v1, хотя активность стала менее выраженной (табл. 1). В отличие от BeM9, у BeM9^E была резко снижена активность на Na_v1.5 и Na_v1.6, тогда как BeM9^{EG} не проявил активности на этих каналах вообще. Таким образом, BeM9^{EG} не был активен на всех протестированных каналах млекопитающих и был классифицирован как инсектотоксин.

В 2019 г. была определена пространственная структура комплекса химерного канала hNa_v1.7-Na_vPas (фрагменты аминокислотной последовательности канала таракана *Periplaneta americana* Na_vPas, включая внеклеточные петли ПЧД IV и контактирующий участок ПД I, были заменены на соответствующие участки канала человека Na_v1.7) с млекотоксином Aah2 (PDB ID: 6NT4 [3]). Мы предположили, что модели комплексов BeM9 с ПЧНК млекопитающих и насекомых, построенные на ее основе, могут объяснить природу селективности BeM9^{EG}. Для этого

Таблица 1. Активность токсина BeM9 и его производных в отношении потенциал-чувствительных натриевых каналов

Токсин	Na _v 1.2	Na _v 1.4	Na _v 1.5	Na _v 1.6	BgNa _v 1
BeM9	H/a (3)	0.23 ± 0.03 (4)	0.46 ± 0.03 (3)	0.60 ± 0.04 (8)	1.93 ± 0.05 (7)
BeM9 ^E	H/a (3)	H/a (4)	0.05 ± 0.01 (4)	0.05 ± 0.04 (3)	1.16 ± 0.03 (5)
BeM9 ^{EG}	H/a (3)	H/a (4)	H/a (4)	H/a (4)	0.56 ± 0.06 (6)

Примечание: Н/а – нет активности. Указаны значения $I_{30 \text{ мс}}/I_{\min}$ или $I_{5 \text{ мc}}/I_{\min}$ (для Na_v1.5), пояснения в "Эксперим. части". Приведены средние значения ± стандартное отклонение, в скобках указано число независимых экспериментов (*n*).



Рис. 3. Модели комплексов потенциал-чувствительных натриевых каналов с α-токсином BeM9 и его мутантом BeM9^{EG}. (*a*) – Общий вид комплекса ПЧНК с α-NaTx с внеклеточной стороны. ПЧНК изображен цветной поверхностью с индивидуально раскрашенными гомологичными повторами: D I (фиолетовый), D II (синий), D III (голубой), D IV (зеленый). Расположенные в центре части каждого повтора формируют ПД, дистальные части образуют ПЧД I–IV. Токсин (показан оранжевым) связывается с каналом в области ПЧД IV, частично захватывая ПД I; (*b*) – сайт связывания токсина (увеличен). Петля S3–S4 обозначена светло-зеленым, S1–S2 – темно-зеленым, ПД I – фиолетовым, *C*-конец токсина отмечен синей сферой; (*в*, *г*) – ионные связи RT-петли BeM9 с S3–S4-петлей ПЧНК. Желтым показана молекула токсина (BeM9 на панели (*в*) и BeM9^{EG} на панели (*г*)), голубым – Na_vI.4, зеленым – BgNa_v. Оранжевым выделены ключевые аминокислотные остатки токсина, участвующие во взаимодействии с каналами или подверженные мутагенезу.

были построены статичные модели ВеМ9 и ВеМ9^{EG} с каналами Na, 1.4 человека и ВgNa, таракана и изучены межмолекулярные контакты в них (подробности моделирования см. в "Эксперим. части"). Мы ожидали увидеть явное изменение межмолекулярных контактов, способствующее потере аффинности ВеМ9^{EG} к каналам млекопитающих, однако результаты простейшего моделирования этого не показали. Согласно полученной модели, остатки Y17/G17 не формируют контакты с каналом и не могут напрямую влиять на активность токсина. К8 в ВеМ9 не участвует во взаимодействии с каналами, в то время как в ВеМ9^{ЕG} Е8 образует межмолекулярную ионную связь с остатком К1439/1705 (номер остатка у hNa_v1.4/BgNa_v) (рис. 3*в*, 3*г*). Однако в случае BeM9 с К1439/1705 аналогичный контакт тоже имеет место, но его образует другой остаток – Е15.

Анализ комплексов не позволяет сказать, почему изменяется селективность BeM9^{EG}, поскольку структура петли S3–S4 крайне консервативна. Мы предположили, что причина этого явления кроется прежде всего в аллостерических эффектах, что привело нас к анализу изменения структуры и внутримолекулярных контактов у токсина после внесения мутаций. Анализ изменений структуры BeM9, вызванных мутациями. Поскольку мы не смогли объяснить изменения специфичности, моделируя статичные комплексы BeM9/ПЧНК, было решено изучить динамические свойства молекулы токсина BeM9 и его производного BeM9^{EG}. Для этого мы рассчитали для каждого из них молекулярную динамику длительностью 100 нс в трех повторностях, а затем провели поиск структурных изменений с помощью анализа внутримолекулярных контактов нескольких типов: водородных связей, гидрофобных взаимодействий, солевых мостиков, стэкинга и π -катионных взаимодействий, представляя их в виде карты контактов — массива точек 66 × 66 (рис. 4).

Анализ внутримолекулярных контактов, а также вычисление значений среднеквадратичных флуктуаций (Root Mean Square Fluctuation, RMSF) показали, что одна из мутаций (Y17G) повышает подвижность петли перед α -спиралью за счет потери гидрофобных взаимодействий и стэкинга Y17—Y23, а также увеличения гибкости основной цепи за счет введения остатка глицина. Новообразовавшийся в BeM9^{EG} контакт Y14—Y23, по-видимому, не оказывает стабилизирующего действия на данный участок токсина. Ключевые эффекты мутации Y17G показаны на рис. 5.



Рис. 4. Карты внутримолекулярных контактов токсина BeM9 и его мутанта BeM9^{EG}. Координаты каждой точки соответствуют номерам остатков, которые могут образовывать контакт. Интенсивность окраски точек для водородных связей и гидрофобных контактов (см. шкалу справа) пропорциональна доле времени от суммарной длительности трех траекторий молекулярной динамики (3×100 нс), в течение которой этот контакт существует. Остальные типы контактов показаны качественно: если контакт существует более 10% времени, он выделен точкой, если менее – не показан. Контакты, находящиеся в окрестностях RT-петли, обведены красной рамкой и представлены более крупными точками. Красными рамками выделены области наиболее значимых отличий между BeM9 и BeM9^{EG}, отражающие эффекты мутаций K8E и Y17G. Для π -катионных взаимодействий и солевых мостиков приведена одна карта: сверху над диагональю изображены солевые мостики, снизу – π -катионные взаимодействия.

Влияние ключевой мутации К8Е раскрывается через изменение системы солевых мостиков и π -катионных взаимодействий (рис. 6). Мотив гнезда, как и предполагалось, у мутанта не наблюдается (рис. 6б). Кроме того, в ВеМ9 существует стабильная система взаимодействующих пар остатков К8–Ү14 и К8–Е15, смена заряда в 8-й позиции на противоположный разрушает ее за счет отталкивания одноименных зарядов Е8-Е15. Также у мутанта утрачивается контакт Е15-К20, что может объясняться эффектом обеих замен. К8 может балансировать между Y14 и E15, а E15 – между К8 и К20, что может обеспечивать переход между двумя стабильными конформациями ВеМ9, тогда как в BeM9^{EG} структура в целом более подвижна и менее упорядочена.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение рекомбинантных производных BeM9. Синтез нуклеотидных последовательностей, кодирующих BeM9^E и BeM9^{EG}, был проведен с помощью лигирования олигонуклеотидных фрагментов (табл. 2) и ПЦР аналогично описанной ранее процедуре для BeM9 [7, 16]. Полученные полноразмерные последовательности были клонированы в экспрессионный вектор pET-32b (Novagen, США) по сайтам рестрикции KpnI и BamHI. В результате в составе вектора были получены химерные гены слитных белков, состоящих из Trx и токсина: Trx-BeM9^E и Trx-BeM9^{EG}.

Экспрессию химерных генов проводили в штамме *Escherichia coli* BL21(DE3) [17]. Культуру бактерий, трансформированных с использованием экспрессионного вектора, выращивали в среде LB с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) при 37° С и интенсивном перемешивании. Индукцию экспрессии целевых генов осуществляли добавлением в среду 0.2 мМ изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозида, после чего культуру инкубировали еще 4 ч. По истечении этого времени бактерии осаждали, ресуспендировали в стартовом буфере для аффинной хроматографии (300 мМ NaCl, 20 мМ Трис-HCl, pH 7.5) и лизировали с помощью ультразвука.

Слитные белки имели в своем составе гексагистидиновую последовательность, которая позволяет проводить их очистку с помощью металл-хелатной хроматографии [18] на сорбенте TALON Superflow Metal Affinity Resin (Clontech, США). Элюцию сорбированных белков проводили буфером, содержащим имидазол (150 мМ имидазол, 300 мМ NaCl, 20 мМ Трис-HCl, pH 7.5). Последо-



1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49 51 53 55 57 59 61 63 65 Номер остатка

Puc. 5. Влияние мутации Y17G на структуру $BeM9^{EG}$. (*a*) – Дифференциальная карта гидрофобных контактов между BeM9 и BeM9^{EG} в окрестностях RT-петли и α-спирали, полученная вычитанием карт гидрофобных (нижняя левая часть карты) и стэкинговых (верхняя правая часть) контактов BeM9 из BeM9^{EG} (рис. 4). Голубым показана потеря гидрофобных контактов у BeM9^{EG} по сравнению с BeM9, коричневым – их приобретение; интенсивность цвета отражает потерю или приобретение контактов между соответствующими остатками в долях времени от траектории (согласно шкале справа). Синим показана потеря стэкинг-взаимодействия Y17–Y23 у BeM9, красным – формирование стэкинг-взаимодействия Y14–Y23 у BeM9^{EG}; на панелях (*б*, *в*) приведены типичные конформации, выбранные из расчетов молекулярной динамики; (*б*) – структура BeM9: зеленым показаны остатки, участвующие в стэкинг-взаимодействиях; оранжевым – не участвующие в данной структуре, но участвующие в BeM9^{EG}; фиолетовым – остатки, у которых возрастает подвижность после мутации; серым – все другие остатки; (*в*) – структура BeM9^{EG}, но участвующие у BeM9; (*е*) – значения RMSF BeM9 (желтый) и BeM9^{EG} (зеленый), усредненные по трем траекториям. Черная линия под графиком соответствует сердцевинному модулю, синим обозначены β-тяжи, красным – α-спираль, фиолетовым – окрестности замены Y17G, где после мутации возрастает подвижность (та же область, что и на панелях (*б*, *в*)).

вательность производных BeM9 не содержит остатков метионина, поэтому целевые токсины отщепляли от Trx с помощью бромциана по описанной методике [19]. Для этого в последовательность химерных генов был специально введен метиониновый кодон непосредственно перед геном токсина. Очистку отщепленных от Trx производных BeM9 проводили с помощью офВЭЖХ.

Масс-спектрометрия. Полипептиды анализировали с помощью времяпролетной MALDIмасс-спектрометрии с использованием спектрометра Ultraflex TOF-TOF (Bruker Daltonics, США), анализ проводили, как описано ранее [20]. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксибензойную кислоту (Sigma-Aldrich, США). Измерения проводили как в линейном, так и в рефлекторном режимах. Масс-спектры анализировали с помощью программного обеспечения Data Analysis 4.3 и Data Analysis Viewer 4.3 (Bruker, США).

Электрофизиология. Активность полученных производных сравнивали с исходным токсином ВеМ9 по эффекту в отношении ПЧНК, экспрессированных в ооцитах лягушки *X. laevis*. Выделе-



Рис. 6. Влияние мутации К8Е на структуру ВеМ9. Зеленым показаны остатки К8, Y14, E15 и K20, участвующие в ионных и π -катионных взаимодействиях, оранжевым — они же, но не участвующие, серым — другие остатки. Красным пунктиром показаны взаимодействия между остатками. Приведенные конформации взяты из расчетов молекулярной динамики. (*a*) — Структура ВеМ9. Сверху показан солевой мостик K8—E15, снизу — солевой мостик E15—K20 и π -катионное взаимодействие K8—Y14. Слева от структур показаны доли времени моделирования, в течение которых наблюдаются соответствующие контакты, усредненные по трем траекториям; (*б*) — структура ВеМ9^{EG}. Сверху показана структура RT-петли аналогично рис. 1*б* и 1*в*, снизу — общий вид структуры.

ние ооцитов, получение РНК, а также сбор и анализ данных проводили, как описано ранее [7, 10]. Мы использовали гены ряда изоформ ПЧНК млекопитающих: Na_v1.2 и 1.4 крысы (r), Na_v1.5 человека (h), Na_v1.6 мыши (m), вспомогательных субъединиц r β 1 и h β 1, а также α -субъединицы BgNa_v1 и вспомогательной субъединицы ТірЕ, клонированных из генома таракана Blattella ger*manica* и дрозофилы. Для оценки эффективности токсинов мы использовали величину, равную отношению регистрируемой величины тока через мембрану ооцита спустя 30 мс после подачи тестового импульса к пиковому току ($I_{30 \text{ мс}}/I_{\text{min}}$). В случае канала Na, 1.5 из-за быстрой кинетики его работы использовали отношение тока через 5 мс после тестового импульса к пиковому току ($I_{5 \text{ мс}}/I_{\text{min}}$). Все данные анализировали с помощью программного обеспечения pClamp Clampfit версии 10.4 (Molecular Devices, США) и Origin Pro версии 8.0 (Origin-Lab, CIIIA).

Молекулярное моделирование. Для сравнительного анализа использовали комплексы токсинов ВеМ9 и ВеМ9^{EG} с каналами человека Na, 1.4 и таракана BgNa_v. Основой для моделирования стал комплекс химерного канала hNa_v1.7-Na_vPas c Aah2 (PDB ID: 6NT4 [3]), куда путем пространственного совмещения на место Aah2 вставили исследуемые токсины, а на место hNa_v1.7-Na_vPas – исследуемые каналы. Структуры hNa_v1.4 и BgNa_v получили на основе hNa, 1.7-Na, Pas при помощи моделирования по гомологии в программе MODELLER v. 9.19 [21]. На основе шаблона построили 20 моделей и выбрали 3 модели с лучшим показателем оценивающей функции. Для минимизации энергии комплексов использовали вакуумные кубические ячейки ($160 \times 160 \times 160 \text{ Å}^3$), программу GROMACS 5.1.2 [22] и силовое поле amber99sb-ildn.ff [23].

Внутримолекулярные эффекты от мутаций в ВеМ9 оценивали с помощью сравнительного моделирования α-подобного токсина BeM9 дикого

5	n	3
2	v	2

Название Последовательность олигонуклеотида (5'-3') ATATGGTACCATGGCTCGTGACGCTTACATCGCTG M9f1 AACCGCACAACTGCGTTTACGAATGCTACAACCCGAAAGGTTCTT M9f2* M9f2-2* AACCGCACAACTGCGTTTACGAATGCGGCAACCCGAAAGGTTCTT M9f3 ACTGCAACGACCTGTGCACCGAAAACGGTGCTGAATCTGGTTACT M9f4 GCCAGATCCTGGGTAAATACGGTAACGCTTGCTGGTGCATCCA GCTGCCGGACAACGTTCCGATCCGTATCCCGGGTAAATGCC M9f5 AAACGCAGTTGTGCGGTTCAGCGATGTAAGCGTCAC M9r1/2 M9r2/3* TGCACAGGTCGTTGCAGTAAGAACCTTTCGGGTTGT M9r2/3-2* TGCACAGGTCGTTGCAGTAAGAACCTTTCGGGTTGC M9r3/4 ATTTACCCAGGATCTGGCAGTAACCAGATTCAGCAC GAACGTTGTCCGGCAGCTGGATGCACCAGCAAGC M9r4/5 M9r GCAT*GGATCCCTA*GTGGCATTTACCCGGGATAC

Таблица 2. Последовательности синтетических олигонуклеотидов для конструирования ДНК, кодирующей производные токсина BeM9

Примечание: сайты рестрикции (KpnI в M9f1 и BamHI в M9r) выделены курсивным шрифтом, кодон метионина – жирным курсивным шрифтом, стоп-кодон – жирным шрифтом. Подчеркнуты нуклеотиды, отличающиеся от последовательности гена BeM9.

* M9f2 и M9r2/3 использовали для синтеза гена BeM9E, M9f2-2 и M9r2/3-2 – для синтеза гена BeM9EG.

типа (PDB ID: 5MOU) и его двойного мутанта, специфичного к ПЧНК насекомых, — $BeM9^{EG}$. Модель $BeM9^{EG}$ построили на основе гомологии с BeM9 в программе MODELLER v. 9.19 [21].

Для сравнения динамики молекул использовали метод молекулярной динамики. Радиус отсечки ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий составил 10 и 12 Å соответственно. Для расчетов молекулярной динамики токсинов построили кубические ячейки (55 \times 55 \times 55 Å³) с моделью воды SPC [24], содержащие противоионы для электронейтральности и уравновешенные по энергии путем нагревания до 300 К в течение 100 пс. Молекулярную динамику проводили в периодических граничных условиях при T = 300 K и P = 1 бар, поддерживаемых при помощи термостата V-rescale [25] и баростата Берендсена [26] соответственно. Длина и шаг траектории составили 100 нс и 2 фс соответственно. Для каждой изучаемой молекулы было проведено по три независимых расчета для статистического сравнения.

Молекулярные контакты. Для расчета внутрии межмолекулярных контактов использовали программное обеспечение IMPULSE (разработано Н.А. Крыловым, статья готовится к публикации). Все парные взаимодействия, обнаруженные в траекториях, классифицировали как водородные связи, гидрофобные контакты, солевые мостики (ионные связи), параллельный и Т-образный стэкинг на основании взаимного расположения, энергии взаимодействия и типа контактирующих остатков. Полученные данные перевели в формат точечных карт размером 66 × 66, где координаты точек соответствуют номерам остатков, а интенсивность окраски отражает долю времени существования контакта от времени моделирования (100 нс), собственным скриптом Python.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках выполненной работы мы попытались выяснить, какие механизмы стоят за наблюдаемым изменением селективности α -подобного токсина BeM9 при внесении двух замен (K8E и Y17G) в его структуру. Мутации привели к неожиданному результату: BeM9^{EG} потерял активность на каналах млекопитающих, оставшись активным на каналах насекомых, тогда как мы ожидали обратного эффекта. Чтобы выяснить причину такого изменения активности, мы сравнили модели комплексов ПЧНК млекопитающих и насекомых с BeM9 и BeM9^{EG}, а также провели при помощи метода молекулярной динамики сравнительный анализ внутримолекулярных контактов в этих токсинах.

Анализ комплексов показал, что характер взаимодействия с ПЧНК изменяется: остаток К1439/1705 каналов формирует ионную связь с E15 у BeM9, а К8 во взаимодействии не участвует, тогда как в случае BeM9^{EG} с K1439/1705 контактирует остаток E8. Однако петля S3–S4 и, в частности, остаток K1439/1705 консервативны, поэтому построенные модели могут объяснить изменение активности по отношению ко всем ПЧНК, но не изменение селективности токсина. Это показывает, что простые модели комплексов неинформативны, а причина изменения селективности может заключаться в аллостерических эффектах.

Анализ молекулярной динамики изолированных токсинов показал, что в области замены

Y17G BeM9^{EG} имеет бо́льшую подвижность. Это может объясняться потерей стэкингового контакта У17–У23, а также гибкостью основной цепи в области остатка глицина. Замена К8Е разрушает переключаемую систему связей К8-Е15-К20 и Y14-K8-E15, что может уменьшить стабильность RT-петли и ее окружения. В ВеМ9^{ЕG} эти связи утеряны. поэтому RT-петля и ее окрестность становятся более подвижными, и система из двух стабильных конформаций исчезает. Мы предполагаем, что такая перестройка токсина в результате внесения мутаций и приводит в конечном итоге к нарушению стабильности его комплекса с ПЧНК млекопитающих. Дальнейшее детальное изучение структуры и конформационной мобильности модуля специфичности α -NaTx может раскрыть природу "двойной" активности α-подобных токсинов и способствовать созданию селективных лигандов на различные типы ПЧНК.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-44-01015).

Я. Титгат благодарит за поддержку Исследовательский фонд Фландрии (FWO, гранты G0C2319N, G0A4919N и G0E7120N). С. Пеньёр выражает благодарность за финансирование Лёвенскому университету (PDM/19/164).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с лягушками проводились в соответствии с принципами ARRIVE (Animal Research: Reporting of *in Vivo* Experiments) и Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 18.III.1986).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Catterall W.A. // Neurochem. Res. 2017. V. 42. P. 2495–2504. https://doi.org/10.1007/s11064-017-2314-9
- Capes D.L., Goldschen-Ohm M.P., Arcisio-Miranda M., Bezanilla F., Chanda B. // J. Gen. Physiol. 2013. V. 142. P. 101–112. https://doi.org/10.1085/jgp.201310998
- Clairfeuille T., Cloake A., Infield D.T., Llongueras J.P., Arthur C.P., Li Z.R. // Science. 2019. V. 363. P. eaav8573. https://doi.org/10.1126/science.aav8573
- 4. Bosmans F., Tytgat J. // Toxicon. 2007. V. 49. P. 142-158.

- Gordon D., Karbat I., Ilan N., Cohen L., Kahn R., Gilles N. // Toxicon. 2007. V. 49. P. 452–472. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.09.023
- King G.F. // Pest Manag. Sci. 2019. V. 75. P. 2437–2445. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.016
- Chugunov A.O., Koromyslova A.D., Berkut A.A., Peigneur S., Tytgat J., Polyansky A.A. // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. P. 19014–19027. https://doi.org/10.1002/ps.5452
- Pashkov V.S., Anh Hoang N., Maiorov V.N., Bystrov V.F. // Peptides. 1988. P. 77–78. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.431650
- Pashkov V.S., Khoang N.A., Maiorov V.N., Bystrov V.F. // Bioorg. Khim. 1986. V. 12. P. 1306–1316. https://doi.org/10.1007/978-94-010-9595-2 21
- Kuldyushev N.A., Berkut A.A., Peigneur S., Tytgat J., Grishin E.V., Vassilevski A.A. // FEBS Lett. 2017. V. 591. P. 3414–3420. https://doi.org/10.1002/1873-3468.12839
- Kuldyushev N.A., Mineev K.S., Berkut A.A., Peigneur S., Arseniev A.S., Tytgat J. // Proteins. 2018. V. 86. P. 1117– 1122. https://doi.org/10.1002/prot.25583
- 12. Arnon T., Potikha T., Sher D., Elazar M., Mao W., Tal T. // Insect Biochem. Mol. Biol. 2005. V. 35. P. 187–195. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.11.005
- Watson J.D., Milner-White E.J. // J. Mol. Biol. 2002.
 V. 315. P. 171–182. https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5227
- Housset D., Habersetzer-Rochat C., Astier J.P., Fontecilla-Camps J.C. // J. Mol. Biol. 1994. V. 238. P. 88–103. https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1270
- LaVallie E.R., DiBlasio E.A., Kovacic S., Grant K.L., Schendel P.F., McCoy J.M. // Biotechnology. 1993. V. 11. P. 187–193. https://doi.org/10.1038/nbt0293-187
- Shlyapnikov Y.M., Andreev Y.A., Kozlov S.A., Vassilevski A.A., Grishin E.V. // Protein Expr. Purif. 2008. V. 60. P. 89–95. https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.03.011
- Studier F.W., Moffatt B.A. // J. Mol. Biol. 1986. V. 189.
 P. 113–130. https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2
- Hochuli E., Bannwarth W., Döbeli H., Gentz R., Stüber D. // Nat. Biotechnol. 1988. V. 6. P. 1321–1325. https://doi.org/10.1038/nbt1188-1321
- Andreev Y.A., Kozlov S.A., Vassilevski A.A., Grishin E.V. // Anal. Biochem. 2010. V. 407. P. 144–146. https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.07.023
- Kuzmenkov A.I., Sachkova M.Y., Kovalchuk S.I., Grishin E.V., Vassilevski A.A. // Biochem. J. 2016. V. 473. P. 2495–2506. https://doi.org/10.1042/BCJ20160436
- Webb B., Sali A. // Curr. Protoc. Bioinformatics. 2016. V. 54. P. 5.6.1–5.6.37. https://doi.org/10.1002/cpbi.3

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 47 № 4 2021

mal toxins have an aspartic acid residue in position 8, which is involved in the formation of the nest motif, but it is still not clear whether this residue interacts directly with channels. The objective of our study was to obtain a derivative of the α -like toxin BeM9 with the replacement of lysine in position 8 by glutamate (K8E), changing the charge, but excluding the formation of the nest motif. In addition, we replaced the tyrosine in position 17 with glycine (Y17G), which is characteristic of mammal toxins. Surprisingly, the double-mutant derivative $BeM9^{EG}$ lost its activity on mammalian channels, becoming an insect toxin. To explain these changes, we constructed models of BeM9 and BeM9^{EG} complexes with channels, and also performed molecular dynamics of isolated toxins. Analysis of intermolecular contacts in the complexes did not explain the reason for the selectivity change. Nevertheless, the structure of intramolecular contacts and data on molecular mobility indicate an important role of residues K8 and Y17 in stabilizing a certain conformation of BeM9 loops. We assume that the replacement of these residues allosterically affects the efficiency of toxin binding to channels. Keywords: neurotoxins, voltage-gated sodium channels, protein engineering, molecular dynamics

both types of channels (α -like toxins). Currently no model has been proposed to fully explain the dependence of selectivity upon amino acid sequence, but some patterns have already been established. Thus, most mam-

#E-mail: avas@ibch.ru *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,

M. A. Chernykh*, N. A. Kuldyushev*, S. Peigneur**, A. A. Berkut*, J. Tytgat**, R. G. Efremov*, ***, A. A. Vassilevski^{*, ***, #}, and A. O. Chugunov^{*, ***}

> ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia **KU Leuven, ON II, Herestraat 49, box 922 Leuven, 3000 Belgium ***Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University) Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, 141701 Russia

Scorpion α -neurotoxins are small proteins able to inhibit the inactivation of voltage-gated sodium channels. They can selectively act on mammalian channels (mammal toxins) or insect channels (insect toxins) or affect

for Insect Voltage-Gated Sodium Channels

24. Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D., Impey R.W., Klein M.L. // J. Chem. Phys. 1983. V. 79. **Derivative of Scorpion Neurotoxin BeM9 Is Selective**

22. Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C.,

23. Lindorff-Larsen K., Piana S., Palmo K., Maragakis P.,

Klepeis J.L., Dror R.O. // Proteins. 2010. V. 78.

Hess B. // SoftwareX. 2015. V. 1–2. P. 19–25.

https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001

https://doi.org/10.1002/prot.22711

P. 1950-1958.

P. 926-935. https://doi.org/10.1063/1.445869

- 25. Bussi G., Donadio D., Parrinello M. // J. Chem. Phys. 2007. V. 126. P. 014101. https://doi.org/10.1063/1.2408420
- 26. Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F., DiNola A., Haak J.R. // J. Chem. Phys. 1984. V. 81. P. 3684-3690. https://doi.org/10.1063/1.448118



УДК 547.789.18:547.796.1

СИНТЕЗ, ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ 2-(5-АРИЛТЕТРАЗОЛ-2-ИЛ)-И 2-(1*H*-ТЕТРАЗОЛ-5-ИЛСУЛЬФАНИЛ)-*N*-ТИАЗОЛ-2-ИЛАЦЕТАМИДОВ

© 2021 г. Т. И. Чабан*, В. Т. Фолюш**, В. В. Огурцов*, В. С. Матийчук**, #

*Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, Украина, 79010 Львов, ул. Пекарская, 69

**Львовский национальный университет имени Ивана Франко, Украина, 79005 Львов, ул. Кирилла и Мефодия, 6

> Поступила в редакцию 24.08.2020 г. После доработки 21.09.2020 г. Принята к публикации 24.09.2020 г.

Взаимодействием хлорацетамидотиазола с 5-арилтетразолами и 5-меркаптотетразолами получены 2-(5-арилтетразол-2-ил)- и 2-(1*H*-тетразол-5-илсульфанил)-*N*-тиазол-2-илацетамиды. Проведено исследование противовоспалительных свойств синтезированных соединений *in vivo* на модели каррагенинового воспалительного отека лап крыс линии Вистар. Идентифицированы соединения, активность которых превышает активность препарата сравнения ибупрофена. Проведен молекулярный докинг к циклооксигеназе-1 и циклооксигеназе-2. Показано, что 2-[1-(2,5-диметилфенил)-1*H*-тетразол-5-илсульфанил]-*N*-тиазол-2-илацетамид обладает наибольшей аффиностью к активным центрам циклооксигеназа.

Ключевые слова: 2-аминотиазол, тетразол, алкилирование, противовоспалительная активность, молекулярный докинг

DOI: 10.31857/S0132342321040059

введение

Химия тиазол-содержащих соединений – динамично развивающийся раздел органической химии. Это обусловлено как теоретическим интересом, так и большим практическим значением соединений такого типа. Производные тиазола присутствуют в природных объектах и широко используются в качестве лекарственных средств. Важное место среди веществ этого класса занимают соединения, содержащие 2-аминотиазольный цикл и обладающие противоопухолевой, противовоспалительной, противовирусной, противомикробной и другими видами активности, а также нейропротекторным действием [1-6]. Такие соединения служат действующим веществом лекарственных препаратов. В частности, это известные препараты фамотидин, абафунгин, цефдинир, судоксикам, мелоксикам, прамипексол [7]. На сегодняшний день 2-аминотиазольный фрагмент принято считать привилегированной структурой в медицинской химии [1, 2].

Не меньший интерес вызывают соединения, содержащие тетразольный цикл. Они обладают достаточно широким спектром фармакологической активности. Среди этого класса соединений найдены вещества, которые находятся на разных этапах биологических испытаний [8–10]. Кроме того, тетразольный цикл — биоизостерный к карбоксильной группе, что делает производные тетразола удобными конструкционными блоками в синтезе структур с высокой биологической активностью [10]. Следует отметить, что среди производных как тиазола [11–13], так и тетразола [14–16] найдены вещества, обладающие противовоспалительными свойствами.

Мы предположили, что соединения, сочетающие тетразольный и 2-аминотиазольный циклы в одной молекуле, могут обладать ценными фармакологическими свойствами. Таким образом, целенаправленный синтез новых соединений среди этого класса гетероциклов и дальнейшая оценка их биологической активности представляет научный и практический интерес.

Цель данной работы — синтез, исследования противовоспалительной активности и молекулярный докинг серии 2-(5-арилтетразол-2-ил)- и

Сокращения: ЦОГ – циклооксигеназа.

[#] Автор для связи: (тел.: +38 (067) 675-16-83; эл. почта: v_matiychuk@ukr.net).

2-(1*Н*-тетразол-5-илсульфанил)-*N*-тиазол-2-ил-ацетамидов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Развивая наши работы в области дизайна биологически активных азолов [17–29], мы осуществили синтез и изучили противовоспалительные свойства тиазол-тетразольных коньюгатов (**IVa**–d) и (**Va**–i). Нами установлено, что при кипячении спиртовых растворов хлорацетамидотиазола (I) с 5-арилтетразолами (IIa-d) в присутствии гидроксида калия с высокими выходами образуются 2-(5-арилтетразол-2-ил)-*N*-тиазол-2-илацетамиды (IVa-d) (схема 1). В аналогичных условиях при взаимодействии соединения (I) с 5-меркаптотетразолами (IIIa-i) образовывались 2-(1*H*-тетразол-5-илсульфанил)-*N*-тиазол-2-илацетамиды (Va-i) (схема 1).



Схема 1. Синтез 2-(5-арилтетразол-2-ил)- и 2-(1*Н*-тетразол-5-илсульфанил)-*N*-тиазол-2-илацетамидов (**IVa**-d) и (**Va**-i).

Строение полученных соединений подтверждено при помощи ¹Н-ЯМР-спектроскопии и элементного анализа. Сигналы всех протонов находятся в областях, которые соответствуют структуре молекулы. В частности, сигнал метиленовой группы представлен в виде синглета при 4.43–5.83 м.д. Ароматические сигналы указанных соединений наблюдаются в виде системы дублетов и мультиплетов в относительно широких пределах – в области 7.30–8.10 м.д. Сигналы тиазольного цикла представлены дуплетами или мультиплетами и находятся в области 7.12–7.50 м.д. Также для данных соединений характерны синглеты NH-групп, сигналы которых наблюдаются при 12.52–12.77 м.д. Противовоспалительная активность синтезированных соединений (IVa-d) и (Va-i). Классическим примером острого воспаления считают экссудативное воспаление. Противовоспалительную активность синтезированных соединений (IVa-d) и (Va-i) *in vivo* оценивали с использованием функциональной модели каррагенин-индуцированного отека лапы крысы [30]. Для сравнения в аналогичных условиях изучали противовоспалительный эффект известного лекарственного средства ибупрофена в дозе 50 мг.

Результаты этого исследования приведены в табл. 1. Как видно из представленных данных, синтезированные соединения проявляют различную противовоспалительную активность — от

Соединение или лекарственное средство	Объем отека лапы, мл	Ингибирование воспалительной реакции, %	Активность относительно ибупрофена, %	
Контроль	2.20 ± 0.050	_	_	
(IVa)	1.71 ± 0.040	22.1	55.6	
(IVb)	1.30 ± 0.020	40.5	100	
(IVc)	1.80 ± 0.045	15.8	39.0	
(IVd)	1.73 ± 0.045	21.5	53.5	
(Va)	1.61 ± 0.045	26.9	66.9	
(Vb)	1.30 ± 0.020	26.1	64.4	
(Vc)	1.80 ± 0.045	33.6	82.9	
(Vd)	1.30 ± 0.020	41.0	101.9	
(Ve)	1.21 ± 0.025	44.8	111.5	
(Vf)	1.23 ± 0.025	21.5	53.5	
(V g)	1.34 ± 0.020	6.2	15.3	
(Vh)	1.35 ± 0.025	32.7	80.8	
(Vi)	1.32 ± 0.020	40.0	99.5	
Ибупрофен	1.31 ± 0.020	40.5	100	

Таблица 1. Противовоспалительное действие соединений (IVa-d), (Va-i) и ибупрофена *in vivo* на модели каррагенинового воспалительного отека лап крыс линии Вистар

практически полного ее отсутствия до выраженного противовоспалительного эффекта. В частности, среди 2-(5-арилтетразол-2-ил)-*N*-тиазол-2-илацетамидов только для соединения (IVb) показатель ингибирования воспалительной реакции составлял 40.5%, что соизмеримо с данным показателем препарата сравнения ибупрофена. Для всех остальных 2-(5-арилтетразол-2-ил)-*N*-тиазол-2-илацетамидов противовоспалительной эффект был ниже стандартного показателя. Значительно более выраженную противовоспалительную активность 2-(1Н-тетразол-5-илсульфанил)-Nпроявляли тиазол-2-илацетамиды. В процессе изучения их противовоспалительной активности выделены три высокоактивные соединения (Vd), (Ve) и (Vi) с выраженным противовоспалительным эффектом, которые по показателям активности приближаются к аналогичным показателям препарата сравнения ибупрофена или превышают его действие.

Молекулярный докинг. Молекулярный докинг синтезированных соединений проводили с использованием программного пакета ОрепЕуе (https://www.eyesopen.com), выявлено их связывание с целевыми белками циклооксигеназами (ЦОГ) – ЦОГ-1 (1НТ5) и ЦОГ-2 (1СХ2), кристаллографические модели которых доступны в Protein Data Bank (www.rcsb.org). В качестве референтных соединений были использованы нестероидные противовоспалительные препараты из группы неселективных ингибиторов ЦОГ-1 (аспирин, диклофенак, ибупрофен, флурбипрофен, индометацин, кетопрофен, кеторолак), а также селективные ингибиторы ЦОГ-2 (мелоксикам, парекоксиб, лумиракоксиб, эторикоксиб). Перед проведением молекулярного докинга с помощью программы Omega 2 (https://www.eyesopen.com/omega) были сгенерированы возможные R-, S-, цис- и транс-изомеры лигандов и их конформеры. Молекулярный докинг сгенерированных соединений проводили с помощью программы Hybrid (https://www.eyesopen.com/search?term=hybrid), в которой для увеличения эффективности докинга используется информация, имеющаяся как в кристаллографической модели белка, так и в связанном с ним лиганде соответствующей модели. В результате получены величины скоринг-функции связывания (Hybrid Chemgauss4), в соответствии с которыми были ранжированы все исследованные соединения. В табл. 2 приведены рассчитанные величины скоринг-функции связывания с активными центрами ЦОГ-1 и ЦОГ-2.

Анализ полученных результатов молекулярного докинга показывает, что наибольшей аффиностью к активным центрам ЦОГ-1 и ЦОГ-2 обладает соединение (Ve). С использованием онлайнсервиса ProteinsPlus (https://proteins.plus) программой PoseView была выполнена 2D-визуализация связывания соединения (Ve) с активным центром циклооксигеназ (рис. 1). Связывание (Ve) с ЦОГ-1 происходит за счет образования двух водородных связей между лигандом и остатком Arg120A и гидрофобного взаимодействия с Leu352A, а в случае ЦОГ-2 образуются четыре водородные связи с Таблица 2. Величины скоринг-функции связывания исследованных соединений (IVa-d), (Va-i) и лекарственных средств циклооксигеназами

Соединение или лекарственное	Скоринг-функция связывания (HYBRID Chemgauss4)			
средство	1НТ5 (ЦОГ-1)	1СХ2 (ЦОГ-2)		
(IVa)	-5.8473	-6.5476		
(IVb)	-7.5894	-8.3473		
(IVc)	-6.8277	-9.8217		
(IVd)	-6.7695	-10.6436		
(Va)	-8.1091	-10.0272		
(Vb)	-6.6314	-8.8806		
(Vc)	-6.6273	-9.5729		
(Vd)	-7.1038	-10.2140		
(Ve)	-8.3798	-11.0332		
(Vf)	-6.2448	-10.7495		
(V g)	-6.6809	-8.7692		
(Vh)	-7.4041	-6.0411		
(Vi)	-5.9017	-7.6315		
Аспирин	-7.9772	-8.0863		
Диклофенак	-8.2990	-9.6989		
Эторикоксиб	0.4897	-10.4658		
Флурбипрофен	-12.7276	-9.2395		
Ибупрофен	-12.1261	-7.8091		
Индометацин	-8.8432	-7.5284		
Кетопрофен	-10.0030	-6.4256		
Кеторолак	-9.9825	-10.2856		
Лумиракоксиб	-10.3117	-9.7306		
Мелоксикам	-6.6105	-11.2182		
Парекоксиб	-8.2737	-10.4472		

остатками Arg513D, Tyr355D, Leu352D и происходит гидрофобное взаимодействие с остатками Val523D, Leu352D, Ala527D.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и оборудование. Спектры ¹Н-ЯМР (δ , м.д., *J*, Гц) растворов веществ в DMSO-*d*₆ регистрировали на спектрометре Mercury VX-400 (400 МГц; Varian, США), внутренний стандарт – ТМС. Температуры плавления синтезированных соединений определяли в открытых капиллярных трубках на электротермическом приборе ПТП-М (МЛК-Сервис, Россия). Контроль за ходом реакций осуществляли методом ТСХ на пластинах Silica gel 60 F254 (Merck, Германия). Элементный анализ выполняли на приборе Еlementar Vario L сиbe (Elementar Analysensysteme GmbH, Германия). В качестве исходных соединений использо-

вали коммерчески доступные реагенты (Merck, Германия; Sigma-Aldrich, США).

Общая методика синтеза 2-(5-арилтетразол-2ил)-*N*-тиазол-2-илацетамидов (IVa-d) и 2-(1*H*тетразол-5-илсульфанил)-*N*-тиазол-2-илацетамидов (Va-i). В круглодонную колбу с обратным холодильником помещали 0.53 г (3 ммоль) хлорацетамидотиазола (I), 3 ммоль 5-арилтетразола (IIa-d) или 5-меркаптотетразола (IIIa-i), 0.17 г (3 ммоль) гидроксида калия и 10 мл этанола. Реакционную смесь кипятили 5 ч, охлаждали и разбавляли 50 мл воды. Осадок отфильтровывали и перекристаллизовывали из смеси спирт–DMF (1:1).

2-(5-Фенилтетразол-2-ил)-N-тиазол-2-илацетамид (IVa). Выход 59%. Т. пл. 140–145°С. Спектр ¹Н-ЯМР (*J*, Гц): 12.77 (с, 1Н, NН), 8.10 (дд, *J* 9.2, 2Н, С₆Н₅), 7.56–7.48 (м, 3Н, С₆Н₅), 7.43 (д, *J* 3.5, 1Н, тиазол), 7.12 (д, *J* 3.4, 1Н, тиазол), 5.81 (с, 2Н, СН₂). Найдено, %: С 50.28; Н 3.47; N 29.40. С₁₂Н₁₀N₆OS. Вычислено, %: С 50.34; Н 3.52; N 29.35.

2-[5-(2-Метилфенил)-2Н-тетразол-2-ил]-Nтиазол-2-илацетамид (IVb). Выход 60%. Т. пл. 135–136°С. Спектр ¹Н-ЯМР (*J*, Гц): 12.74 (с, 1H, NH), 7.97 (д, *J* 7.4, 2H, C₆H₄), 7.44 (д, *J* 3.5, 1H, тиазол), 7.41–7.30 (м, 3H, C₆H₄), 7.12 (д, *J* 3.6, 1H, тиазол), 5.82 (с, 2H, CH₂). Найдено, %: С 51.96; H 4.04; N 27.91. С₁₃H₁₂N₆OS. Вычислено, %: C 51.99; H 4.03; N 27.98.

2-[5-(4-Метилфенил)-2H-тетразол-2-ил]-Nтиазол-2-илацетамид (IVc). Выход 68%. Т. пл. 160–161°С. Спектр ¹Н-ЯМР (*J*, Гц): 12.70 (с, 1H, NH), 7.97 (д, *J* 7.9, 2H, C₆H₄), 7.44 (д, *J* 3.5, 1H, тиазол), 7.32 (д, *J* 8.1, 2H, C₆H₄), 7.13 (д, *J* 3.6, 1H, тиазол), 5.79 (с, 2H, CH₂), 2.42 (с, 3H, CH₃). Найдено, %: С 52.12; H 4.11; N 28.00. С₁₃H₁₂N₆OS. Вычислено, %: С 51.99; H 4.03; N 27.98.

2-[5-(4-Хлорфенил)-2H-тетразол-2-ил]-N*тиазол-2-илацетамид (IVd).* Выход 71%. Т. пл. 180–181°С. Спектр ¹Н-ЯМР (*J*, Гц): 12.73 (с, 1H, NH), 8.10 (д, *J* 7.9, 2H, C₆H₄), 7.55 (д, *J* 8.0, 1H, C₆H₄), 7.44 (д, *J* 3.6, 2H, тиазол), 7.14 (д, *J* 3.6, 1H, тиазол), 5.83 (с, 2H, CH₂). Найдено, %: С 44.85; H 2.79; N 26.15. C₁₂H₉ClN₆OS. Вычислено, %: C 44.93; H 2.83; N 26.20.

2-{[1-(2-Метилфенил)-1Н-тетразол-5-ил]тио}-*N*-тиазол-2-илацетамид (Va). Выход 85%. Т. пл. 201–202°С. Спектр ¹Н-ЯМР (*J*, Ги): 12.56 (с, 1Н, NH), 7.63–7.46 (м, 5Н, С₆Н₄ + тиазол), 7.24 (д, *J* 3.6, 1Н, тиазол), 4.45 (с, 2Н, СН₂), 2.06 (с, 3Н, СН₃). Найдено, %: С 47.11; Н 3.59; N 25.25. С₁₃Н₁₂N₆OS₂. Вычислено, %: С 46.97; Н 3.64; N 25.28.

2-{[1-(3-Метилфенил)-1Н-тетразол-5-ил]тио}-N-тиазол-2-илацетамид (Vb). Выход 79%. Т. пл. 190–191°С. Спектр ¹Н-ЯМР (*J*, Гц): 12.56 (с, 1Н, NH), 7.59–7.47 (м, 5Н, С₆Н₄ + тиазол), 7.24 (д, *J* 3.6,



Рис. 1. 2D-визуализация связывания соединения (Ve) с активным центром: (a) – ЦОГ-1 (1HT5); (b) – ЦОГ-2 (1CX2).

1Н, тиазол), 4.46 (с, 2Н, CH₂), 2.43 (с, 3Н, CH₃). Найдено, %: С 46.92; Н 3.70; N 25.35. С₁₃Н₁₂N₆OS₂. Вычислено, %: С 46.97; Н 3.64; N 25.28.

2-[1-(2-Этилфенил)-1Н-тетразол-5-илсульфанил]-N-тиазол-2-илацетамид (Vc). Выход 79%. Т. пл. 185–186°С. Спектр ¹Н-ЯМР (*J*, Гц): 12.56 (с, 1H, NH), 7.68–7.49 (м, 5H, C₆H₄ + тиазол), 7.25 (д, *J* 3.6, 1H, тиазол), 4.46 (с, 2H, CH₂), 2.33 (дд, *J* 7.6, 2H, CH₂), 1.03 (т, *J* 7.5, 3H, CH₃). Найдено, %: C 48.41; H 3.95; N 25.25. C₁₄H₁₄N₆OS₂. Вычислено, %: C 48.54; H 4.07; N 24.26.

2-[1-(4-Изопропилфенил)-1Н-тетразол-5-илсульфанил]-N-тиазол-2-илацетамид (Vd). Выход 87%. Т. пл. 199–200°С. Спектр ¹Н-ЯМР (*J*, Гц): 12.56 (с, 1Н, NH), 7.60 (д, *J* 8.6, 2H, C₆H₄), 7.54 (д, *J* 8.6, 2H, C₆H₄), 7.50 (д, *J* 3.6, 1H, тиазол), 7.25 (д, *J* 3.6, 1H, тиазол), 4.46 (с, 2H, CH₂), 3.06–2.99 (м, 1H, CH), 1.27 (с, 3H, CH₃), 1.25 (с, 3H, CH₃). Найдено, %: С 49.88; H 4.54; N 23.39. C₁₅H₁₆N₆OS₂. Вычислено, %: С 49.98; H 4.47; N 23.31.

2-[1-(2,5-Диметилфенил)-1Н-тетразол-5-илсульфанил]-N-тиазол-2-ил-ацетамид (Ve). Выход 76%. Т. пл. 223–224°С. Спектр ¹Н-ЯМР (*J*, Гц): 12.54 (с, 1Н, NН), 7.50 (д, *J* 3.6, 1Н, тиазол), 7.45– 7.40 (м, 2Н, С₆Н₃), 7.32 (с, 1Н, С₆Н₃), 7.25 (д, *J* 3.6, 1Н, тиазол), 4.44 (с, 2Н, СН₂), 2.35 (с, 3Н, СН₃), 2.00 (с, 3Н, СН₃). Найдено, %: С 48.47; Н 4.12; N 24.39. С₁₄Н₁₄N₆OS₂. Вычислено, %: С 48.54; Н 4.07; N 24.26.

2-[1-(2-Фторфенил)-1Н-тетразол-5-илсульфанил]-N-тиазол-2-илацетамид (Vf). Выход 83%. Т. пл. 214–215°С. Спектр ¹Н-ЯМР (*J*, Гц): 12.54 (с, 1H, NH), 7.84–7.77 (м, 2H, С₆Н₄), 7.67 (т, *J* 9.1, 1H, С₆Н₄), 7.55–7.50 (м, 2H, С₆Н₄ + тиазол), 7.25 (д, *J* 3.6, 1Н, тиазол), 4.47 (с, 2Н, CH₂). Найдено, %: C 42.79; Н 2.66; N 24.84. C₁₂H₉FN₆OS₂. Вычислено, %: C 42.85; Н 2.70; N 24.98.

2-[1-(4-Хлорфенил)-1Н-тетразол-5-илсульфанил**]**-*N*-тиазол-2-илацетамид (*Vg*). Выход 88%. Т. пл. 240–241°С. Спектр ¹Н-ЯМР (*J*, Гц): 12.52 (с, 1Н, NН), 7.77 (с, 4Н, С₆Н₄), 7.50 (д, *J* 3.5, 1Н, тиазол), 7.25 (д, *J* 3.5, 1Н, тиазол), 4.46 (с, 2Н, СН₂). Найдено, %: С 40.64; Н 2.60; N 23.96. С₁₂Н₉ClN₆OS₂. Вычислено, %: С 40.85; Н 2.57; N 23.82.

2-[1-(2-Метил-5-хлорфенил)-1Н-тетразол-5илсульфанил]-N-тиазол-2-илацетамид (Vh). Выход 81%. Т. пл. 236–237°С. Спектр ¹Н-ЯМР (*J*, Гц): 12.56 (с, 1Н, NН), 7.81–7.69 (м, 2Н, С₆Н₄), 7.60 (д, *J* 8.4, 1Н, С₆Н₄), 7.50 (д, *J* 3.5, 1Н, тиазол), 7.25 (д, *J* 3.5, 1Н, тиазол), 4.45 (с, 2Н, СН₂), 2.04 (с, 3H, СН₃). Найдено, %: С 42.51; Н 2.98; N 22.88. С₁₃Н₁₁СІN₆OS₂. Вычислено, %: С 42.56; Н 3.02; N 22.91.

2-(1-Бензил-1Н-тетразол-5-илсульфанил)-*Nтиазол-2-илацетамид (Vi)*. Выход 72%. Т. пл. 160–161°С. Спектр ¹Н-ЯМР (*J*, Гц): 12.52 (с, 1Н, NH), 7.50 (д, *J* 3.5, 1Н, тиазол), 7.44–7.36 (м, 3Н, C₆H₅), 7.31 (д, *J* 8.0, 2H, C₆H₅), 7.25 (д, *J* 3.5, 1Н, тиазол), 5.62 (с, 2H, N-CH₂), 4.41 (с, 2H, S-CH₂). Найдено, %: С 46.80; Н 3.55; N 25.33. C₁₃H₁₂N₆OS₂. Вычислено, %: С 46.97; Н 3.64; N 25.28.

Противовоспалительная активность соединений (IVa-d) и (Va-i). Влияние на протекание экссудативной фазы воспаления изучали на модели каррагенинового воспалительного отека лап крыс линии Вистар обоих полов весом 180–250 г (*n* = 75, питомник Львовского национального медицин-

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 47 № 4 2021

ского университета имени Данила Галицкого). Животные были разделены на 15 групп по пять крыс на группу. Одну группу использовали в качестве контрольной, остальные 14 групп (тестовые группы) – для определения противовоспалительной активности, вызванной ибупрофеном и 13 соединениями: (IVa-d) и (Va-i). Препарат сравнения ибупрофен (50 мг/кг массы тела) и испытуемые соединения (50 мг/кг массы тела) растворяли в DMSO и вводили внутрибрюшинно. Животным контрольной группы вводили DMSO в объеме 0.1 мл. Через 30 мин 0.1 мл 2%-ного раствора каррагенина в физиологическом растворе вводили под подошвенную область правой задней лапы каждой крысы. Через 4 ч после введения каррагинина объем отека лапы (мл) измеряли с помощью водяного плетизмометра (Orchid Scientific, Индия) и сравнивали уменьшение отека лапы у крыс тестовых групп по сравнению с крысами контрольной группы.

Ингибирование воспалительной реакции выражали в процентах от уменьшения объема лапы и рассчитывали по следующей формуле:

Ингибирование (%) =
$$\frac{V_{\kappa} - V}{V_{\kappa}} \times 100$$
,

где $V_{\rm k}$ — увеличение объема лапы у контрольной группы животных; V — увеличение объема лапы у животных, которым вводили исследуемые вещества.

Молекулярный докинг. Молекулярный докинг выполняли с помощью программного пакета OpenEye (OpenEye Scientific Software Inc., США; https://www.eyesopen.com), который позволяет проводить *in silico* поиск молекул, обладающих сродством к определенным биомишеням. Двумерные диаграммы трехмерной структуры комплексов белок—лиганд создавали с использованием программы PoseView онлайн-сервиса ProteinsPlus (https://proteins.plus).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезирована серия 2-(5-арилтетразол-2ил)- и 2-(1*H*-тетразол-5-илсульфанил)-*N*-тиазол-2-илацетамидов. Исследовано *in vivo* противовоспалительное действие полученных соединений на модели каррагенинового отека лап крыс линии Вистар. Найдены соединения, активность которых превышает активность препарата сравнения ибупрофена. Результаты молекулярного докинга показывают, что наибольшей аффиностью к активным центрам ЦОГ-1 и ЦОГ-2 обладает соединение (Ve).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования на крысах линии Вистар проводились в соответствии с нормами и принципами Дирек-

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 47 № 4 2021

тивы Совета ЕС по вопросам защиты позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Nevagi R.J. // Pharm. Let. 2014. V. 6. P. 134-150.
- Das D., Sikdar P., Bairagi M. // Eur. J. Med. Chem. 2016. V. 109. P. 89–98. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.12.022
- 3. *Kumar S., Patil M.T., Kataria R., Salunke D.B.* // In: Chemical Drug Design. Walter de Gruyter GmbH & Co KG, 2016. P. 243–281. https://doi.org/10.1515/9783110368826-013
- 4. *Chhabria M.T., Patel S., Modi P., Brahmkshatriya P.S.* // Curr. Top. Med. Chem. 2016. V. 16. P. 2841–2862. https://doi.org/10.2174/1568026616666160506130731
- Elewa S.I., Mansour E., Nassar I.F., Mekawey A.A.I. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 382–392. https://doi.org/10.1134/S1068162020030061
- El-Helw E.A., Derbala H.A., El-Shahawi M.M., Salem M.S., Ali M.M. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 42–53. https://doi.org/10.1134/S1068162019010047
- Kleemann A., Engel J., Kutscher B., Reichert D. // Pharmaceutical Substances: Syntheses, Patents, Applications. 4th ed. Stuttgart, New York: Thieme, 2001.
- Wei C.X., Bian M., Gong G.H. // Molecules. 2015. V. 20. P. 5528–5553. https://doi.org/10.3390/molecules20045528
- Ostrovskii V.A., Trifonov R.E., Popova E.A. // Russ. Chem. Bull. 2012. V. 61. P. 768–780. https://doi.org/10.1007/s11172-012-0108-4
- El-Sofany W.I., Othman D.A.A., Mahran A.M., May E.-M.A., El-Sayed W.A. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 393–402. https://doi.org/10.1134/S106816202003005X
- Hamade E., Habib A., Hachem A., Hussein A.H., Abbas M., Hirz T., Al Masri M., Faour W.H. // Med. Chem. 2012. V. 8. P. 401–408. https://doi.org/10.2174/1573406411208030401
- Deb P.K., Kaur R., Chandrasekaran B., Bala M., Gill D., Kaki V.R., Akkinepalli R.R., Mailavaram R. // Med. Chem. Res. 2014. V. 23. P. 2780–2792. https://doi.org/10.1007/s00044-013-0861-4
- Tapkir A.S., Chitlange S.S., Bhole R.P. // Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem. 2017. V. 16. P. 175–192. https://doi.org/10.2174/1871523016666171114165958
- Dekhane D.V., Pawar S.S., Gupta S., Shingare M.S., Patil C.R., Thore S.N. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2011. V. 21. P. 6527–6532. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.08.061
- Bekhit A.A., El-Sayed O.A., Aboulmagd E., Park J.Y. // Eur. J. Med. Chem. 2004. V. 39. P. 249–255. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2003.12.005

- Al-Hourani B.J., Sharma S.K., Mane J.Y., Tuszynski J., Baracos V., Kniess T., Suresh M., Pietzsch J., Wuest F. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2011. V. 21. P. 1823–1826. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.01.057
- Tupys A., Kalembkiewicz J., Ostapiuk Y., Matiichuk V., Tymoshuk O., Woźnicka E., Byczyński Ł. // J. Therm. Anal. Calorim. 2017. V. 127. P. 2233–2242. https://doi.org/10.1007/s10973-016-5784-0
- Chaban T., Matiychuk V., Ogurtsov V., Chaban I., Harkov S., Nektegaev I. // Pharmacia. 2018. V. 65. № 4. P. 51–62.
- Bazel Y., Tupys A., Ostapiuk Y., Tymoshuk O., Matiychuk V.J. // Mol. Liq. 2017. V. 242. P. 471–477. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.07.047
- Обушак Н.Д., Горак Ю.И., Матийчук В.С., Лытвын Р.З. // Журн. орг. химии. 2008. Т. 44. С. 1712–1716. [Obushak N.D., Gorak Yu.I., Matiichuk V.S., Lytvyn R.Z. // Russ. J. Org. Chem. 2008. V. 44. P. 1689–1694.]
 - https://doi.org/10.1134/S1070428008110213
- Pokhodylo N.T., Matiychuk V.S. // J. Heterocycl. Chem. 2010. V. 47. P. 415–420. https://doi.org/10.1002/jhet.321
- Chaban T., Klenina O., Chaban I., Ogurtsov V., Harkov S., Lelyukh M. // Pharmacia. 2018. V. 65. № 2. P. 54–70.
- 23. Pokhodylo N.T., Teslenko Y.O., Matiychuk V.S., Obushak M.D. // Synthesis. 2009. V. 16. P. 2741–2748. https://doi.org/10.1055/s-0029-1216875

- 24. Chaban T.I., Ogurtsov V.V., Matiychuk V.S., Chaban I.G., Demchuk I.L., Nektegayev I.A. // Acta Chim. Slov. 2019. V. 66. P. 103–111. https://doi.org/10.17344/acsi.2018.4570
- Походыло Н.Т., Матийчук В.С., Обушак Н.Д. // XГС. 2009. С. 612–618. [Pokhodylo N.T., Matiychuk V.S., Obushak N.D. // Chem. Heterocycl. Compd. 2009. V. 45. P. 483–488.] https://doi.org/10.1007/s10593-009-0287-6
- Chaban T., Ogurtsov V., Chaban I., Myrko I., Harkov S., Leluykh M. // Pharmacia. 2019. V. 66. P. 27–32. https://doi.org/10.3897/pharmacia.66.e35131
- Pokhodylo N.T., Matiychuk V.S., Obushak M.D. // Synthesis. 2009. V. 8. P. 1297–1300. https://doi.org/10.1055/s-0028-1087992
- Tsyalkovsky V.M., Kutsyk R.V., Matiychuk V.S., Obushak N.D., Klyufinskaya T.I. // Pharm. Chem. J. 2005. V. 39. P. 245–247. https://doi.org/10.1007/s11094-005-0126-8
- Chaban T., Matiychuk V., Komarytsya O., Myrko I., Chaban I., Ogurtsov V., Nektegaev I. // Pharmacia. 2020. V. 67. P. 121–127. https://doi.org/10.3897/pharmacia.67.e38969
- Pillai A.D., Rathod P.D., Franklin P.X., Padh H., Vasu K.K., Sudarsanam V. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. V. 317. P. 1067. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.03.148

Synthesis, Anti-Inflammatory Properties and Molecular Docking of 2-(5-Aryltetrazol-2-yl)- and 2-(1*H*-Tetrazol-5-ylsulphanyl)-*N*-Thiazol-2-ylacetamides

T. I. Chaban*, V. T. Foliush**, V. V. Ogurtsov*, and V. S. Matiychuk**,#

[#]*Phone:* +38 (067) 675-16-83; e-mail: v matiychuk@ukr.net

*Danylo Halytsky Lviv National Medical University, ul. Pekarskaya 69, Lviv, 79010 Ukraine **Ivan Franko National University of Lviv, ul. Kyrylla i Mefodia 6, Lviv, 79005 Ukraine

By the reaction of chloroacetamidothiazole with 5-aryltetrazoles and 5-mercaptotetrazoles 2-(5-aryltetrazol-2-yl)- and 2-(1H-tetrazol-5-ylsulfanyl)-N-thiazol-2-ylacetamides were prepared. The study of the anti-inflammatory properties of the synthesized compounds was carried out. Compounds have been identified, theactivity of which exceeds the reference drug Ibuprofen. Molecular docking to cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 was carried out and it was shown that <math>2-[1-(2,5-dimethylphenyl)-1H-tetrazol-5-ylsulfanyl]-Nthiazol-2-ylacetamide has the highest affinity for active center of the cyclooxygenase.

Keywords: 2-aminothiazole, tetrazole, alkylation, anti-inflammatory activity, molecular dockin



УДК 547-314:547-305.1:615.277.3

СИНТЕЗ И ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОДУКТОВ ПРИСОЕДИНЕНИЯ ТИОФЕНОЛА К СЕСКВИТЕРПЕНОВЫМ ЛАКТОНАМ

© 2021 г. А. В. Семаков*, #, Л. В. Аникина*, С. Г. Клочков*

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

Поступила в редакцию 04.08.2020 г. После доработки 18.09.2020 г. Принята к публикации 21.09.2020 г.

Получены производные сесквитерпеновых лактонов, модифицированные по лактонному циклу остатком тиофенола. Полученные конъюгаты с тиофенолом способны к реакции окисления-элиминирования при действии АФК опухолевой клетки с высвобождением исходных цитотоксичных лактонов. Предлагается использовать полученные серосодержащие конъюгаты в качестве АФК-активируемых пролекарств сесквитерпеновых лактонов. Антипролиферативные свойства полученных конъюгатов были изучены на опухолевых и псевдонормальной клеточных линиях. Цитотоксичность конъюгатов меньше, чем у исходных лактонов, однако иногда, как в случае конъюгатов алантолактона и артемизитена, остается умеренной на всех протестированных опухолевых линиях.

Ключевые слова: тиофенол, пролекарства, активные формы кислорода, сесквитерпеновые лактоны, цитотоксичность in vitro, MTT-тест

DOI: 10.31857/S0132342321040187

введение

Сесквитерпеновые лактоны (СЛ) – обширный класс веществ преимущественно растительного происхождения. Для его представителей часто характерна выраженная цитотоксическая активность по отношению к опухолевым клеткам [1, 2]. Цитотоксической активностью обладают в основном те лактоны, которые несут сопряженную двойную связь при лактонном цикле и способны вступать в реакцию присоединения по Михаэлю с нуклеофилами. В живой клетке в изобилии встречаются молекулы с аминными и тиольными нуклеофильными группами, которые служат мишенями для атаки СЛ с образованием новой ковалентной связи. Однако активирующее влияние на двойную связь карбоксильной группы лактонного цикла невелико, в результате чего СЛ обладают умеренной способностью к присоединению в реакции Михаэля. Это позволяет СЛ химически связываться только в сайтах белков с большим сродством к конкретной молекуле СЛ. Часто такими сайтами выступают активные центры ферментов с гидрофобными карманами с тиольными группами цистеинов. Разные СЛ ингибируют разный набор ферментов. Способность к ингибированию ферментов делает СЛ перспективными

агентами для противоопухолевой терапии. Среди мишеней СЛ как наиболее значимые следует выделить транскрипционный фактор NF-кВ [3], фарнезилтрансферазу и ферменты основного метаболизма, в том числе гликолиза [4]. В то же время СЛ свойственны некоторые недостатки, ограничивающие их применение в качестве противоопухолевых агентов: 1) СЛ также действуют на другие ткани, что приводит к токсическим эффектам в терапевтических дозах; 2) ферменты печени со временем восстанавливают ненасыщенную связь при лактонном цикле СЛ, что ведет к утрате активности; 3) СЛ часто – гидрофобные вещества со слабой биодоступностью. В качестве возможного решения для устранения этих недостатков нами предложено использовать СЛ в виде их конъюгатов с тиофенолами.

Из химии карбонилов, в частности лактонов, известна реакция окисления—элиминирования карбонилов с заместителями в виде тиофенольной группы в α - [5, 6] или β -положении [7] с образованием енонов при действии разных окислителей, в том числе перекиси водорода. СЛ охотно реагируют с тиофенолом в реакции присоединения Михаэля. Образующиеся сульфиды также способны при действии перекиси водорода вступать в реакции окисления—элиминирования, при этом продукт реакции – исходный лактон с экзометиленовой группой при лактонном цикле.

С другой стороны, в клетке в процессе метаболизма образуются активные формы кислорода (АФК), главные из которых – супероксид анион и перекись водорода. Причем установлено, что в опухолевых клетках содержание АФК выше, чем

Сокращения: АФК — активные формы кислорода; ПЭ — петролейный эфир; СЛ — сесквитерпеновые лактоны; ХФ — хлороформ; ЭА — этилацетат; DCC — дициклогексилкарбодиимид; IC_{50} — значение концентрации, вызывающее 50%-ное ингибирование роста популяции клеток.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (919) 96-49-347; эл. почта: L vok@list.ru).

в клетках соответствующей им нормальной ткани. Это связано как с большей скоростью образования АФК из-за несбалансированной работы электрон-транспортной цепи митохондрий, так и с меньшей способностью опухолевых клеток к детоксикации АФК за счет пониженной активности ферментов антиоксидантной защиты клетки [8]. Поскольку неважно, происходит реакция окисления-элиминирования конъюгатов СЛ с тиофенолом под действием внутриклеточной перекиси водорода или в процессе химического синтеза, данную особенность опухолевых клеток можно использовать для создания из СЛ пролекарств-конъюгатов с большей избирательностью цитотоксического действия. Более того, данный полход позволяет использовать замешенные тиофенолы, что дает возможность создавать из СЛ конъюгаты-пролекарства с требуемой полярностью. Ранее сообщалось о получении АФК-активируемых пролекарств лактона гроссгемина (I) путем синтеза его конъюгатов с тиофенолами [9]. Мы предлагаем использовать этот подход для получения АФК-активируемых пролекарств на основе и других СЛ. Из литературных источников также известно о синтезе как промежуточных вешеств конъюгатов алантолактона (II) [10] и изоалантолактона (III) [11] с тиофенолом, однако об их цитотоксических свойствах ничего не сообшалось. И наконец. из литературных ланных также известно о синтезе конъюгата СЛ артемизитена (IV) с тиофенолом [12] в рамках поиска новых антималярийных препаратов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве субстратов для получения конъюгатов СЛ с тиофенолом мы использовали СЛ (**I–XV**), выделенные нами из растительных источников, а также СЛ, полученные из природных СЛ с помощью химической модификации. В настоящий момент описано большое число СЛ [13, 14], однако подавляющее их количество содержится в растениях в исчезающее малых концентрациях либо само растительное сырье малодоступно. Поэтому мы опирались на те растительные источники с высоким содержанием СЛ в сухом сырье, которые либо доступны коммерчески (корни девясила высокого Inula helenium L., экстракт корней горькуши лопуховидной Sausserea lappa (Decne.), полученный путем свехкритической СО₂-экстракции), либо были вырашены собственными силами (соцветия пижмы девичьей Tanacetum partenium L., листья василька крупноголовчатого Centaurea macrocephala (Muss.-Puschk. ex Willd.)). Другие использованные лактоны получены из стартовых лактонов полусинтетически (схемы 1-4).

Лактоны корней девясила высокого, алантолактон (II) и изоалантолактон (III), обладают схожими свойствами, что затрудняет их разделение. Эти два лактона хотя и могут быть выделены одновременно путем разделения их смеси через хроматографирование на колонке с силикагелем. импрегнированным нитратом серебра [15, 16], но практичнее получать кажлый из них из очишенного экстракта [17] по отдельности. Так, алантолактон (II) был получен из смеси аланто- и изоалантолактона путем селективного окисления изоалантолактона при действии диоксида селена в другой СЛ – изотелекин (V). Последний легко отделяется хроматографически. Также при окислении смеси соединений (II) и (III) диоксидом селена в меньших количествах получаются СЛ телекин (VI) и лактон-диол (VII). Изоалантолактон (III) частично отделяется из смеси лактонов девясила четырехкратной перекристаллизацией из горячего 75%-ного волного метанола. Более подробно способы препаративного разделения лактонов девясила описаны в недавней статье [17].



Схема 1. Синтез сесквитерпеновых лактонов из лактонов девясила (Inula helenium L.).

Основные лактоны корней горькуши лопуховидной — костунолид и дегидрокостус-лактон (VIII). В качестве источника для выделения лактонов костунолида (XVI) и лактона (VIII) использовали экстракт корней костуса, полученный путем сверхкритической CO₂-экстракции (Guangzhou Endless Biotech Co., Китай). Использованный сверхкритический CO₂-экстракт примерно на 25% состоял из смеси СЛ и на 75% — из триглицеридов. Для удаления последних из экстракта несколько раз извлекали СЛ горячим водным ацетонитрилом и очищали фильтрованием через силикагель. Дегидрокостус-лактон (VIII) и костунолид (XVI) разделяли на колонке с импрегнированным нитратом серебра. В меньших количествах из экстракта были выделены минорные лактоны горькуши лопуховидной — сантамарин (IX) и рейнозин (XVII), которые также отделяли друг от друга на колонке с импрегнированным нитратом серебра (схема 2).



Схема 2. Сесквитерпеновые лактоны горькуши лопуховидной (костуса, Sausserea lappa (Decne.)).

Прочие использованные природные СЛ были выделены из сухого растительного сырья. Для этого на основе известных методик нами был найден оптимальный способ получения лактонной фракции. Он состоит в следующем: высушенные измельченные части растения экстрагировали хлороформом, упаривали, растворяли в горячем метаноле и небольшими порциями при взбалтывании добавляли насыщенный раствор ацетата свинца (20% по объему), оставляли остывать в течение ночи. Жидкую часть декантировали с осадка пигментов, кислот и полифенольных соединений, промывали петролейным эфиром от высоколипофильных примесей, отгоняли метанол из водно-метанольной части при пониженном давлении, разбавляли водой и экстрагировали этилацетатом. Из обогащенной лактонной фракции индивидуальные лактоны выделяли препаративной колоночной хроматографией. Таким способом из соцветий пижмы девичьей был выделен гермакрановый СЛ партенолид (**X**) с выходом 0.78%, из листьев василька крупноголовчатого — гваянолиды гроссгемин (**I**) с выходом 0.63% и цинаропикрин (**XVIII**) с выходом 1.18% (схема 3).



Схема 3. Выделенные из растений сесквитерпеновые лактоны гроссгемин (I), цинаропикрин (XVIII) и партенолид (X).

Артемизинин (XIX) – коммерчески доступный СЛ. Однако он не имеет экзометиленовой группы при лактонном цикле и не способен вступать в реакции присоединения по Михаэлю. СЛ артемизитен (IV) (также известный как артемизининен) с экзометиленовой группой при лактонном цикле синтезирован из дигидроартемизинина (XX), полученного из коммерческих источников, а также при восстановлении артемизинина (XIX) боргидридом натрия [18]. За основу взята известная методика синтеза артемизитена (IV) [19]. Она заключается в дегидрировании дигидроартемизинина (XX) с образованием ангидродигидроартемизинина (XXI), который при действии синглетного кислорода дает гидропероксид (XXII). Последний при действии уксусного ангидрида в

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 47 № 4 2021

пиридине образует лактон (IV). В оригинале синтез промежуточного продукта (XXI) из дигидроартемизинина (XX) предполагает использование в качестве дегидрирующего агента DCC и сопровождается количественным выходом. Однако воспроизведение синтеза соединения (XXI) по методике El-Feraly et al. [19] дало требуемый продукт лишь с выходом 63.7% от теоретического. Дициклогексилмочевина и побочный продукт реакции затрудняют дальнейшую обработку реакционной смеси. Практичнее на этом этапе оказалось заменить DCC в качестве дегидрирующего агента на трехфтористый бор [20], что повышает выход до количественного и упрощает очистку продукта. На следующей стадии реакцию с синглетным кислородом проводили с присутствием в реакционной среде фотосенсибилизатора бенгальского розового. Выход на этой стадии невелик даже при большом времени облучения, что делает ее узким местом в схеме получения артемизитена (**IV**) (схема 4).



Схема 4. Синтез артемизитена (IV).

Часть использованных лактонов была получена полусинтетически из природных лактонов, выделенных из растительных источников. Так, эпоксиалантолактон (XI) получен эпоксидированием алантолактона (II) при действии надуксусной кислоты по известной методике [21] с количественным выходом. Далее синтезом из эпоксиалантолактона (XI) при действии щавелевой кислоты в водной среде были получены алантодиен (XII) и эремофилановый лактон (XIII) [21]. Изозаллузарин-С (XIV) получен как основной продукт аллильного окисления дегидрокостуслактона (VIII) при реакции с диоксидом селена. Ацилированный по спиртовой группе изотелекин (XV) получен обычным способом реакцией лактона (V) с ацилхлоридом в пиридине (схема 1).

Как известно, СЛ охотно вступают в реакции присоединения по Михаэлю тиолов по лактонному циклу [22, 23], в том числе с тиофенолом [9]. Реакция присоединения по Михаэлю с тиофенолом не идет в чистом метаноле в отсутствие катализа даже при длительной инкубации, но быстро проходит при добавлении основания триэтиламина, что согласуется с литературными данными [9, 24]. Используя эту реакцию, из полученных нами ранее СЛ (I-XV) были получены конъюгаты с тиофенолом (Іа-ХУа) (схема 5). Выходы продуктов реакций приведены в табл. 1. Получение конъюгатов лактонов девясила (II) и (III) с тиофенолом и селенофенолом было описано нами в недавнем сообщении [25]. Стандартный способ выделения (метод А) продукта реакции заключа-

ется в упаривании реакционной смеси, промывании в воронке остатка раствором карбоната от следов тиофенола и кристаллизации на холоде из минимального количества метанола. Конъюгаты лактонов, которые выпадают в осадок из метанола, могут быть очищены простой отгонкой растворителя и дополнительной промывкой метанолом (способ Б). В случае, если в реакционной смеси кроме основного продукта по данным ТСХ обнаруживались примеси, продукты выделяли колоночной хроматографией (методы В и Г). В случае, если продукт кристаллизовался из реакционной смеси, но лишь частично, маточный раствор также упаривали и проводили обработку реакционной смеси стандартным методом (метод Д). При длительном времени реакции алантолактона (II) с тиофенолом продукт (IIa) выделялся как неделимая смесь изомеров по положению С-11. При проведении реакции в течение нескольких минут с незамедлительной последующей обработкой реакционной смеси продукт реакции представляет собой только один чистый изомер. Для всех прочих лактонов аддукты выделялись в виде единственного изомера независимо от времени реакции. В целом, реакция присоединения тиофенола к СЛ полностью проходит за несколько минут и нет необходимости проводить ее в течение нескольких дней, однако длительное время реакции иногда позволяет кристаллизоваться продуктам напрямую из реакционной смеси, что позволяет проводить очистку продуктов реакции простым фильтрованием.



Схема 5. Конъюгаты сесквитерпеновых лактонов с тиофенолом (Ia-XVa).

СЛ проявляют свое цитотоксическое действие благодаря наличию электрон-дефицитной двойной связи при лактонном цикле. Конъюгаты СЛ с тиофенолом лишены этой группы, однако они выступают в виде пролекарств соответствующих им исходных лактонов. При действии внутриклеточных АФК происходит окисление сульфидной группы аддуктов тиофенола (Ia-XVa) до сульфоксида или сульфона, что ведет к последующему постепенному элиминированию с образованием исходного активного СЛ и сульфиновой или сульфоновой кислоты. Таким образом, для проявления цитотоксического действия тиофенольных аддуктов СЛ решающее значение имеет концентрация АФК внутри клетки, которая может различаться в разных опухолевых линиях.

Цитотоксическая активность полученных нами конъюгатов СЛ с тиофенолом была протестирована на четырех опухолевых (RD, HCT116, HeLa, A549) и одной псевдонормальной (HEK293) клеточных линиях (табл. 2). Вполне ожидаемо, что цитотоксичность серосодержащих конъюгатовпролекарств (**Ia–XVa**) меньше, чем у чистых СЛ (**I–XV**) практически во всех случаях. Однако па-

дение цитотоксичности (IC₅₀) неодинаково как для разных лактонов, так и для разных клеточных линий. Для части конъюгатов, таких как конъюгаты сантамарина (IXa), телекина (VIa), изозаллузарина-С (**XIVa**) и гроссгемина (**Ia**), цитотоксическая активность невелика ($IC_{50} > 100 \text{ мкM}$) на всех протестированных опухолевых линиях. Частично это связано с меньшей цитотоксичностью самих лактонов. С другой стороны, из литературных данных [9] известно, что один из полученных нами конъюгатов – аддукт гроссгемина с тиофенолом (Іа) – обладает умеренной цитотоксичностью ($IC_{50} = 11.2 \text{ мкM}$) на опухолевой линии KB, что может быть следствием повышенной чувствительности этой клеточной линии к действию лактона (I). Другие полученные нами пролекарства-конъюгаты сохраняют умеренную цитотоксичность (IC₅₀ = 5.8 - 38.4 мкМ) на всех протестированных линиях. Среди них стоит отметить как наиболее активные конъюгаты алантолактона (IIa) и артемизитена (IVa). В первом случае удовлетворительная цитотоксическая активность конъюгата-пролекарства (IIa) достигается за счет высокой активности исходного лактона (II). Во

*				
Исходный лактон	Метод	Выход, %	Время реакции	
(I)	Д	100	3 сут	
(II)	А	89.0*	3 сут	
	Б	100	10 мин	
(III)	А	100	3 сут	
(IV)	Г	60.3	3 сут	
(V)	Α	38.5	3 сут	
	Б	81.5	3 сут	
(VI)	Д	67.1	3 сут	
(VII)	В	56.6	1ч	
(VIII)	А	100	3 сут	
	Б	92.0	14 сут	
(IX)	В	38.5	3 сут	
(X)	Г	76.4	1 сут	
(XI)	Б	93.4	3 сут	
(XII)	А	98.6	3 сут	
(XIII)	Α	92.2	7 сут	
(XIV)	В	91.4	18 ч	
(XV)	А	81.6	3 сут	

Таблица 1. Выходы продуктов реакции присоединения тиофенола и лактонов

* Продукт реакции в виде смеси изомеров.

втором случае активность конъюгата (**IVa**) практически не отличается от активности исходного лактона (**IV**), что означает быстрый распад конъюгата (**IVa**) при попадании в клетку. Эти два вещества – конъюгаты алантолактона (**IIa**) и артемизитена (**IVa**) – подходят для дальнейшей оптимизации структуры путем введения заместителей в тиофенольную часть.

Недостаток данного рода конъюгатов – высокая гидрофобность, еще большая, чем у исходных СЛ. Однако она может быть устранена в перспективе при использовании для синтеза пролекарств замещенных тиофенолов. В данной работе была проверена и подтверждена жизнеспособность самого подхода к синтезу АФК-активируемых серосодержащих пролекарств из СЛ с различными углеродными скелетами и цитотоксической активностью.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы. Спектры ЯМР (δ , м.д.; *J*, Гц) были получены в CDCl₃ (где не указано особо) на приборе Spectrospin (200 МГц для ¹Н и 50 МГц для ¹³С) (Bruker, США) с использованием остаточного сигнала растворителя CHCl₃ (δ = = 7.27) в качестве внутреннего стандарта, в расшифровке спектра символы "а" и "b" обозначают неэквивалентные протоны при одном атоме углерода. Отнесения сигналов ЯМР осуществляли сравнением с данными 1D- и 2D-спектров ЯМР лактонов, полученных нами ранее, и со спектрами ЯМР лактонов из литературных источников. Нумерация атомов в спектрах — как на схеме 5. Корни девясила — производства ПКФ "Фитофарм" (Анапа, Россия).

ТСХ выполняли на пластинках Silicagel 60 F_{254} (Мегск, Германия). Для обнаружения веществ на пластинки выливали раствор 4%-ной фосфорномолибденовой кислоты в этаноле, после чего пластинки сразу нагревали феном с температурой 250°С до проявления темных пятен. Также для обнаружения пятен ТСХ использовали опрыскивание раствором анисальдегида (75 мл этанола, 1 мл уксусной кислоты, 2.5 мл серной кислоты, 2 мл анисальдегида) и нагревали феном (250°С) до проявления разноцветных пятен.

Выделение лактонов гроссгемина (I) и цинаропикрина (XVIII) из листьев василька групноголовчатого. Василек крупноголовчатый (гроссгемия крупноголовчатая, Centauria macrocephala (Muss.-Puschk. ex Willd.)) был посеян и выращен на территории д. Останкино, Борский р-н, Нижегородская область. Сбор и сушку листьев производили в течение лета 2017 г., начиная с начала периода цветения. Высушенные листья (442.5 г) измельчали вручную и экстрагировали 2 × 5 л хлороформа в течение нескольких суток. Хлороформные вытяжки упаривали при пониженном давлении и получали экстракт массой 24.0 г. Экстракт растворяли в 200 мл метанола и на водяной бане (70°С) постепенно, при покачивании колбы, добавляли 50 мл насыщенного раствора ацетата свинца и давали медленно остывать до комнатной температуры. Спустя ночь декантировали с осадка, промывали в воронке 3 × 50 мл петролейным эфиром, водно-метанольную часть упаривали при пониженном давлении до удаления легколетучего метанола, остаток разбавляли 150 мл воды и 2 × 150 мл этилацетата, органические слои упаривали и вакуумировали, получили 9.31 г вещества в виде пены. Экстракт хроматографировали на колонке с силикагелем в системе ХФ/ЭА9: 1, затем X Φ /ацетон 9 : 1, X Φ /ацетон 4 : 1, X Φ /ацетон 7:3, ХФ/МеОН 9:1, смешанные фракции рехроматографировали. Состав фракций контролировали в системе ХФ/ацетон 2:1. Получили в сумме 2.768 г гроссгемина (I) в виде крупных, почти кубических кристаллов и 5.243 г цинаропикрина (XVIII) в виде аморфной твердой пены. ЯМРспектры лактонов гроссгемина (I) [9, 26] и цинаропикрина (XVIII) [26] аналогичны описанным ранее.

Получение алантолактона (II) и продуктов аллильного окисления изоалантолактона. В колбе растворяли в 350 мл CH₂Cl₂ при перемешивании

ПРОИЗВОДНЫЕ СЕСКВИТЕРПЕНОВЫХ ЛАКТОНОВ

Соалицациа	IC ₅₀ , мкМ				
Соединение	RD	HCT116	HeLa	A549	HEK293
(I)	38.35 ± 3.31	17.80 ± 2.16	31.07 ± 1.79	44.06 ± 0.68	46.86 ± 5.10
(Ia)	256.66 ± 9.71	160.43 ± 25.94	458.79 ± 42.86	557.26 ± 38.62	*
(II)	6.23 ± 0.11	5.73 ± 0.08	5.38 ± 0.04	2.71 ± 0.07	15.44 ± 1.27
(IIa)	18.42 ± 0.94	31.68 ± 2.45	34.33 ± 0.02	38.37 ± 1.49	34.24 ± 0.18
(III)	10.30 ± 0.01	8.09 ± 0.97	5.94 ± 0.06	18.55 ± 0.21	35.68 ± 1.52
(IIIa)	99.62 ± 7.42	124.77 ± 3.48	156.65 ± 2.22	74.66 ± 6.95	78.80 ± 7.69
(IV)	8.23 ± 0.01	33.97 ± 4.51	2.95 ± 0.04	38.37 ± 0.66	7.98 ± 0.11
(IVa)	14.93 ± 0.38	33.94 ± 0.34	5.82 ± 0.01	34.14 ± 0.44	11.80 ± 1.49
(V)	34.50 ± 4.97	47.55 ± 3.38	33.05 ± 0.44	43.27 ± 1.29	36.35 ± 0.33
(Va)	76.94 ± 8.99	79.84 ± 3.28	100.80 ± 1.16	102.38 ± 5.71	67.10 ± 5.85
(VI)	63.58 ± 1.12	22.15 ± 0.02	28.97 ± 2.91	46.30 ± 5.39	22.17 ± 0.63
(VIa)	130.54 ± 1.88	139.10 ± 5.10	202.17 ± 3.83	638.91 ± 10.54	153.85 ± 9.29
(VII)	20.30 ± 0.56	34.76 ± 5.66	24.47 ± 0.96	79.87 ± 10.10	17.52 ± 2.91
(VIIa)	104.36 ± 2.95	127.87 ± 3.49	78.20 ± 6.91	185.29 ± 8.98	69.23 ± 4.70
(VIII)	61.89 ± 2.96	37.48 ± 2.51	10.11 ± 0.13	34.22 ± 1.62	20.92 ± 0.69
(VIIIa)	36.86 ± 0.57	54.48 ± 9.09	60.51 ± 4.48	66.69 ± 3.82	57.72 ± 0.06
(IX)	88.27 ± 5.68	99.67 ± 8.35	77.71 ± 4.73	155.05 ± 6.14	66.08 ± 2.89
(IXa)	231.90 ± 7.99	_*	_*	686.75 ± 40.24	124.57 ± 3.35
(X)	15.69 ± 3.45	34.01 ± 2.32	15.58 ± 0.43	64.31 ± 2.85	67.29 ± 4.58
(Xa)	61.89 ± 2.96	74.45 ± 3.17	81.45 ± 5.96	185.00 ± 11.02	100.41 ± 1.38
(XI)	13.27 ± 0.20	30.56 ± 0.94	6.23 ± 0.73	31.54 ± 2.44	8.60 ± 0.22
(XIa)	46.31 ± 3.76	155.20 ± 2.14	196.41 ± 8.73	146.48 ± 15.65	57.45 ± 3.03
(XII)	3.60 ± 0.25	6.99 ± 0.46	41.03 ± 3.13	74.68 ± 7.54	29.64 ± 3.88
(XIIa)	18.22 ± 1.44	44.93 ± 3.24	18.33 ± 0.76	48.84 ± 0.92	32.66 ± 3.11
(XIII)	17.47 ± 0.15	21.54 ± 3.59	20.39 ± 0.79	91.56 ± 3.13	34.05 ± 2.23
(XIIIa)	24.15 ± 0.27	36.48 ± 1.57	31.46 ± 1.82	88.78 ± 1.54	28.46 ± 1.49
(XIV)	100.04 ± 2.72	137.75 ± 10.20	190.56 ± 2.38	347.17 ± 11.65	*
(XIVa)	123.84 ± 3.87	143.47 ± 16.75	173.44 ± 21.76	238.36 ± 19.88	112.72 ± 5.80
(XV)	70.27 ± 2.01	33.06 ± 3.00	21.04 ± 0.48	74.29 ± 0.13	29.86 ± 0.63
(XVa)	237.99 ± 7.20	191.08 ± 22.78	334.83 ± 19.13	581.64 ± 7.71	165.32 ± 19.38

Таблица 2. Цитотоксическая активность лактонов и их конъюгатов

* Прочерк — отсутствие цитотоксичности в МТТ-тесте (IC₅₀ > 600 мкМ).

78.9 г предварительно очищенной [17] смеси лактонов корней девясила высокого (*Inula helenium* L.), вносили 2 г диоксида селена и 40 мл 70%-ного *t*-ВиООН. Перемешивали 5 ч при комнатной температуре и оставляли на ночь при 4°С. Отгоняли растворитель при пониженном давлении, тщательно вакуумировали. Очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюировали бензол/ЭА 19 : 1, бензол/ЭА 9 : 1, бензол/ЭА 8 : 2, бензол/ацетон 8 : 2, бензол/изопропанол 1 : 1. С колонки последовательно элюировали фракции, содержащие чистый алантолактон (**II**), 33.9 г, желтое масло, быстро застывающее в белое твердое вещество ($R_f = 0.71$ на TCX в

системе бензол/ЭА 9 : 1), затем телекин (**VI**) 7.4 г ($R_f = 0.32$ на TCX в системе бензол/ЭА 9 : 1), изотелекин (**V**) 31.6 г ($R_f = 0.16$ на TCX в системе бензол/ЭА 9 : 1) и лактон (**VII**) 3.29 г ($R_f = 0.26$ на TCX в системе бензол/ацетон 9 : 1). ЯМР-спектры алантолактона (**II**) [21], телекина (**VI**) [27], изотелекина (**V**) [27] и лактона (**VII**) [27] аналогичны описанным ранее.

Синтез артемизитена (IV). Дегидратация дигидроартемизинина (XX). В 2-л колбу вносили 1 л диэтилового эфира и суспендировали в нем 20 г коммерчески доступного дигидроартемизинина (XX, 70.3 ммоль). Охлаждали колбу до 0°С в бане со льдом и при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке по каплям вносили 30 мл эфирата трехфтористого бора, закрывали пробкой, оставляли перемешиваться еще 24 ч при охлаждении. Полностью прозрачную реакционную смесь порциями промывали насыщенным раствором NaHCO₃, органические слои объединяли, отгоняли эфир, остаток быстро хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя смесью бензол/ЭА 10 : 1. Получили ангидродигидроартемизинин (**XXI**) с количественным выходом в виде белого твердого вещества.

Реакция ангидродигидроартемизинина (XXI) с синглетным кислородом. В 500-мл колбу, снабженную магнитной мешалкой, вносили 250 мл изопропанола. 5 г ангидродигидроартемизинина (ХХІ, 18.8 ммоль) и 100 мг бенгальского розового. В колбу вставляли барботер со стеклянным фильтром от склянки Дрекселя. На барботер подавали ток осушенного воздуха, пропущенного через колонку со щелочью. Скорость потока регулировали установкой капилляра на входе насоса. На расстоянии 10 см от колбы устанавливали ртутную лампу высокого давления ДРЛ-125, которую подключали в сеть через дроссель ПРА-125. Оставляли смесь в колбе интенсивно перемешиваться при одновременном пропускании тока воздуха и освещении. Периодически к реакционной массе подливали испарившийся изопропанол. Через 1 сут реакции отгоняли растворитель при пониженном давлении, остаток растворяли в хлороформе, наносили на колонку с силикагелем и элюировали смесью бензол/ЭА 9 : 1. Получили 2.879 г гидропероксида (XXII), 9.7 ммоль, выход 51.6%.

Конверсия гидропероксида (XXII) в лактон (IV). Полученные на предыдущем этапе 2.879 г гидропероксида (XXII) растворяли в смеси 20 мл уксусного ангидрида и 1 мл пиридина, перемешивали 2 ч на магнитной мешалке. Выливали в насыщенный водный раствор NaHCO₃ и оставляли перемешиваться до растворения слоя уксусного ангидрида. Добавляли в колбу хлороформ и после разделения в делительной воронке органический слой сушили над Na₂SO₄ в течение ночи. После отгонки растворителя получили 2.641 г артемизитена (IV, 9.4 ммоль, 97%) в виде белого твердого вещества. Спектр ЯМР артемизитена (IV) аналогичен описанному ранее [28].

Выделение лактонов костуса. Сверхкритический CO₂-экстракт корней костуса (горькуша лопуховидная, *Sausserea lappa* (Decne.)) был получен из коммерческого источника (Guangzhou Endless Biotech Co., Китай). В 2-л делительной воронке порциями разбавляли 400 мл CO₂-экстракта водой и хлороформом, органические слои отделяли, сушили Na₂SO₄, фильтровали через бумажные фильтры, растворитель отгоняли при пониженном давлении. В 2-л колбе к очищенному от механических и полярных примесей СО₂-экстракту прибавляли 600 мл ацетонитрила, доводили до кипения на водяной бане при перемешивании, еще горячий MeCN-слой декантировали с бесцветного масла. целиком состоящего из триглицеридов. К ацетонитрильному экстракту прибавляли 60 мл воды (10% от объема MeCN), также нагревали на водяной бане до кипения и декантировали с масла на дне, отгоняли растворитель. Получили 114 г экстракта, состоящего преимущественно из СЛ. Полученный MeCN-экстракт фракционировали на колонке с силикагелем, состав фракций контролировали по ТСХ в системе ПЭ/Еt₂О 15 : 5. Фракции, содержащие смесь костунолида (XVI) и дегидрокостус-лактона (VIII), объединяли, упаривали и разделяли в воронке между MeCN и ПЭ, MeCN-слой отделяли и упаривали. Избавлялись от части костунолида путем кристаллизации из ПЭ при -20°С, супернатант упаривали и хроматографировали на колонке с силикагелем, импрегнированным 5%-ным нитратом серебра. Собирали фракции, содержащие чистый дегидрокостус-лактон (VIII), масло, застывающее в длинные бесцветные призмы, с выходом 48.4 г, затем собирали фракции, дающие 7.71 г костунолида (XVI), который быстро изомеризуется в другие лактоны в присутствии следов AgNO₃.

Более полярные фракции MeCN-экстракта объединяли и хроматографировали на силикагеле, элюируя смесью ПЭ/ЭА 2 : 1. Собрали 7.9 г фракций, богатых сантамарином (IX) и рейнозином (XVII), которые после хроматографии на силикагеле с импрегнированным нитратом серебра дают небольшое количество чистых лактонов (IX) и рейнозина (XVII). Очищенные на колонке с серебром лактоны после этого фильтровали через слой окиси алюминия для удаления остатков нитрата серебра. Спектры ЯМР дегидрокостус-лактона (VIII) [29], костунолида (XVI) [29], сантамарина (IX) [30, 31] и рейнозина (XVII) [30, 31] аналогичны описанным ранее.

Выделение партенолида (Х). Несортовая форма пижмы девичьей (*Tanacetum partenium* L.) была посеяна и выращена территории ИФАВ РАН (г. Черноголовка, Московская область), в течение июля—августа 2018 г. происходил сбор соцветий с интервалом в 2 недели. Высушенные соцветия пижмы девичьей массой 356.5 г измельчали на лабораторной мельнице и экстрагировали дважды смесью 5 л бензола с этилацетатом при комнатной температуре. После отгонки растворителя экстракт массой 36.03 г разбавляли 450 мл метанола, добавляли 50 мл насыщенного водного раствора ацетата свинца при нагревании на водяной бане (50°С), после чего водяную баню оставляли постепенно остывать. Спустя ночь водно-мета-

нольную часть декантировали, промывали в воронке гексаном. Гексановая часть массой 2.6 г содержала камфору и жиры. Из водно-метанольной оставшейся части при пониженном давлении отгоняли метанол, к остатку прибавляли хлороформ и воду, хлороформную часть массой 16.56 г отделяли и промывали раствором NaHCO₃ и насыщенным раствором NaCl, сушили над Na_2SO_4 , обогащенный экстракт хроматографировали на колонке с силикагелем в бензоле с возрастающим градиентом ЭА. Фракции, содержащие партенолид (**X**) ($R_{\rm f} = 0.24$ в системе бензол/ЭА 9 : 1 на TCX-пластинках Merck, $R_{\rm f} = 0.49$ – на пластинках Силуфол), собирали, отгоняли растворитель и вакуумировали, дополнительно кристаллизовали из холодного эфира. Выход 2.77 г, бесцветный, слегка желтый порошок. Спектр ЯМР партенолида (Х) аналогичен описанному ранее [31].

Синтез изозаллузарина-С (XIV) из дегидрокостус-лактона (VIII). В 500-мл колбе растворяли 8.0 г дегидрокостус-лактона (**X**) (34.7 ммоль, $R_{\rm f} =$ = 0.76 в системе бензол/ЭА 10 : 1, $R_{\rm f} = 0.9$ в системе бензол/ЭА 2:1) в 250 мл хлороформа, добавляли 1 г диоксида селена, интенсивно перемешивали 10 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 10 мл 70%-ного *t*-BuOOH порциями по 1 мл раз в 1 мин и перемешивали еще 2.5 ч, контролируя прохождение реакции по ТСХ. Затем к реакционной смеси добавляли безводный Na₂SO₄, упаривали растворитель при пониженном давлении без нагрева, несколько раз промывали оставшийся Na₂SO₄ этилацетатом и также упаривали, вакуумировали и наносили на колонку с силикагелем, элюировали возрастающим градиентом бензол/ЭА, затем ацетоном, собирали фракции, содержащие лактон (**XIV**) ($R_{\rm f} = 0.11$ в системе бензол/ЭА 10 : 1, $R_{\rm f} = 0.43$ в системе бензол/ЭА 2:1), при необходимости дополнительно очищали рехроматографией для выделения из смешанных фракций, а также удаления примеси окиси селена. Выход 4.76 г, белое твердое вещество, 1 H-ЯМР-спектр соответствует описанному ранее [32].

Ацилирование изотелекина (V). В колбе растворяли 4 г (16.1 ммоль) изотелекина (V) в 40 мл пиридина. Затем по каплям добавляли 1.77 г ацилхлорида при перемешивании, закрывали пробкой и оставляли реакцию идти в течение ночи при комнатной температуре. После этого при пониженном давлении отгоняли основную часть пиридина, добавляли к остатку воду и эфир, держали на ультразвуковой бане до растворения смолы. Водный слой трижды экстрагировали эфиром, после чего сумму органических частей промывали раствором винной кислоты и упаривали, получили 5.05 г остатка неочищенного лактона (XV). Очищали колоночной хроматографией на силикагеле, собирая фракции с $R_f = 0.77$ на TCX в си-

стеме Х Φ /ацетон 20 : 1 (подвижность изотелекина $R_f = 0.39$). Выход чистого ацилированного продукта (**XV**) составил 3.55 г (12.2 ммоль, 76.0%), ¹Н-ЯМР-спектр соответствует литературному [33].

Общий метод присоединения тиофенола к сесквитерпеновым лактонам. Способ А (стандартный): в виале при комнатной температуре растворяли 1 ммоль лактона в 10 мл метанола, туда же добавляли 232 мкл (2.1 ммоль) тиофенола и 100 мкл триэтиламина. После перемешивания виалу закрывали, изолировали слоем парафильма и оставляли на 3 сут. Ход реакции контролировали по ТСХ. При пониженном давлении на водяной бане (40°С) отгоняли растворитель, растворяли в хлороформе и промывали в воронке последовательно раствором Na₂CO₃, водой и слабым раствором NaCl, каждый раз дополнительно экстрагировали еще одной порцией хлороформа. Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 , отгоняли растворитель, вакуумировали, кристаллизовали остаток с 2 мл метанола при -10°С, убирали с помощью пипетки метанол и снова вакуумировали. Получили продукт в виде светлого порошка.

Способ Б: в виале при комнатной температуре растворяли 1 ммоль лактона в 10 мл метанола, прибавляли 232 мкл (2.1 ммоль) тиофенола и 100 мкл триэтиламина и перемешивали. К быстро закристаллизовавшейся реакционной смеси добавляли 5 мл хлороформа и выдерживали еще 10 мин, после чего отгоняли растворитель при пониженном давлении. Остаток вакуумировали и кристаллизовали из 5 мл холодного метанола (-10°С). Выпавшие кристаллы быстро отфильтровывали на стеклянном фильтре при пониженном давлении и сушили в вакууме.

Способ В: реакционную смесь упаривали при пониженном давлении, остаток сразу хроматографировали на колонке с силикагелем.

Способ Г: реакционную смесь обрабатывали как в способе А, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем.

Способ Д: выпавшие из реакционной смеси кристаллы отфильтровывали на стеклянном фильтре, оставшийся в маточном растворе продукт извлекали, как в способе А.

(3*S*,3*aR*,4*S*,6*aR*,9*S*,9*aR*,9*bR*)-4-Гидрокси-9-метил-6-метилен-3-((фенилтио)метил)октагидроазулено[4,5-*b*]фуран-2,8(3*H*,4*H*)-дион (Ia). Крупные бесцветные прямоугольные кристаллы, TCX $R_f =$ = 0.51 в системе хлороформ/ацетон 20 : 2.

Спектр ¹Н-ЯМР (200 МГц, CDCl₃): 1.23 (3Н, д, *J* 6.7, H15), 2.05 (1Н, дд, *J*₁ 12.1, *J*₂ 10.2, H9a), 2.25 (2Н, м, H4 + H5), 2.50 (1Н, с, H2a), 2.51 (1Н, д, *J* 10.7, H2b), 2.73 (2Н, м, H9b + H7), 2.99 (2Н, м, H1 + H11), 3.42 (1Н, дд, *J*₁ 13.8, *J*₂ 4.2, H13a), 3.66 (1Н, дд, *J*₁ 14.3, *J*₂ 4.9, H13b), 3.70 (1Н, м, H8), 3.93 (1H, т, *J* 9.0, H6), 4.74 (1H, с, H14a), 5.04 (1H, с, H14b), 7.20–7.51 (5H, Ph + CHCl₃).

Спектр ¹³С-ЯМР (50 МГц, CDCl₃): 14.4 (C15), 34.2 (C13), 39.6 (C4), 43.5 (C9), 46.9 (C5), 47.2 (C1), 48.5 (C2), 49.7 (C7), 51.2 (C11), 75.1 (C8), 83.2 (C6), 115.1 (C14), 126.9 (Cd), 129.2 (Cc), 130.2 (Cb), 135.5 (Ca), 143.6 (C10), 175.8 (C12), 218.8 (C3).

(3*S*,5*aS*,6*R*,8*aS*,12*S*)-3,6-Диметил-9-((фенилтио)метил)октагидро-12*H*-3,12-эпокси[1,2]диоксипино[4,3-*i*]изохромен-10(3*H*)-он (IVa). Аморфный, TCX в системе бензол/ЭА 2 : 1 *R*_f = 0.62.

Спектр ¹Н-ЯМР (200 МГц, CDCl₃): δ 0.96 (3H, д, *J* 5.5, H14), 1.46 (3H, с, H15), 3.17 (1H, дд, *J*₁ 13.7, *J*₂ 11.8, H13a), 3.91 (1H, дд, *J*₁ 13.8, *J*₂ 3.3, H13b), 5.93 (1H, с, H5), 7.20–7.42 (5H, Ph + CHCl₃).

Спектр ¹³С-ЯМР (50 МГц, CDCl₃): δ 19.8 (C14), 24.7 (C8), 25.4 (C2), 31.3 (C15), 33.8 (C9), 35.8 (C3), 37.6 (C10), 38.0 (C13), 41.1 (C11), 43.4 (C7), 50.3 (C1), 80.7 (C6), 94.0 (C5), 105.4 (C4), 126.5 (Cd), 129.2 (Cc), 129.4 (Cb), 134.5 (Ca), 170.5 (C12).

(3*R*,3a*R*,6*R*,8a*R*,9a*R*)-6-Гидрокси-8а-метил-5метилен-3-((фенилтио)метил)декагидронафто[2,3b]фуран-2(3*H*)-он (Va). Серые кристаллы, TCX в системе бензол/ЭА 9 : 1 для продукта, $R_f = 0.19$ для изотелекина.

Спектр ¹Н-ЯМР (200 МГц, CDCl₃): δ 0.80 (1H, c, H15), 1.53 (1H, дд, *J*₁ 15.5, *J*₂ 4.5, H9a), 2.17 (1H, д, *J* 15.1, H9b), 2.39 (1H, уш.д, *J* 11.8, H5), 2.63 (1H, м, H7), 2.92 (1H, д, *J* 7.1, H11), 3.51 (2H, м, H13a + + H13b), 4.33 (1H, уш.с, H3), 4.46 (1H, уш.с, H8), 4.61 (1H, c, H15a), 5.03 (1H, c, H15b), 7.20–7.54 (5H, Ph + CHCl₃).

Спектр ¹³С-ЯМР (50 МГц, CDCl₃): δ 17.0 (C14), 20.1 (C6), 29.0 (C13 + C2), 34.7 (C10), 35.8 (C1), 38.5 (C7), 40.4 (C5), 41.1 (C9), 48.6 (C11), 73.3 (C3), 78.2 (C8), 109.9 (C15), 126.8 (Cd), 127.4 (Cc), 129.0 (Cb), 129.9 (Ca), 150.3 (C4), 176.9 (C12).

(3*R*,3*aR*,4*aR*,8*aR*,9*aR*)-4а-Гидрокси-8а-метил-5-метилен-3-((фенилтио)метил)декагидронафто[2,3-b]фуран-2(3*H*)-он (VIa). Выход 481 мг (67.1%) в сумме при расчете реакции на 2 ммоль лактона (20). Крупные кристаллы.

Спектр ¹Н-ЯМР (200 МГц, CDCl₃): δ 0.93 (3H, c, H14), 1.14 (1H, уш.с, H1a), 1.60 (2H, м, H2a + + H2b), 1.86 (1H, дд, *J*₁ 15.4, *J*₂ 2.4, H6a), 2.15 (1H, дт, *J*₁ 13.7, *J*₂ 3.5, H3a), 2.56 (2H, м, H3b + H7), 2.92 (2H, м, H13a + H11), 3.52 (1H, д, *J* 9.7, H13b), 4.51 (1H, уш.с, H8), 4.68 (1H, c, H15a), 4.87 (1H, c, H15b), 7.20–7.44 (5H, Ph + CHCl₃).

Спектр ¹³С-ЯМР (50 МГц, CDCl₃): δ 21.5 (C2), 21.6 (C14), 26.7 (C6), 29.3 (C13), 31.6 (C3), 35.2 (C7), 35.3 (C1), 35.7 (C9), 36.9 (C10), 46.3 (C11), 74.2 (C5), 78.3 (C8), 108.8 (C15), 126.9 (Cd), 129.2 (Cc), 130.3 (Cb), 135.6 (Ca), 150.5 (C4), 177.0 (C12).

(3*R*,3a*R*,4a*S*,6*R*,8a*R*,9a*R*)-4a,6-Дигидрокси-8аметил-5-метилен-3-((фенилтио)метил)декагидронафто[2,3-b]фуран-2(3*H*)-он (VIIa). Белое аморфное твердое вещество, TCX в системе бензол/ЭА $2:1 R_{\rm f} = 0.67.$

Спектр ¹Н-ЯМР (200 МГц, CDCl₃): δ 0.82 (3H, c, H14), 1.04 (1H, дд, J_1 13.2, J_2 4.1, H1a), 2.90 (1H, дд, J_1 6.1, J_2 2.3, H11), 3.11 (1H, дд, J_1 12.3, J_2 2.4, H13a), 3.43 (1H, дд, J_1 12.3, J_2 4.9, H13b), 4.32 (1H, уш.c, H3), 4.43 (1H, т, J4.2, H8), 4.83 (1H, c, H15a), 5.04 (1H, c, H15b), 7.14-7.31 (5H, Ph + CHCl₃).

Спектр ¹³С-ЯМР (50 МГц, CDCl₃): δ 21.4 (C14), 26.0 (C1), 28.4 (C2), 29.4 (C13), 30.1 (C6), 34.8 (C10), 35.6 (C9), 37.2 (C7), 46.0 (C11), 74.9 (C3), 75.5 (C5), 78.3 (C8), 112.9 (C15), 126.9 (Cd), 129.3 (Cc), 129.7 (Cb), 130.8 (Ca), 148.3 (C4), 176.9 (C12).

(3*S*,3*aS*,6*aR*,9*aR*,9*bS*)-6,9-Диметилен-3-((фенилтио)метил)декагидроазулено[4,5-*b*]фуран-2(3*H*)он (VIIIа). Иглы из метанола или твердое белое вещество.

Спектр ¹Н-ЯМР (200 МГц, CDCl₃): δ 2.83 (1H, м, H5), 3.15 (1H, дд, *J*₁ 13.8, *J*₂ 6.8, H13a), 3.55 (1H, дд, *J*₁ 13.6, *J*₂ 4.1, H13b), 3.92 (1H, т, *J* 8.8, H6), 4.76 (1H, c, H14a), 4.84 (1H, c, H14b), 5.06 (1H, уш.с, H15a), 5.20 (1H, уш.с, H15b), 7.20–7.54 (5H, Ph + + CHCl₃).

Спектр ¹³С-ЯМР (50 МГц, CDCl₃): δ 30.1 (C2), 32.5(C8), 32.9 (C9), 33.4 (C3), 37.2 (C13), 46.8 (C1), 46.9 (C7), 47.1 (C11), 52.0 (C5), 85.2 (C6), 109.3 (C14), 112.0 (C15), 126.6 (Cd), 127.5 (Cc), 129.0 (Cb), 135.6 (Ca), 137.0 (C10), 149.6 (C4), 176.3 (C12).

(3S, 3aS, 5aR, 6R, 9bS)-6-Гидрокси-5а, 9-диметил-3-((фенилтио)метил)-3а, 4, 5, 5а, 6, 7, 9а, 9b-октагидронафто[1, 2-b]фуран-2(3H)-он (IXa). Масло. TCX в системе бензол/ЭА 10 : 1 $R_f = 0.23$.

Спектр ¹Н-ЯМР (200 МГц, CDCl₃): δ 0.86 (3H, c, H14), 1.17 (1H, м, H9a), 1.80 (3H, c, H15), 2.07 (1H, м, H8a), 2.43 (1H, м, H7), 2.58 (1H, ддд, *J*₁12.6, *J*₂8.1, *J*₃3.7, H11), 3.03 (1H, дд, *J*₁13.7, *J*₂8.1, H13a), 3.57 (1H, дд, *J*₁13.6, *J*₂3.7, H13b), 3.67 (1H, дд, *J*₁10.0, *J*₂6.7, H1), 3.93 (1H, дд, *J*₁11.4, *J*₂10.0, H6), 5.34 (1H, уш.с., H3), 7.20–7.45 (5H, Ph + CHCl₃.

Спектр ¹³С-ЯМР (50 МГц, CDCl₃): δ 11.0 (C14), 23.3 (C8), 23.6 (C15), 32.7 (C2), 33.0 (C13), 34.5 (C9), 40.5 (C10), 45.4 (C7), 50.5 (C11), 52.0 (C5), 75.2 (C1), 81.1 (C6), 121.3 (C3), 126.6 (Cd), 129.1 (Cc), 129.6 (Cb), 133.4 (C4), 135.6 (Ca), 176.96 (C12).

(3*S*,3*aS*,9*aR*,10*aR*,10*bS*,*Z*)-6,9*a*-Диметил-3-((фенилтио)метил)-3*a*,4,5,8,9,9*a*,10*a*,10*b*-октагидрооксирено[2',3':9,10]циклодека[1,2-*b*]фуран-2(*3H*)-он (Ха). Выход 411 мг (76.4%) при расчете реакции на 1.5 ммоль лактона (Х). Медленно кристаллизующееся масло, TCX в системе бензол/ЭА 9:1 *R*_f = 0.36.

Спектр ¹Н-ЯМР (200 МГц, CDCl₃): δ 1.31 (3H, c, H15), 1.69 (3H, c, H14), 2.36 (1H, ддд, *J*₁ 12.1, *J*₂ 6.8, *J*₃ 4.3, H11), 2.72 (1H, д, *J* 9.0, H5), 3.32 (1H, дд, *J*₁ 14.1, *J*₂ 5.4, H13a), 3.51 (1H, дд, *J*₁ 14.2, *J*₂ 4.2,

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 47 № 4 2021

H13b), 3.84 (1H, т, *J* 9.0, H6), 5.08 (1H, дд, *J*₁ 12.0, *J*₂ 2.1, H2), 7.23–7.52 (5H, Ph + CHCl₃).

Спектр ¹³С-ЯМР (50 МГц, CDCl₃): δ 16.9 (C14), 17.1 (C15), 24.0 (C2), 30.1 (C8), 32.9 (C13), 36.5 (C3), 40.5 (C9), 47.7 (C7), 47.9 (C-11), 61.5 (C4), 66.4 (C5), 82.3 (C6), 124.9 (Cd), 128.8 (C1), 129.2 (Cc), 130.0 (Cb), 134.4 (C10), 135.8 (Ca), 175.1 (C12).

(1а*R*,2*S*,5а*R*,6а*R*,9*R*,9а*R*,9b*S*)-2,5а-Диметил-9-((фенилтио)метил)октагидро-2*H*-оксирено[2',3':4,4а] нафто[2,3-*b*]фуран-8(9*H*)-он (XIа). Белый порошок. ТСХ в системе бензол/ЭА 9 : 1 *R*_f = 0.67.

Спектр ¹Н-ЯМР (200 МГц, CDCl₃): δ 1.10 (3H, д, *J* 7.6, H15), 1.21 (3H, c, H14), 1.41–1.58 (5H, м, H3 + H4 + H2b + H9b), 1.60 (1H, дд, *J*₁ 14.8, *J*₂ 2.8, H1a), 1.83 (3H, м, H2a + H1b + H9b), 2.92 (1H, т, *J* 12.2, H11), 3.07 (1H, дд, *J*₁ 10.0, *J*₂ 2.8, H7), 3.16 (1H, c, H6), 3.20 (1H, м, H13a), 3.69 (1H, дд, *J*₁ 12.9, *J*₂ 2.6, H13b), 4.58 (1H, дт, *J*₁ 6.2, *J*₂ 2.9, H8), 7.23– 7.46 (5H, Ph + CHCl₃).

Спектр ¹³С-ЯМР (50 МГц, CDCl₃): δ 16.5 (C2), 17.8 (C15), 24.1 (C14), 29.6 (C3), 30.8 (C13), 32.1 (C10), 35.3 (C9), 37.8 (C4 + C7), 38.7 (C1), 41.8 (C11), 56.8 (C6), 68.4 (C5), 75.9 (C8), 127.2 (Cd), 129.3 (Cc), 130.3 (Cb), 134.1 (Ca), 176.1 (C12).

(3*R*,3a*R*,8a*R*,9a*R*)-5,8а-Диметил-3-((фенилтио)метил)-3а,7,8,8а,9,9а-гексагидронафто[2,3*b*]фуран-2(3*H*)-он (XIIа). Светлый порошок, TCX *R*_f = 0.86 в системе бензол/ЭА 9 : 1.

Спектр ¹Н-ЯМР (200 МГц, CDCl₃): δ 1.08 (3H, c, H14), 1.40 (1H, м, H1a), 1.52 (1H, д, J 3.4, H1b), 1.59 (1H, д, J 2.4, H9a), 1.75 (3H, c, H15), 2.09 (1H, м, H2a), 2.22 (2H, дд, J₁ 14.9, J₂ 3.0, H2b + H9b), 2.91 (1H, т, J 12.2, H11), 3.06 (1H, ддд, J₁ 14.6, J₂ 9.0, J₃ 4.8, H7), 3.38 (1H, м, H13a), 3.58 (1H, дд, J₁ 12.5, J₂ 2.6, H13b), 4.78 (1H, дт, J₁ 5.5, J₂ 2.7, H8), 5.47 (1H, д, J 3.2, H6), 5.63 (1H, уш.с, H3), 7.21–7.53 (5H, Ph + CHCl₃).

Спектр ¹³С-ЯМР (50 МГц, CDCl₃): δ 20.1 (C15), 22.2 (C2), 24.7 (C14), 30.6 (C13), 30.8 (C10), 37.2 (C7), 37.7 (C1), 39.5 (C9), 45.4 (C11), 69.1 (C8), 112.6 (C6), 124.6 (Cd), 126.9 (C3), 129.2 (Cc), 130.2 (Cb), 130.5 (C4), 137.0 (Ca), 145.2 (C5), 176.4 (C12).

(3*R*,3a*S*,4*S*,4a*R*,5*S*,9a*R*)-4-Гидрокси-4a,5-диметил-3-((фенилтио)метил)-3a,4,4a,5,6,7,9,9а-октагидронафто[2,3-*b*]фуран-2(3*H*)-он (XIIIa). Твердое белое вещество, TCX $R_f = 0.34$ в системе бензол/ЭА 9 : 1.

Спектр ¹Н-ЯМР (200 МГц, CDCl₃): δ 0.84 (3H, s, H-14), 0.89 (3H, d, *J* 6.8, H-15), 1.38–1.48 (2H, м, H3), 1.93–2.06 (3H, м, H2 + H4), 2.24 (1H, уш.т, *J* 12.2, H9a), 2.60 (1H, дд, *J*₁ 14.0, *J*₂ 7.2, H9b), 2.71 (1H, м, H7), 3.02 (1H, т, *J* 9.0, H11), 3.21 (1H, м, H13a), 3.68 (1H, дд, *J*₁ 12.5, *J*₂ 2.4 H13b), 4.08 (1H, дд, *J*₁ 6.0, *J*₂ 4.4, H6), 4.68 (1H, дд, *J*₁ 10.7, *J*₂ 7.4, H8), 5.66 (1H, дд, *J*₁ 4.7, *J*₂ 2.3, H1), 7.23–7.52 (5H, Ph + CHCl₃). Спектр ¹³С-ЯМР (50 МГц, CDCl₃): δ 16.0 (C15), 18.8 (C14), 25.6 (C2), 26.6 (C3), 32.6 (C4), 34.9 (C13), 35.3 (C9), 41.7 (C7), 41.9 (C5), 48.0 (C11), 73.7 (C6), 76.4 (C8), 127.1 (Cd), 128.0 (C1), 129.2 (Cc), 129.3 (Cb), 134.6 (Ca), 135.0 (C10), 176.9 (C12).

(3*S*,3a*S*,6a*R*,8*R*,9a*R*,9b*S*)-8-Гидрокси-6,9-диметилен-3-((фенилтио)метил)декаазулено[4,5*b*]фуран-2(3*H*)-он (XIVа). Бесцветное масло. TCX $R_{\rm f} = 0.58$ в системе бензол/ЭА 2 : 1.

Спектр ¹Н-ЯМР (200 МГц, CDCl₃): δ 3.03 (2H, м, H1 + H5), 3.15 (1H, дд, *J*₁ 13.8, *J*₂ 6.8, H13a), 3.52 (1H, дд, *J*₁ 13.8, *J*₂ 4.0, H13b), 3.87 (1H, т, *J* 9.2, H6), 4.67 (1H, уш.с, H3), 4.74 (1H, с, H14a), 4.88 (1H, с, H14b), 5.35 (1H, с, H15a), 5.44 (1H, с, H15b), 7.22– 7.43 (5H, Ph + CHCl₃).

Спектр ¹³С-ЯМР (50 МГц, CDCl₃): δ 32.9 (C8), 33.3 (C9), 37.5 (C13), 39.7 (C2), 43.8 (C1), 46.7 (C7), 47.3 (C11), 49.5 (C5), 74.5 (C3), 84.8 (C6), 112.6 (C14), 112.9 (C15), 126.7 (Cd), 129.2 (Cc), 129.7 (Cb), 135.5 (Ca), 148.9 (C10), 154.3 (C4), 176.1 (C12).

(3*R*,3a*R*,6*R*,8a*R*,9a*R*)-8а-Метил-5-метилен-2окси-3-((фенилтио)метил)додеканафто[2,3-b]фуран-6-ил ацетат (XVa). Легкоплавкое белое вещество.

Спектр ¹Н-ЯМР (200 МГц, CDCl₃): δ 0.82 (3H, c, H14), 1.14 (1H, д, J 12.6, H1a), 1.39 (1H, дт, J_1 12.7, J_2 3.5, H1b), 1.53 (1H, дд, J_1 10.4, J_2 4.5, H6a), 1.59 (1H, уш.с, H9a), 1.68 (1H, дд, J_1 10.6, J_2 5.0, H6b), 1.81 (2H, м, H5 + H2a), 2.08 (3H, с, Me-COO3), 2.20 (2H, м, H9b + H2b), 2.65 (1H, дд, J_1 11.6, J_2 5.6, H11), 2.91 (2H, м, H7 + H13a), 3.52 (1H, м, H13b), 4.47 (1H, дд, J_1 5.5, J_2 3.6, H8), 4.74 (1H, уш.с, H15a), 5.15 (1H, уш.с, H15b), 5.37 (1H, т, J 2.8, H3), 7.20–7.40 (5H, Ph + CHCl₃).

Спектр ¹³С-ЯМР (50 МГц, CDCl₃): δ 17.2 (C14), 20.0 (C6), 21.52 (<u>Me</u>COO₃), 27.0 (C2), 29.0 (C13), 34.4 (C10), 36.4 (C1), 38.5 (C7), 41.1 (C9), 41.7 (C5), 46.6 (C11), 75.2 (C3), 78.0 (C8), 112.5 (C15), 126.84 (Cd), 127.1 (Cc), 127.5 (Cc'), 129.0 (Cb), 129.2 (Cb'), 129.9 (Ca), 145.65 (C4), 170.0 (Me<u>C</u>OO₃), 176.67 (C12).

Культуры клеток. Культуры клеток человека RD (рабдомиосаркома, ATCC[®] CCL-136^{тм}), HCT116 (карцинома кишечника, ATCC[®] CCL-247^{тм}), HeLa (аденокарцинома шейки матки, ATCC[®] CCL-2^{тм}), A549 (карцинома легкого, ATCC[®] CCL-185^{тм}) и HEK293 (ATCC[®] CCL-1573^{тм}) выращивали в среде DMEM (для A549, HCT116 и RD) и EMEM (для HeLa) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина и 1% гентамицина в качестве антибиотика при 37°С и 5% CO₂ во влажной атмосфере. Исходные культуры клеток получены из коллекции Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия).

Цитотоксичность *in vitro*. Цитотоксичность синтезированных соединений определяли с помощью МТТ-теста. Клетки сеяли в концентрации 1×10^4 клеток на 200 мкл в 96-луночный планшет и культивировали при 37°С во влажной атмосфере с 5% СО₂. После 24 ч инкубации к культурам клеток добавляли различные концентрации тестируемых соединений (100-1.56 мкМ), далее клетки культивировали в тех же условиях в течение 72 ч. Эксперимент проводили в трех повторностях для каждой концентрации. Все вещества растворяли в ДМСО, конечная концентрация ДМСО в лунке не превышала 0.1% и не была токсична для клеток. Контрольными выступали лунки, в которые добавляли растворитель в конечной концентрации не более 0.1%. После инкубации в каждую лунку добавляли 20 мкл МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид, 5 мг/мл), планшеты инкубировали еще 2 ч. Далее из планшетов удаляли среду и в каждую лунку добавляли 100 мкл ДМСО для растворения образовавшихся кристаллов формазана. С помощью планшетного анализатора (Victor³, PerkinElmer, США) определяли оптическую плотность при 530 нм за вычетом измеренного фонового поглощения при 620 нм. Значение концентрации, вызывающее 50%-ное ингибирование роста популяции клеток (ІС₅₀), определяли на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения OriginPro 9.0 (Perkin-Elmer, США).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многие представители веществ из класса сесквитерпеновых лактонов проявляют выраженную цитотоксическую активность и выступают перспективными противоопухолевыми агентами. В то же время стоит задача повысить селективность их действия по отношению к опухолевым клеткам. С этой целью нами синтезирована серия конъюгатов СЛ с тиофенолом по реакции Михаэля. Такого рода конъюгаты способны к окислению по атому серы под действием внутриклеточных АФК с последующим ретрораспадом продукта присоединения по Михаэлю, что ведет к высвобождению активного СЛ. Шитотоксическая активность полученных пролекарств-конъюгатов показывает, что они, как правило, вполне ожидаемо обладают в несколько раз меньшей активностью, чем исходный лактон, но, что более важно, все еще демонстрируют шитотоксичность по отношению к протестированным опухолевым линиям. Это говорит о целесообразности применения такого подхода для создания пролекарств СЛ. Можно было предположить, что уменьшение цитотоксичности конъюгатов будет пропорциональным для всех СЛ и будет зависеть только от типа клеточной линии, однако это не так, разные лактоны показывают разное падение цитотоксичности. Из протестированных веществ стоит выделить конъюгаты лактонов алантолактона (**Па**) и артемизитена (**IVa**) как перспективные для дальнейшей оптимизации.

Данный подход к созданию пролекарств сесквитерпеновых лактонов в перспективе также позволяет использовать замещенные тиофенолы для придания молекуле конъюгата как целому нужной липофильности без вмешательства в структуру СЛ или для прикрепления остатка СЛ к молекулам-векторам для более избирательной доставки в ткань опухоли.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-33-00567 мол_а).

Анализ ЯМР-спектров выполнен в рамках Госзадания 0090_2019_0006.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zhang S., Won Y.-K., Ong C.-N., Shen H.-M. // Curr. Med. Chem. Anticancer Agents. 2005. V. 5. P. 239–249. https://doi.org/10.2174/1568011053765976
- Pickman A.K. // Biochem. System. Ecol. 1986. V. 14. P. 255–281. https://doi.org/10.1016/0305-1978(86)90101-8
- Siedle B., Garcia-Pineres A.J., Murillo R., Schulte-Monting J., Castro V., Rungeler P., Klaas C.A., Da Costa F.B., Kisiel W., Merfort I. // J. Med. Chem. 2004. V. 47. P. 6042–6054. https://doi.org/10.1021/jm049937r
- 4. Gaspar A.R., Potgieter D.J., Vermeulen N.M. // Biochem. Pharmacol. 1986. V. 35. P. 493–497. https://doi.org/10.1016/0006-2952(86)90225-X
- Iwai K., Kosugi H., Uda H. // Chem. Lett. 1974. V. 3. P. 1237–1240. https://doi.org/10.1246/cl.1974.1237
- Trost B.M., Salzmann T.N., Hiroi K. // J. Am. Chem. Soc. 1976. V. 98. P. 4887–4902. https://doi.org/10.1021/ja00432a034
- Brownbridge P., Warren S. // J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1977. V. 13. P. 465–466. https://doi.org/10.1039/C39770000465
- Doskey C.M., Buranasudja V., Wagner B.A., Wilkes J.G., Du J., Cullen J.J., Buettner G.R. // Redox Biol. 2016.
 V. 10. P. 274–284. https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.10.010

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 47 № 4 2021
- Fardella G., Barbetty P., Grandolini G., Chiappini I., Ambrogi V., Scarcia V., Candiani A.F. // Eur. J. Med. Chem. 1999. V. 34. P. 515–523. https://doi.org/10.1016/S0223-5234(99)80100-7
- Schaeffer M., Stampf J.-L., Benezra C. // J. Org. Chem. 1989. V. 54. P. 6106–6113. https://doi.org/10.1021/jo00287a024
- 11. Corbet J.-P., Benezra C. // Can. J. Chem. 1979. V. 57. P. 213–217.
- https://doi.org/10.1139/v79-034
- 12. Paitayatat S., Tarnchompoo B., Thebtaranonth Y., Yuthavong Y. // J. Med. Chem. 1997. V. 40. P. 633–638. https://doi.org/10.1021/jm960767v
- Fischer N.H., Olivier E.J., Fischer H.D. // In: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products / Eds. Herz W., Grisebach H., Kirby G.W. Vienna: Springer, 1979. V. 38. P. 47–320. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-8548-3 2
- 14. Buděšinsky M., Šaman D. //Ann. Rep. NMR Spect. 1995. V. 30. P. 231–475. https://doi.org/10.1016/S0066-4103(08)60027-7
- 15. Клочков С.Г., Афанасьева С.В., Зефиров Н.С. // Техн. живых сист. 2008. Т. 5. С. 31–39.
- Rekha R. // Chemical Transformations of Sesquiterpene Lactones by Conventional and Non-Conventional Methodologies and Their Evaluation as Agrochemicals / Thesis, Ludhiana: Punjab Agricultural University, 2006. 248 p.
- https://krishikosh.egranth.ac.in/handle/1/5810015724 17. Семаков А.В., Клочков С.Г. // ХРС. 2020. № 3. С. 145–154.
- https://doi.org/10.14258/jcprm.2020034681
- Brossi A., Venugopalan B., Gerpe L.D., Yeh H.J.C., Flippen-Anderson J.L., Buchs P., Luo X.D., Milhous W., Peters W. // J. Med. Chem. 1988. V. 31. P. 645–650. https://doi.org/10.1021/jm00398a026
- El-Feraly F.S., Ayalp A., Al-Yahya M.A., McPhail D.R., McPhail A.T. // J. Nat. Prod. 1990. V. 53. P. 66–71. https://doi.org/10.1021/np50067a008
- Zuma N.H., Smit F.J., de Kock C., Combrinck J., Smith P.J., N'Da D.D. // Eur. J. Med. Chem. 2016. V. 122. P. 635–646. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.07.027

- Klochkov S.G., Afanas'eva S.V., Pushin A.N. // Chem. Nat. Comp. 2006. V. 42. P. 400–406. https://doi.org/10.1007/s10600-006-0166-7
- 22. Artemova N.P., Nikitina L.E., Yushkov D.A., Shigabutdinova O.G., Plemenkov V.V., Klochkov V.V., Khairutdinov B.I. // Chem. Nat. Comp. 2005. V. 41. P. 45–47. https://doi.org/10.1007/s10600-005-0071-5
- Ginanneschi M., Chelli M., Papini A.M., Pinzani D., Rapi G. // Magn. Res. Chem. 1996. V. 34. P. 95–99. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-458X(199602)34: 2<95::AID-OMR855>3.0.CO;2-V
- 24. Bakuzis P., Bakuzis M.L.F. // J. Org. Chem. 1981. V. 46. P. 235–239. https://doi.org/10.1021/jo00315a002
- 25. Semakov A.V., Klochkov S.G. // Chem. Nat. Comp. 2020. V. 56. P. 254–256. https://doi.org/10.1007/s10600-020-03000-7
- 26. Adekenova A.S., Sakenova P.Y., Ivasenko S.A., Khabarov I.A., Adekenov S.M., Berthod A. // Chromatographia. 2016. V. 79. P. 37–43. https://doi.org/10.1007/s10337-015-3000-1
- 27. Hussain S., Sharma M. // J. Phys. Sci. 2010. V. 21. P. 99-107.
- 28. Acton N., Klayman D.L. // Planta Med. 1985. V. 51. P. 441–442. https://doi.org/10.1055/s-2007-969543
- 29. Li A., Sun A., Liu R. // J. Chromatography A. 2005. V. 1076. P. 193–197. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.04.042
- Coronado-Acevesa E.W., Velazqueza C., Robles-Zepeda R.E., Jimenez-Estrada M., Hernandez-Martinez J., Galvez-Ruiz J.C., Garibay-Escobar A. // Pharm. Biol. 2016. V. 54. P. 2623–2628. https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1173067
- El-Feraly F.S., Chan Y.-M. // J. Pharm. Sci. 1978. V. 67. P. 347–350. https://doi.org/10.1002/jps.2600670319
- Macias F.A., Galindo J.C.G., Massanet G.M. // Phytochemistry. 1992. V. 31. P. 1969–1977. https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80343-D
- 33. Kalsi P.S., Kaur B., Talwar K.K. // Ind. J. Chem. 1985. V. 24B. P. 835–839.

Synthesis and Cytotoxic Activity of Adducts of Thiophenol to Sesquiterpene Lactones

A. V. Semakov*, #, L. V. Anikina*, and S. G. Klochkov*

[#]*Phone*: +7(919) 96-49-347; e-mail: L_vok@list.ru

*Institute of Physiologically Active Compounds of the Russian Academy of Sciences, Severnyi proezd 1, Chernogolovka, 142432 Russia

Derivatives of sesquiterpene lactones modified by the lactone cycle with a thiophenol residue were obtained. The resulting conjugates are capable of oxidation-elimination reaction under the action of tumor cell ROS with the release of the original cytotoxic lactones. It is proposed to use the obtained sulfur-containing conjugates as ROS-activated prodrugs of sesquiterpene lactones. The antiproliferative properties of the resulting conjugates were studied on four tumor and one pseudonormal cell lines. The cytotoxicity of the conjugates is less than that of the parent lactones, but sometimes, as in the case of the conjugates of alantolactone and artemisitene, it remains moderate in all tested tumor lines.

Keywords: thiophenol, prodrugs, reactive oxygen species, sesquiterpene lactones, cytotoxicity in vitro, MTT-test

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 47 № 4 2021



УДК 577.115:577.125:547.915.5

СИНТЕЗ ИЗОНИТРИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ДИГЛИЦЕРИДОВ И УГЛЕВОДОВ ДЛЯ МНОГОКОМПОНЕНТНОЙ РЕАКЦИИ УГИ

© 2021 г. А. И. Ничуговский^{*, #}, А. А. Хрулёв^{*}, К. А. Перевощикова^{*}, Д. А. Чешков^{**}, Н. Г. Морозова^{*}, М. А. Маслов^{*}

*Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова (МИРЭА – Российский технологический университет), Россия, 119454 Москва, просп. Вернадского, 78

**Государственный научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений, Россия, 105118 Москва, ш. Энтузиастов, 38

> Поступила в редакцию 15.09.2020 г. После доработки 28.09.2020 г. Принята к публикации 30.09.2020 г.

В последнее время возрос интерес к многокомпонентным реакциям, главным образом из-за возможности собирать сложные органические молекулы всего за несколько шагов. Ключевой реагент многокомпонентной реакции Уги – изоцианид, проявляющий двойственные свойства – как электрофила, так и нуклеофила. Существует несколько способов формирования изонитрильных производных, но один из основных – внутримолекулярная дегидратация формамида. В данной работе мы осуществили синтез изонитрильных производных диалкилглицерина и D-глюкозы, которые при дальнейшем взаимодействии в условиях многокомпонентных реакций способны служить новыми полезными блоками для построения химических библиотек липофильных полиаминов, содержащих остаток углевода при терминальном атоме азота. Структуры всех синтезированных соединений были подтверждены физико-химическими методами анализа и могут быть использованы в качестве строительных блоков для многокомпонентной реакции Уги.

Ключевые слова: многокомпонентная реакция Уги, липиды, углеводы, изонитрилы, ЯМР **DOI:** 10.31857/S0132342321040163

введение

В последние годы возрос интерес к многокомпонентными реакциям, главным образом из-за возможности собирать сложные органические молекулы за несколько шагов [1]. Одна из них четырехкомпонентная реакция Уги, в которой первичный амин, карбонильное соединение, карбоновая кислота и изоцианид взаимодействуют с образованием α -ациламиноамидов. Карбонильное соединение и первичный амин требуются для формирования промежуточного имина.

Изоцианид — ключевой реагент четырехкомпонентной реакции Уги, обладающий уникальными реакционными свойствами, поскольку атом углерода изоцианидной группы способен действовать как нуклеофил и электрофил [2, 3]. Кроме того, электроноакцепторный характер изоцианидной группы приводит к повышенной кислотности α-протонов на атоме углерода, примыкающем к изоцианидной группе. Существует несколько способов создания изонитрильных групп: по реакции Хоффмана [4], дегидратацией соответствующего формамида (оксихлоридом фосфора [5], комбинацией трифенилфосфина с четырехбромистым углеродом [6] или иодом [7]), в реакции замещения галогенида на изоцианид [8, 9], с раскрытием оксирановых циклов [10], превращением алкенов в изонитрилы [11] и конверсией спиртов [12].

Ранее нами были синтезированы липофильные катионные полиамины, содержащие остаток диалкилглицерина (рис. 1), на основе подхода, включающего взаимодействие 2-нитробензолсульфонильных производных полиаминов с бромпроизводными диглицеридов [13, 14]. Мы показали, что эти соединения угнетают рост раковых клеток (аденокарциномы хронического миелогенного

[#] Автор для связи: (тел.: 8 (499) 215-65-65 (доб. 807); эл. почта: ashpwnz77@gmail.com).



Рис. 1. Липофильные катионные глицеролипиды и углевод-содержащие липиды.

лейкоза человека К562, толстой кишки HCT116 и молочной железы MCF7) в микромолярных концентрациях [15]. Было установлено, что наличие алкильных заместителей при терминальной аминогруппе этих соединений снижает значение IC₅₀ (концентрации, при которой происходит гибель 50% клеток в популяции) в среднем на 30%. Также было показано, что соединения (I–III) обладают низким индексом селективности относительно клеток фибробластов кожи человека в тех же условиях.

Известно, что нейтральные гликозилированные глицеролипиды (**IV**) и (**V**) также проявляют антипролиферативный эффект на линиях клеток K562, HCT116, меланомы человека B16 и острого промиелоцитарного лейкоза HL60 по апоптоз-независимому механизму [16]. Их высокая токсичность в отношении опухолевых клеток и отсутствие мутагенности указывают на возможность использования этих соединений как индивидуально, так и в комбинации с другими противоопухолевыми агентами. Введение в структуру гликоглицеролипидов положительно заряженных групп может увеличивать антипролиферативное действие этих соединений [17, 18]. Следует отметить, что углеводы широко используются для создания новых противоопухолевых агентов [19–22].

Согласно разработанной нами ретросинтетической схеме (схема 1), для синтеза липофильных полиаминов, содержащих при терминальном атоме азота углеводный фрагмент, используется 2-(гидроксиметил)бензойная кислота, которая во время финальной стадии реакции Уги (перегруппировки Мамма) подвергается элиминированию с образованием фталида [23]. Для реализации такой схемы необходимо получить изонитрильные производные диалкилглицерина и углевода. Следует отметить, что в литературе отсутствует метод синтеза изонитрильных производных диглицеридов.

Цель данной работы — разработка подходов к получению изонитрильных производных диглицерида и углеводов.



Схема 1. Ретросинтетическая схема синтеза липофильных полиаминов с помощью реакции Уги.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительно нами было опробовано несколько синтетических подходов (схема 2) к получению липофильных изонитрилов из модельного октадециламина (VI).



Схема 2. Получение октадецилизонитрила. Реагенты и условия: a – NaOH, CHCl₃, TBAB, DCM; b – HCOOCH₂CN, DCM, DIPEA; c – 1) CBr₄, Ph₃P, TEA, DCM; 2) T₃P[®], TEA, EtOAc; 3) POCl₃, TEA, DCM; 4) I₂, Ph₃P, TEA.

В первом подходе из исходного амина (VI) по реакции Хоффмана [4] получали изонитрил (VIII) в одну стадию с выходом 37% (схема 2). Данный метод — простой и удобный, однако выход недостаточен для получения целевых соединений. Второй подход основан на количественном получении 1-октадецилформамида (VII) действием (формилокси)ацетонитрила на амин (VI) и последующей трансформации формамида (VII) в изонитрил (VIII). Согласно первому способу, соеди-

529

нение (VII) вводили в реакцию с CBr₄ и Ph₃P в среде триэтиламина, получая изоцианид (VIII) с выходом 51% [24]. Во втором способе формамид (VII) обрабатывали ангидридом трипропилтриметафосфорной кислоты в безводном этилацетате, получая изоцианил с выходом 42% [25]. Третий способ включал взаимодействие соединения (VII) с хлорокисью фосфора в безводном дихлорметане в присутствии триэтиламина (выход 20%) [26], а четвертый — взаимодействие с молекулярным иодом и трифенилфосфином в присутствии триэтиламина [7]. Следует отметить, что только использование четвертого подхода позволило получить изоцианид (VIII) с выходом 72%, при этом сам метод характеризуется доступностью реагентов и легкостью масштабирования.

Структура октадецилизонитрила (VIII) была подтверждена данными спектроскопии ¹Н- и ¹³С-ЯМР. В спектре ¹Н-ЯМР присутствуют сигналы протонов α -метиленового звена при изоцианидной группе (3.51 м.д.), а также сигналы протонов в сильном поле алкильного заместителя. В спектре ¹³С-ЯМР присутствуют характерные сигналы атомов углерода изоцианидной группы в виде триплета ($\delta = 155.9$ м.д., J = 5.7 Гц), а также атомов углерода α -метиленового звена при изоцианидной группе (41.6 м.д.). Такой сигнал изоцианидного заместителя вызван симметричным распределением электронов вокруг атома азота,

что приводит к спин-спиновому взаимодействию атомов $^{13}\mathrm{C-}^{14}N.$

Синтез изонитрильного производного 1-О-децил-2-О-этил-гас-глицерина осуществляли из rac-глицидола последовательным введением алкильных заместителей (схема 3). Исходный racглицидол (IX) обрабатывали 1.3-кратным избытком бензилбромида в присутствии гидрида натрия в DMF, получая после хроматографической очистки (система петролейный эфир-этилацетат, 85 : 15) соединение (Х) с выходом 96%. Раскрытие оксиранового цикла соединения (Х) проводили действием алкоголята децилового спирта. который предварительно получали при взаимодействии деканола с гидридом натрия. В ходе реакции также образовывался дидециловый эфир, имеющий близкую хроматографическую подвижность с соединением (XI), который не влиял на протекание следующей реакции. Этилирование вторичной гидроксильной группы соединения (XI) проводили этилбромидом в присутствии гидрида натрия. Соединение (XII) выделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле, используя систему петролейный эфир - этилацетат (25:1), и получили его с выходом 30% (в расчете на соединение (Х)). После удаления бензильной защиты гидрогенолизом в присутствии 5%Pd/C получали 1-О-децил-2-О-этил-rac-глицерин (XIII) с выходом 98%.



Схема 3. Получение изонитрильного производного диглицерида. Реагенты и условия: a – BnBr, NaH, DMF; b – $C_{10}H_{21}OH$, NaH, THF; c – EtBr, NaH, THF; d – H_2/Pd , EtOAc; e – CBr_4 , PPh₃, CH_2Cl_2 ; f – NaN₃, DMF; g – H_2 , 5% Pd/C, EtOAc; h – $CH_3COOCHO$, DIPEA; i – 1) CBr₄, Ph₃P, TEA, DCM; 2) I_2 , Ph₃P, TEA, DCM.

Последующую замену гидроксильной группы соединения (XIII) на атом брома проводили в условиях реакции Аппеля [27] действием CBr₄ в присутствии трифенилфосфина и триэтиламина. Выход соединения (XIV) составил 99%. Поскольку хроматографическая подвижность бромида (XIV) сравнима с подвижностью азида (XV), протекание реакции введения азидной группы контролировали методом спектроскопии ¹³С-ЯМР, фиксируя исчезновение сигнала атома углерода CH₂Br ($\delta = 32.7$ м.д.) и появление сигнала атома

углерода CH_2N_3 -группы с химическим сдвигом 52.2 м.д. Восстановление азидной группы проводили в присутствии 5% Pd/C, получая амин (**XVI**) с выходом 95% на две стадии. Взаимодействие амина (**XVI**) с (формилокси)ацетонитрилом в присутствии DIPEA приводило к образованию формамида (**XVII**) с выходом 71%.

Синтез изонитрила (**XVIII**) проводили теми же способами, как описано для октадецилформамида (**VII**). Было замечено, что соединение (**XVIII**) образовывалось только при использовании в качестве реагентов смеси иода и трифенилфосфина в присутствии триэтиламина, во всех остальных случаях целевой продукт в реакционной смеси отсутствовал. На спектре ¹³С-ЯМР целевого изонитрила (**XVIII**) присутствуют сигналы атомов углерода алкильных заместителей в области сильного поля, глицеринового остова (66.2–76.0 м.д.), а также сигналы атомов углерода CH₂N- (43.1 м.д.) и NC-групп (157.5 м.д.) в виде триплетных сигналов с J = 7.0 и 5.5 Гц соответственно, что подтверждает образование целевого изонитрила (**XVIII**). Следующим этапом стала разработка синтеза 1-дезокси-1-изонитрил-2,3,4,6-*О*-тетраацетил- β -D-глюкопиранозы (**XXIII**) из ацетобромглюкозы (**XIX**) (схема 4), которая была получена по известной методике [28]. Взаимодействие бромида (**XIX**) с азидом натрия в DMF приводило к образованию соединения (**XX**), которое выделяли хроматографией на силикагеле в системе толуол-этилацетат (1:1) с выходом 90%. После восстановления азидной группы гидрогенолизом на катализаторе 5% Pd/C получали аминогликозид (**XXI**) с выходом 91%.



Схема 4. Получение изонитрильного производного D-глюкозы. Реагенты и условия: a – NaN₃, DMF; b – H₂, 5%Pd/C, MeOH; c – CH₃COOCHO, DIPEA; d – 1) CBr₄, Ph₃P, TEA, DCM; 2) I₂, Ph₃P, TEA, DCM.

В отличие от синтеза диалкилглицерина (XVII), формилирование 1-амино-1-дезокси-2,3,4,6-тетра-*О*-ацетил-β-D-глюкопиранозы (XXI) действием (формилокси)ацетонитрила не приводило к образованию соединения (XXII). Литературный поиск показал, что возможна замена (формилокси)ацетонитрила на формилацетат [29]. Использование свежеприготовленного формилацетата, полученного при взаимодействии муравьиной кислоты с уксусным ангидридом, позволило получить амид (XXII) с выходом 82%.

Для синтеза изонитрила (**XXIII**) нами были опробованы два подхода. Согласно первому подходу, формамид (**XXII**) обрабатывали иодом в присутствии Ph_3P и триэтиламина. После хроматографической очистки на силикагеле выход соединения (**XXIII**) составил 65%. Замена иода на CBr₄ приводила к образованию изонитрила (**XXIII**) с выходом 60%.

Спектр ¹Н-ЯМР изоцианида (XXIII) соответствует спиновой системе ABCDX, при этом сигнал аномерного протона представляет собой сложный мультиплет с сильно выраженными эффектами не первого порядка, которые также наблюдаются у сигналов протонов H-2, H-3 и H-4 из-за близости их резонансных частот, разность которых не превышает 6× КССВ между ними. Установление конфигурации аномерного протона основано на величинах КССВ, определение которых непосредственно из тонкой мультиплетной структуры сигналов не первого порядка невозможно и требует проведения анализа спектра по полной форме линии.

Поскольку анализ по полной форме линии спектров ЯМР основан на применении квантовомеханического формализма для спиновых систем, сложность которого находится в экспоненциальной зависимости от числа спинов в спиновой системе, было решено применить селективную спиновую развязку для понижения числа спинов с 7 до 4. Был зарегистрирован спектр 1 H{ 1 H, sel)-ЯМР с развязкой от протона H-5 (X) пиранозы и проанализирован в рамках спиновой системы АВСО по полной форме линии с помощью программы ANATOLIA [30] (рис. 2). В результате были определены уточненные значения химических сдвигов и КССВ для редуцированной спиновой системы. Исследование показало, что величина КССВ между аномерным протоном и протоном при атоме С-2 составляет 9.25 Гц, что указывает на β-конфигурацию изоцианида.



Рис. 2. (*a*) – Спектр ¹Н-ЯМР соединения (XIII); (*б*) – спектр ¹Н{¹H, sel}-ЯМР соединения (XIII); (*в*) – расчетный спектр ¹H{¹H, sel}-ЯМР соединения (XIII).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и оборудование. В работе использовали коммерчески доступные растворители российского (ООО "Химмед", ООО "Компонент-Реактив") и зарубежного производства (Sigma-Aldrich, США; Acros, США). Все реакции проводили под положительным давлением аргона с использованием растворителей класса HPLC (MeOH, DMF, CHCl₃). Перед реакцией THF выдерживали над KOH, кипятили над натрием в присутствии бензофенона, DCM кипятили над CaH₂, этилацетат кипятили над Р₂O₅, перегоняли.

Ход реакции контролировали методом тонкослойной хроматографии (TCX) на пластинках Silica gel 60 F_{254} (Merck, Германия). Визуализацию пятен осуществляли в УФ-свете (254 нм) реактивом Драгендорфа, раствором фосфорномолибденовой кислоты — сульфат церия(IV) с последующим прогреванием. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле Kieselgel 60 (0.040— 0.063 мм или 0.063—0.200 мм; Merck, Германия).

Спектры ¹Н- и ¹³С-ЯМР регистрировали на импульсных Фурье-спектрометрах Bruker DPX-300, Bruker Avance II 400, Bruker Avance II 600 (Bruker, Германия) в CDCl₃. Химические сдвиги (δ) указаны в миллионных долях по отношению к пику остаточного протона растворителя, константы спин-спинового взаимодействия (J) – в Гц.

Масс-спектры регистрировали на масс-спектрометрах LCQ Deca XP Plus (Thermo Finnigan, США) и Advion Expression (Advion, США), оборудованных источниками ESI и детекторами ионной ловушки.

Октадецилформамид (VII). К 0.1 М раствору октадециламина (VI) (1.08 г, 4.0 ммоль) в безводном DCM добавляли (формилокси)ацетонитрил (0.43 мл, 6.0 ммоль) и перемешивали 2 ч при 50°С. Реакционную смесь охлаждали до 24°С, растворитель удаляли под вакуумом, остаток хроматографировали на силикагеле, элюируя системой петролейный эфир – этилацетат (9 : 1). Получили 287 мг (96%) соединения (VII) в виде желтого масла.

¹Н-ЯМР (300 МГц, основной ротамер): 0.87 (т, 3H, *J* 6.9, CH₃), 1.25 (уш. с, 30H, (CH₂)₁₅), 1.52 (п, 2H, *J* 7.2, C<u>H</u>₂CH₂N), 3.28 (кв, 2H, *J* 6.7, CH₂N), 8.13 (д, 1H, *J* 1.9, NHC<u>H</u>O).

¹³C-ЯМР (75 МГц): 14.07, 22.64, 26.77, 29.18, 29.31, 29.33, 29.47, 29.50, 29.52, 29.57, 29.59, 29.61, 29.65, 31.87, 38.34, 48.61, 161.68.

HRMS-ESI, m/z: $[M + H]^+$ рассчитано для $C_{19}H_{40}NO$ 298.3104, найдено 298.3105.

Октадецилизоцианид (VIII). Способ А: к раствору 0.5 М октадециламина (6.2 г, 0.023 моль) в DCM добавляли 50%-ный водный раствор NaOH (28 г, 0.69 моль), CHCl₃ (2.8 мл, 0.035 моль) и TBAB (8.5 г, 0.026 моль). Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 24°С, затем экстрагировали DCM (3×50 мл). Органический слой сушили безводным Na₂SO₄, концентрировали в вакууме, остаток хроматографировали на силикагеле. Получили 2.38 г (37%) соединения (VIII).

Способ С1: к 0.1 М раствору октадецилформамида (VII) (298 мг, 1.0 ммоль) в DCM добавляли Ph₃P (393 мг, 1.5 ммоль), CBr₄ (332 мг, 1.0 ммоль) и TEA (0.14 мл, 1.0 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 20 ч при 40°С. Охлаждали до 24°С, концентрировали, выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя системой петролейный эфир—этилацетат (95 : 5). Получили 143 мг (51%) соединения (VIII).

Способ С2: к 0.1 М раствору октадецилформамида (VII) (298 мг, 1.0 ммоль) в этилацетате добавляли 50%-ный раствор трипропилтриметафосфорной кислоты (1.3 мл, 2.2 ммоль) в этилацетате и ТЕА (0.28 мл, 2.0 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 20 ч при 75°С. Охлаждали до 24°С, концентрировали в вакууме, выделяли колоночной хроматографией на силикагеле. Получили 118 мг (42%) соединения (VIII).

Способ С3: к 0.1 М раствору октадецилформамида (VII) (298 мг, 1.0 ммоль) в DCM добавляли POCl₃ (0.14 мл, 1.5 ммоль) и TEA (0.35 мл, 2.5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 20 ч при 75°С. Охлаждали до 24°С, концентрировали, выделяли колоночной хроматографией на силикагеле. Получили 56 мг (20%) соединения (VIII).

Способ С4: к 0.1 М раствору октадецилформамида (VII) (1.0 ммоль) в DCM добавляли Ph_3P (393 мг, 1.5 ммоль), I_2 (380 мг, 1.5 ммоль) и TEA (0.42 мл, 3.0 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 48 ч при 24°С, концентрировали, выделяли колоночной хроматографией на силикагеле. Получили 202 мг (72%) соединения (VIII).

¹H-*AMP* (400 MΓμ): 0.88 (τ, 3H, *J* 6.8, CH₃), 1.27 (уш. c, 28H, (CH₂)₁₄), 1.43 (π, 2H, *J* 6.9, CH₂CH₂CH₂CH₂NC), 1.67 (м, 2H, CH₂CH₂CH₂NC), 3.36 (ττ, 2H, *J* 1.9, 6.7, CH₂CH₂CH₂NC).

¹³C-ЯМР (101 МГц): 14.03, 22.63, 26.28, 28.66, 29.09, 29.31, 29.46, 29.55, 29.59, 29.61, 29.64, 31.88, 41.45 (τ, *J* 6.4, C<u>H</u>₂NC), 155.77 (τ, *J* 5.8, N<u>C</u>).

гас-1-*О*-Бензилглицидиловый эфир (**X**). К раствору *гас*-глицидола (**IX**) (6.7 мл, 0.09 моль) в 75 мл безводного DMF добавляли бензилбромид (14 мл, 0.120 моль). Охлаждали до 0°С и вносили порционно NaH (2.39 г, 1.0 моль). Перемешивали 18 ч при 24°С. Реакционную смесь разбавляли водой (250 мл), экстрагировали диэтиловым эфиром (3×100 мл), органический слой промывали водой (3×70 мл), сушили Na₂SO₄, фильтровали, упаривали. Продукт выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя системой петролейный эфир—этилацетат (85 : 15). Получили 14.23 г (96%) соединения (**X**) в виде масла светло-желтого цвета.

¹Н-ЯМР (300 МГи): 2.56–2.68 (м, 1H, C $\underline{H}_{a}H_{b}OCH$) и 2.74–2.84 (м, 1H, C $\underline{H}_{a}\underline{H}_{b}OCH$), 3.11–3.26 (м, 1H, CH₂OC<u>H</u>), 3.44 (дд, 1H, C $\underline{H}_{a}H_{b}$) и 3.77 (дд, 1H, *J* 3.0, 11.4, CH_a<u>H</u>_bOBn), 4.59 (с, 2H, OC<u>H</u>₂Ph), 7.21–7.44 (м, 5H, Ph).

¹³С-ЯМР (75 МГц): 44.41, 50.99, 70.94, 73.44, 76.78, 77.20, 77.63, 127.89, 128.56, 138.07.

rac-3-Бензилокси-1-денилокси-пропан-2-ол (XI). К 0.25 М раствору *н*-деканола (6 г. 0.04 моль) в ТНГ добавляли NaH (1.4 г, 0.06 моль) при 0°С и перемешивали 1 ч при 90°С. После охлаждения реакционной смеси до 25°С по каплям добавляли раствор соединения (X) (4.8 г, 0.03 ммоль) в 1 М растворе DMF и перемешивали 12 ч при 90°С. Органические растворители удаляли в вакууме, к остатку добавляли 150 мл DCM, промывали водой (5 × 70 мл). Водный слой дополнительно экстрагировали DCM (4 × 70 мл). Объединенный органический экстракт сушили Na₂SO₄, фильтровали, упаривали. Продукт выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя системой петролейный эфир-этилацетат (85:15). Получили 6.21 г соединения (XI).

rac-3-Бензилокси-1-децилокси-2-этоксипропан (XII). К раствору 6.21 г соединения (XI) в 150 мл безводном ТНF добавляли NaH (0.9 г, 0.04 ммоль) и перемешивали 2 ч при 90°С, охлаждали до 24°C, затем добавляли этилбромид (3 мл, 0.04 ммоль) и перемешивали 6 ч при 90°С. Реакционную смесь концентрировали в вакууме, добавляли DCM (10 мл) и воду (10 мл), экстрагировали DCM (4 × 50 мл), органический слой промывали водой (4 × 50 мл). Объединенный органический экстракт сушили Na₂SO₄, фильтровали, упаривали. Продукт выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя смесью петролейный эфир-этилацетат (50 : 1). Получили 3.06 г (32% по двум стадиям) соединения (XII) в виде бесцветного масла.

¹H-*Я*MP (300 MΓ_I): 0.88 (τ, 3H, *J* 6.8, (CH₂)₉C<u>H</u>₃), 1.14 (τ, 3H, *J* 7.0, OCH₂C<u>H</u>₃), 1.17–1.32 (уш. с., 14H, (C<u>H</u>₂)₇CH₃), 1.38–1.58 (м, 2H, OCH₂C<u>H</u>₂), 3.32–3.65 (м, 9H, OC<u>H</u>₂C<u>H</u>(OC<u>H</u>₂CH₃)C<u>H</u>₂OC<u>H</u>₂), 4.49 (c, 2H, C<u>H</u>₂Ph), 7.16–7.31 (м, 5H, C₆<u>H</u>₅).

¹³C-ЯМР (75 МГц): 14.07. 15.62, 22.66, 26.10, 29.31, 29.46, 29.56, 29.60, 29.64, 31.89, 65.70, 70.36, 70.77, 71.67, 73.37, 77.72, 127.48, 127.57, 128.29, 138.46.

гас-3-Децилокси-2-этоксипропан-1-ол (XIII). К суспензии 5% Pd/C (0.2 г) в безводном THF (80 мл) добавляли соединение (XII) (3.06 г, 8.7 ммоль) и вакуумировали в течение 5 мин. Затем выдерживали при перемешивании в атмосфере водорода в течение 12 ч. Далее реакционную смесь фильтровали через Celite[®] 545 (Sigma, США), целевое вещество выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя системой петролейный эфир—этилацетат (25 : 1). Получили 2.27 г (98%) соединения (**XIII**) в виде бесцветного масла.

¹Н-ЯМР (300 МГи): 0.88 (т. 3H, *J* 6.7, (CH₂)₉C<u>H</u>₃), 1.15 (т. 3H, *J* 7.0, OCH₂C<u>H</u>₃), 1.21– 1.47 (уш. с., 14H, (C<u>H</u>₂)₇CH₃), 1.47–1.62 (м. 2H, OCH₂C<u>H</u>₂), 2.13 (с. 1H, CH₂O<u>H</u>), 3.34–3.82 (м. 9H, OC<u>H₂CH(OCH₂CH₃)CH₂OCH₂).</u>

¹³С-ЯМР (75 МГц): 13.96, 15.46, 22.56, 25.98, 29.20, 29.34, 29.45, 29.48, 29.51, 31.79, 62.89, 65.44, 70.83, 71.73, 78.18.

MS-ESI, m/z: $[M + NH_4]^+$ рассчитано для $C_{15}H_{36}NO_3$ 278.27, найдено 277.85.

гас-1-Бромо-3-децилокси-2-этоксипропан (XIV). К раствору соединения (XIII) (2.27 г, 8.7 ммоль) в безводном DCM (20 мл) добавляли Ph_3P (3.43 г, 13.1 ммоль) при 0°С. Через 15 мин добавляли CBr_4 (4.34 г, 13.1 ммоль) и перемешивали 2 ч при 25°С. Добавляли 25 мл MeOH и перемешивали 15 мин. Полученный раствор упаривали, выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя системой петролейный эфир—этилацетат (30 : 1). Получили 2.80 г (99%) соединения (XIV) в виде бесцветного масла.

¹H-*Я*MP (300 МΓц): δ 0.88 (т, 3H, *J* 6.7, O(CH₂)₉CH₃), 1.15–1.49 (уш. с, 17H, (CH₂)₇CH₃; OCH₂CH₃), 1.48–1.66 (м, 2H, OCH₂CH₂), 3.39–3.73 (м, 9H, BrCH₂CH(OCH₂CH₃)CH₂OCH₂).

¹³C-ЯМР (75 МГц): δ 14.08, 15.45, 22.66, 26.07, 29.30, 29.43, 29.55, 29.59, 31.89, 32.66, 65.75, 70.75, 71.78, 77.71.

HRMS-ESI, m/z: $[M + Na]^+$ рассчитано для $C_{15}H_{31}$ NaBrO₂ 345.1405, найдено 345.1405.

гас-1-Азидо-3-децилокси-2-этоксипропан (XV). К раствору бромида (XIV) (2.76 г, 8.5 ммоль) в DMF (40 мл) добавляли NaN₃ (0.8 г, 12.8 ммоль) и перемешивали 4 ч при 90°С. Реакционную смесь охлаждали, полученный раствор концентрировали в вакууме, добавляли воду (25 мл) и экстрагировали этилацетатом (3 × 50 мл). Органический слой промывали водой (5 × 50 мл), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и упаривали. Получили 2.38 г (98%) соединения (XV) в виде бесцветного масла.

¹H-ЯМР (300 МГш): 0.88 (т, 3H, *J* 6.8, (CH₂)₇C<u>H</u>₃), 1.15–1.40 (м, 17H, CH₂C<u>H</u>₃, (C<u>H</u>₂)₇CH₃), 1.55 (π, 2H, *J* 6.9, OCH₂C<u>H</u>₂), 3.25–3.75 (м, 9H, 3C<u>H</u>₂O, CHO, C<u>H</u>₂N₃).

¹³C-ЯМР (75 МГц): 14.07, 15.49, 22.66, 26.08, 29.30, 29.43, 29.55, 29.58, 31.88, 52.03, 65.86, 70.22, 71.79, 77.70.

HRMS-ESI, m/z: $[M + Na]^+$ рассчитано для $C_{15}H_{31}O_2N_3Na$ 308.2314, найдено 308.2307.

гас-1-Амино-3-децилокси-2-этоксипропан (XVI). К раствору азида (XV) (856 мг, 3.0 ммоль) в этилацетате (30 мл) добавляли каталитическое количество 10% Pd/C (0.03 ммоль). Реакционную смесь охлаждали до 5°C и перемешивали в атмосфере водорода в течение 6 ч. Реакционную смесь фильтровали через подложку с Celite[®] 545, промывали этилацетатом (15 мл), растворитель удаляли в вакууме. Остаток хроматографировали на силикагеле, элюируя системой DCM-MeOH (30:1). Получили 350 мг (45%) соединения (XVI) в виде бесцветного масла.

¹H-*AMP* (300 M Γ u): 0.86 (T, 3H, *J* 6.6, (CH₂)₇C<u>H₃</u>), 1.14–1.37 (M, 23H, (C<u>H</u>₂)₇CH₃, CH₂C<u>H₃</u>), 1.54 (п, 3H, *J* 6.6, OCH₂C<u>H₂</u>), 2.20 (уш. с, 2H, NH₂), 2.64–2.97 (M, 2H, C<u>H</u>₂NH₂), 3.29–3.79 (M, 7H, 3OC<u>H</u>₂, OCH).

¹³C-ЯМР (75 МГц): 14.05, 15.60, 22.63, 26.08, 29.28, 29.43, 29.53, 29.56, 29.62, 31.86, 43.33, 65.48, 71.23, 71.72, 79.27.

HRMS-ESI, m/z: $[M + H]^+$ рассчитано для $C_{15}H_{34}NO_2$ 260.2584, найдено 260.2557.

гас-1-Децилокси-3-формамидо-2-этоксипропан (XVII). К раствору соединения (XVI) (2.73 г, 11.0 ммоль) и DIPEA (1.87 мл, 11.0 ммоль) в DCM (42 мл) добавляли (формилокси)ацетонитрил (0.8 мл, 11.0 ммоль) и перемешивали 5 ч. Затем реакционную смесь концентрировали в вакууме, хроматографировали на силикагеле, элюируя системой DCM-MeOH (50 : 1). Получили 2.14 г (71%) соединения (XVII) в виде бесцветного масла.

¹Н-ЯМР (300 МГц, основной ротамер): 0.85 (т, 3H, *J* 6.8, (CH₂)₇C<u>H₃</u>), 1.11–1.36 (м, 17H, (C<u>H₂</u>)₇CH₃, CH₂C<u>H₃</u>), 1.53 (п, 2H, *J* 6.0, OCH₂C<u>H₂</u>), 3.19–3.73 (м, 9H, 3OCH₂, CHO, CH₂N), 6.17 (с, 1H, NH), 8.16 (с, 1H, NHC<u>H</u>O).

¹³C-ЯМР (75 МГц): δ 14.11, 15.50, 22.67, 26.07, 29.31, 29.43, 29.54, 29.56, 29.58, 31.88, 39.37, 65.38, 71.35, 71.90, 76.06, 161.46.

HRMS-ESI, m/z: $[M + H]^+$ рассчитано для $C_{16}H_{34}NO_3$ 288.2533, найдено 288.2533.

HRMS-ESI, m/z: $[M + Na]^+$ рассчитано для $C_{16}H_{33}NO_3Na$ 310.2353, найдено 310.2351.

гас-1-Децилокси-3-изоциано-2-этоксипропан (XVII). К 0.1 М раствору соединения (XVII) (287 мг, 1.0 ммоль) в DCM добавляли Ph_3P (393 мг, 1.5 ммоль), I_2 (380 мг, 1.5 ммоль) и TEA (0.42 мл, 3.0 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 48 ч при 24°С, концентрировали, выделяли колоночной хроматографией на силика-геле, элюируя системой петролейный эфир—этилацетат (8 : 2). Получили 202 мг (72%) соединения (XVIII).

¹H-ЯМР (400 МГц): δ 0.90 (т, 3H, *J* 6.8, (CH₂)₇C<u>H₃</u>), 1.20–1.39 (м, 17H, (C<u>H₂</u>)₇CH₃,

CH₂C<u>H</u>₃), 1.58 (п, 2H, *J* 6.9, OCH₂C<u>H</u>₂), 3.40–3.72 (м, 9H, 3OCH₂, CHO, CH₂N).

¹³C-ЯМР (101 МГц): δ 14.09, 15.37, 22.65, 26.03, 29.29, 29.40, 29.50, 29.53, 29.56, 31.87, 42.96 (т, *J*7.0, <u>CH</u>₂NC), 66.05, 69.23, 71.87, 75.79, 157.35 (т, *J*5.5, N<u>C</u>).

MS-ESI, m/z: $[M + NH_4]^+$ рассчитано для $C_{16}H_{35}N_2O_2$ 287.27, найдено: 287.42.

MS-ESI, m/z: $[M + Na]^+$ рассчитано для $C_{16}H_{31}NNaO_2$ 292.23, найдено 293.08.

1-Азидо-1-дезокси-2,3,4,6-тетра-*О***-ацетил-***β***-D-глюкопираноза (ХХ).** К раствору бромида (ХІХ) (27 г, 67.0 ммоль) в DMF (113 мл) добавляли NaN₃ (6 г, 0.1 моль) и перемешивали 3 ч при 90°С. К реакционной смеси добавляли CHCl₃ (150 мл) и H₂O (150 мл). Экстрагировали CHCl₃ (4 × 100 мл), объединенный органический экстракт промывали H₂O (3 × 100 мл). Сушили безводным Na₂SO₄, фильтровали, упаривали, остаток хроматографировали на силикагеле, элюируя системой толуолэтилацетат (1 : 1). Получили 22 г (90%) соединения (**ХХ**) в виде желтого кристаллизующегося масла.

¹Н-ЯМР (300 МГц): δ 2.00, 2.02, 2.07, 2.09 (все с по 3H, 4OAc), 3.79 (ддд, 1H, *J* 2.4, 4.7, 9.9, H-5), 4.16 (дд, 1H, *J* 2.4, 12.5, H-6), 4.27 (дд, 1H, *J* 4.7, 12.5, H-6), 4.64 (д, 1H, *J* 8.9, H-1), 4.95 (дд, 1H, *J* 8.9, 9.5, H-2), 5.09 (дд, 1H, *J* 9.4, 9.9, H-4), 5.21 (дд, 1H, *J* 9.4, 9.5, H-3).

¹³C-ЯМР (75 МГц): δ 20.62, 20.77, 61.73, 67.94, 70.69, 72.66, 74.07, 87.96, 169.29, 169.39, 170.19, 170.69.

MS-ESI, m/z: $[M + Na]^+$ рассчитано для $C_{14}H_{19}NaO_9$ 396.10, найдено 396.78.

1-Амино-1-дезокси-2,3,4,6-тетра-*О*-ацетил-β-D-глюкопираноза (XXI). Суспензию соединения (XX) (20 г, 0.05 моль) и 10% Pd/C (57 мг, 0.5 ммоль) в этилацетате (107 мл) вакуумировали 5 мин, затем выдерживали в атмосфере водорода при перемешивании в течение 12 ч. Растворитель удаляли на роторном испарителе, хроматографировали в системе толуол—этилацетат (6 : 3). Получили 17 г (91%) соединения (XXI) в виде желтого кристаллизующегося масла.

¹H-ЯМР (300 МГц): δ 2.00, 2.01, 2.07, 2.08 (все с по 3H, 4OAc), 2.98 (уш. с, 2H, NH₂), 3.70 (ддд, 1H, *J* 2.4, 4.8, 10.0, H-5), 4.05–4.15 (м, 1H, H-6), 4.17–4.29 (м, 2H, H-1, H-6), 4.86 (дд, 1H, *J* 9.5, 9.7, H-2), 5.04 (дд, 1H, *J* 9.4, 10.0, H-4), 5.23 (дд, 1H, *J* 9.4, 9.5, H-3).

¹³C-ЯМР (75 МГц): δ 20.61, 20.78, 20.86, 62.17, 68.64, 71.84, 72.91, 73.08, 84.50, 169.53, 170.18, 170.27, 170.73.

MS-ESI, *m/z*: [*M* + H]⁺ рассчитано для C₁₄H₂₂NO₉ 348.1289, найдено 348.1298.

2,3,4,6-Тетра-*О***-ацетил-1-дезокси-1-формами**до-**β**-**D**-глюкопираноза (XXII). К охлажденному до 0°С раствору уксусного ангидрида (6 мл, 0.06 моль) добавляли муравьиную кислоту (3 мл, 0.9 моль) и перемешивали при 60°С в течение 2 ч. Затем раствор охлаждали до 24°С и добавляли к соединению (XXI) (1 г, 3.0 ммоль), далее добавляли DIPEA (2 мл, 0.01 моль). Реакционную массу перемешивали 3 ч, переносили в делительную воронку, приливали этилацетат (50 мл) и 25% NH₃ · H₂O (25 мл). Экстрагировали этилацетатом (3 × 25 мл), органический остаток промывали водой (3 × 25 мл). Сушили Na₂SO₄, фильтровали, упаривали. Получили 0.9 г (82%) соединения (XXII) в виде желтого кристаллизующегося масла.

¹Н-ЯМР (300 МГц): δ 2.01, 2.03, 2.05, 2.07 (все с по 3H, 4 ОАс), 3.83 (ддд, 1H, *J* 2.2, 4.5, 10.2, H-5), 4.04–4.18 (м, 2H, H-1, H-6), 4.30 (дд, 1H, *J* 4.5, 12.5, H-6), 4.94 (дд, 1H, *J* 9.5, 9.6, H-2), 5.06 (дд, 1H, *J* 9.4, 10.2, H-4), 5.30 (дд, 1H, *J* 9.4, 9.6, H-3), 6.50 (д, 1H, *J* 9.3, NH), 8.21 (с, 1H, CHO).

¹³C-9MP (75 MΓ_μ): δ 20.69 (2CH₃, +), 20.78 (CH₃, +), 20.84 (CH₃, +), 61.73 (CH₂, -), 68.18 (CH, +), 70.54 (CH, +), 72.71 (CH, +), 73.86 (CH, +), 169.68 (C, -), 169.98 (C, -), 170.13 (C, -), 170.74 (C, -), 171.11 (C, -).

HRMS-ESI, m/z: $[M + H]^+$ рассчитано для $C_{15}H_{22}NO_{10}$ 376.1238, найдено 376.1239.

1-Дезокси-1-изоциано-2,3,4,6-тетра-*О***-ацетил-***β***-***Б***-***с***люкопираноза (XXIII).** Способ А: к раствору соединения (XXII) (1 г, 3.0 ммоль), Ph_3P (2 г, 8.0 ммоль) и ТЕА (2 мл, 11.0 ммоль) в DCM (27 мл) добавляли CBr₄ (3 г, 8.0 ммоль) и перемешивали 3 ч при 24°С. Растворитель удаляли в вакууме, остаток хроматографировали, элюируя смесью толуол—этилацетат (7 : 3). Получили 0.7 г (69%) соединения (XXIII) в виде желтого кристаллизующегося масла.

Способ Б: к раствору соединения (**XXII**) (1 г, 3.0 ммоль), Ph_3P (2 г, 8.0 ммоль) и ТЕА (2 мл, 11.0 ммоль) в DCM (27 мл) добавляли I_2 (3 г, 8.0 ммоль) и перемешивали 3 ч при 24°С. Растворитель удаляли в вакууме, остаток хроматографировали, элюируя системой толуол—этилацетат (7:3). Получили 0.6 г (60%) соединения (**XXIII**) в виде желтого кристаллизующегося масла.

¹H-*Я*MP (600 МΓц): δ 2.02, 2.03, 2.11, 2.12 (все с по 3H, 4 OAc), 3.74 (ддд, 1H, J 2.2, 4.8, 10.0, 5-CH), 4.15 (дд, 1H, J 2.2, 12.6, 6- $\underline{H}_{a}H_{b}$), 4.25 (дд, 1H, J 4.8, 12.6, 6- $\underline{H}_{a}\underline{H}_{b}$), 4.85 (ABC<u>D</u>, 1H, J 9.3 Гц, H-1), 5.14 (AB<u>C</u>D, 1H, J 9.1, 10.0, 4-CH), 5.20 (A<u>B</u>CD, 1H, J 9.3, 9.5, H-2) 5.22 (<u>A</u>BCD, 1H, J 9.1, 9.5, H-3).

¹³C-ЯМР (151 МГц): δ 20.44, 20.50, 20.66, 61.70, 67.95, 71.64, 72.50, 75.08, 79.74, 165.85, 168.87, 169.17, 169.97, 170.43.

HRMS-ESI, m/z: $[M + H]^+$ рассчитано для С₁₅Н₂₀NO₉ 358.1133, найдено 357.1152.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен синтез изонитрильных производных углеводов и диглицерида, содержащего протяженный алкильный заместитель при атоме С-1 и этильный – при атоме С-2 глицерина. Впервые установлены и описаны точные значения КССВ для изонитрильного производного D-глюкозы, что позволяет говорить о пространственной геометрии молекулы. Полученные соединения планируется в дальнейшем использовать в качестве строительных блоков в многокомпонентных реакциях Уги для получения липофильных полиаминов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования центра коллективного пользования МИРЭА - Российского технологического университета при поддержке Минобрнауки России.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-33-90301).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Giovenzana G.B., Tron G.C., Di Paola S., Menegotto I.G., Pirali T. // Angewandte Chem. 2006. V. 118. P. 1117-1120. https://doi.org/10.1002/ange.200503095
- 2. Giustiniano M., Basso A., Mercalli V., Massarotti A., Novellino E., Tron G.C., Zhu J. // Chem. Soc. Rev. 2017. V. 46. P. 1295-1357. https://doi.org/10.1039/c6cs00444j
- 3. Mossetti R., Pirali T., Saggiorato D., Tron G.C. // Chem. Commun. 2011. V. 47. P. 6966-6968. https://doi.org/10.1039/c1cc12067k
- 4. Hofmann A.W. // Justus Liebigs Annalen der Chem. 1867. V. 144. P. 114-120. https://doi.org/10.1002/jlac.18671440116

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ <u>№</u> 4 2021 том 47

- 5. Ugi I., Meyr R. // Angewandte Chem. 1958. V. 70. P 702-703 https://doi.org/10.1002/ange.19580702213
- 6. Josien H., Ko S.B., Bom D., Curran D.P. // Chem. Europ. J. 1998, V. 4, P. 67-83. https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3765(199801)4: 1<67::AID-CHEM67>3.0.CO;2-F
- 7. Wang X., Wang Q.G., Luo Q.L. // Synthesis. 2015. V. 47. P. 49–54. https://doi.org/10.1055/s-0034-1379111
- 8. Gautier A. // Justus Liebigs Annalen der Chem. 1867. V. 142. P. 289–294. https://doi.org/10.1002/jlac.18671420304
- 9. El Kaim L., Grimaud L., Schiltz A. // Org. Biomol. Chem. 2009. V. 7. P. 3024-3026. https://doi.org/10.1039/b908541f
- 10. Gassman P.G., Guggenheim T.L. // J. Am. Chem. Soc. 1982. V. 104. P. 5849-5850. https://doi.org/10.1021/ja00385a078
- 11. Kitano Y., Chiba K., Tada M. // Synlett. 1999. V. 1999. P. 288-290. https://doi.org/10.1055/s-1999-2615
- 12. Kitano Y., Chiba K., Tada M. // Synthesis. 2001. V. 2001. P. 0437–0443. https://doi.org/10.1055/s-2001-11423
- 13. Пучков П.А., Перевощикова К.А., Карташова И.А., Лунева А.С., Кабилова Т.О., Морозова Н.Г., Зенкова М.А., Маслов М.А. // Биоорг. химия. 2017. Т. 43. С. 543-552. [Puchkov P.A., Perevoshchikova K.A., Kartashova I.A., Luneva A.S., Kabilova T.O., Morozova N.G., Zenkova M.A., Maslov M.A. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2017. V. 43. P. 561-569.1

https://doi.org/10.1134/S1068162017050107

14. Petukhov I.A. Maslov M.A. Morozova N.G., Serebrennikova G.A. // Russ. Chem. Bull. 2010. V. 59. P. 260-268.

https://doi.org/10.1007/s11172-010-0071-x

- 15. Perevoshchikova K.A., Nichugovskiv A.I., Isagulieva A.K., Morozova N.G., Ivanov I.V., Maslov M.A., Shtil A.A. // Mend. Comm. 2019. V. 29. P. 616-618. https://doi.org/10.1016/j.mencom.2019.11.003
- 16. Morozova N.G., Timofeev G.A., Timakova A.A., Shmendel E.V., Kubasova T.S., Tvutyunnik L.L., Markova A.A., Maslov M.A., Shtil A.A. // Mend. Comm. 2015. V. 25. P. 248-249. https://doi.org/10.1016/j.mencom.2015.07.003

- 17. Morozova N.G., Shmendel E.V., Timofeev G.A., Ivanov I.V., Kubasova T.S., Plvavnik N.V., Markova A.A., Maslov M.A., Shtil A.A. // Mend. Comm. 2019. V. 29. P. 166-168. https://doi.org/10.1016/j.mencom.2019.03.016
- 18. Shmendel E.V., Perevoshchikova K.A., Shishova D.K., Kubasova T.S., Tyutyunnik L.L., Maslov M.A., Morozova N.G., Shtil A.A. //Russ. Chem. Bull. 2015. V. 64. P. 1648-1654. https://doi.org/10.1007/s11172-015-1055-7
- Lashin W.H., Nassar I.F., El Farargy A.F., Abdelha-mid A.O. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 1074–1086. https://doi.org/10.1134/S1068162020060163
- 20. Tolan H.E., Radwan M.A., Soliman H.A., Awad H.M., El-Sayed W.A. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 1136-1147. https://doi.org/10.1134/S1068162020060345

- Горюнова О.В., Захарчук Г.М., Жукова О.С., Фетисова Л.В., Кузьмина Н.Е. // Биоорг. химия. 2014. Т. 40. С. 12–19. [Goryunova O.V., Zakharchuk G.M., Zhukova O.S., Fetisova L.V., Kuzmina N.E. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2014. V. 40. Р. 9–15.] https://doi.org/10.1134/S106816201401004X
- Морозова Н.Г., Маслов М.А., Мягченков В.В., Серебренникова Г.А. // Биоорг. химия. 2010. Т. 36. С. 714–720. [Morozova N.G., Maslov М.А., Myagchenkov V.V., Serebrennikova G.A. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2010. V. 36. P. 657–662.] https://doi.org/10.1134/S1068162010050146
- La Spisa F., Feo A., Mossetti R., Tron G.C. // Org. Lett. 2012. V. 14. P. 6044–6047. https://doi.org/10.1021/ol302935y
- Zheng Q., Tang S., Fu X., Chen Z., Ye Y., Lan X., Jiang L., Huang Y., Ding J., Geng M., Huang M., Wan H. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2017. V. 27. P. 5262–5266. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.10.029

- Lemieux R.U., Brice C. // Canad. J. Chem. 1952. V. 30. P. 295–310. https://doi.org/10.1139/v52-041
- 26. *Polisar J.G., Li L., Norton J.R.* // Tetrahedron Lett. 2011. V. 52. P. 2933–2934. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2011.03.122
- 27. Appel R. // Angewandte Chem. Int. Ed. Engl. 1975.
 V. 14. P. 801–811. https://doi.org/10.1002/anie.197508011
- Arezzini B., Ferrali M., Ferrari E., Frassineti C., Lazzari S., Marverti G., Spagnolo F., Saladini M. // Eur. J. Med. Chem. 2008. V. 43. P. 2549–2556. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.02.045
- Hu G., Li W., Hu Y., Xu A., Yan J., Liu L., Zhang X., Liu K., Zhang A. // Macromol. 2013. V. 46. P. 1124–1132. https://doi.org/10.1021/ma302536t
- Cheshkov D.A., Sheberstov K.F., Sinitsyn D.O., Chertkov V.A. // Magnet. Reson. Chem. 2018. V. 56. P. 449– 457. https://doi.org/10.1002/mrc.4689

Synthesis of Isonitrile Derivatives of Diglycerides and Carbohydrates as an Intermediates for Multicomponent Ugi Reaction

A. I. Nichugovskiy^{*, #}, A. A. Khrulev^{*}, K. A. Perevoshchikova^{*}, D. A. Cheshkov^{**}, N. G. Morozova^{*}, and M. A. Maslov^{*}

*Phone: +7 (499) 215-65-65 (ext. 807); e-mail: ashpwnz77@gmail.com
 *Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University, prosp. Vernadskogo 78, Moscow, 119454 Russia
 **State Scientific Research Institute of Chemistry and Technology of Organoelement Compounds,

sh. Entuziastov 38, Moscow, 105118 Russia

Recent years have shown a rapidly growing interest in multicomponent reactions, mainly due to their ability to assemble complex molecular structures in just a few steps. The key reagent of multicomponent reactions is isocyanide, which exhibits dual properties — both electrophile and nucleophile. There are several ways to form isonitrile derivatives, but one of the main ones is intramolecular dehydration of formamide. In this work, we have performed the synthesis of isonitrile derivatives of dialkylglycerol and D-glucose, which, upon further interaction under the conditions of multicomponent reactions, can serve as new useful blocks for the construction of chemical libraries of lipophilic polyamines containing a carbohydrate residue at the terminal nitrogen atom. The structures of all synthesized compounds were confirmed by physicochemical methods of analysis, and can be used as building blocks for the multicomponent Ugi reaction.

Keywords: multicomponent Ugi reaction, lipids, carbohydrates, isonitrile, NMR