

СОДЕРЖАНИЕ

Том 48, номер 6, 2022

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

Перспективы использования сульфатированных полисахаридов с высоким содержанием фукозы из морских организмов в лечении и профилактике COVID-19 и постковидного синдрома (обзорная статья)

М. В. Киселевский, Н. Ю. Анисимова, М. И. Билан, А. И. Усов, Н. Е. Устюжанина, А. А. Петкевич, И. Ж. Шубина, Г. Е. Морозевич, Н. Э. Нифантьев 633

Синтез и биологическая активность *N*-ацилгидразонов (обзорная статья)

Э. Р. Беляева, Ю. В. Мясоедова, Н. М. Ишмуратова, Г. Ю. Ишмуратов 648

Петлевая изотермическая амплификация: от теории к практике (обзорная статья)

Ф. В. Шириков, Ю. А. Беспятых 677

Взаимодействие фторфенильного аналога ретиналя с протеородопсином из *Exiguobacterium sibiricum*

Н. Е. Беликов, Л. Е. Петровская, Е. А. Крюкова, Д. А. Долгих, Е. П. Лукашев, А. Ю. Лукин, О. В. Демина, С. Д. Варфоломеев, В. В. Чупин, А. А. Ходонов 694

Синтез 2-метилен-спермидина и его *N*¹-ацетильного производного

М. А. Хомутов, А. Р. Хомутов 707

Рибофлавин как один из возможных компонентов биоломинесцентной системы грибных комаров рода *Keroplatus* (Insecta: Diptera: Keroplatidae)

А. А. Котлобай, М. А. Дубинный, А. В. Полевой, С. И. Ковальчук, З. М. Каськова 714

Поиск опухолеспецифических промоторов *in silico*

К. Н. Кашкин 721

Расчеты свободной энергии взаимодействия широкоспецифичной пиримидиннуклеозидфосфорилазы с потенциальными ингибиторами

П. А. Эйстрих-Геллер, С. В. Рубинский, В. Р. Самыгина, А. А. Лашков 732

ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

Циклооктатетраен как флоростабилизатор флуорогена белка FAST

А. И. Соколов, А. А. Горшкова, Н. С. Балеева, М. С. Баранов 745

Кетопроизводные арилиден-имидазолонов как флуорогенные красители

А. И. Соколов, А. А. Горшкова, Н. С. Балеева, М. С. Баранов 751



УДК 547.458.5

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ФУКОЗЫ ИЗ МОРСКИХ ОРГАНИЗМОВ В ЛЕЧЕНИИ И ПРОФИЛАКТИКЕ COVID-19 И ПОСТКОВИДНОГО СИНДРОМА

© 2022 г. М. В. Киселевский*, #, Н. Ю. Анисимова*, М. И. Билан**, А. И. Усов**, Н. Е. Устюжанина**, А. А. Петкевич*, И. Ж. Шубина*, Г. Е. Морозевич***, Н. Э. Нифантьев**, #

*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, Россия, 115522 Москва, Каширское ш., 23

**Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Россия, 119991 Москва, Ленинский просп., 47

***Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Россия, 119121 Москва, Погодинская ул., 10

Поступила в редакцию 20.06.2022 г.

После доработки 24.06.2022 г.

Принята к публикации 26.06.2022 г.

Симптомы появившейся в 2019 г. новой коронавирусной инфекции (COVID-19) варьируют от незначительного повышения температуры тела и слабости до острой пневмонии и полиорганной недостаточности. Клиническая картина COVID-19 гетерогенна и полисистемна, поэтому для лечения необходимы лекарственные средства с широким спектром действия. До сих пор не решена проблема выбора стратегии лечения постковидного синдрома. Полисахариды с высоким содержанием фукозы, выделенные из морских водорослей и животных, могут составить основу для последующего создания перспективных агентов для лечения COVID-19 и постковидного синдрома. Этот класс биополимеров проявляет разнообразную биологическую активность, включая противовирусную, антитромботическую, антикоагулянтную, гемостимулирующую, противовоспалительную и иммунорегуляторную. Низкомолекулярные производные указанных полисахаридов, а также синтетические олигосахариды с оптимизированными параметрами (размер и структура углеводной цепи, степень сульфатирования, положение сульфатных групп) можно рассматривать как наиболее перспективные соединения из-за высокой биодоступности, что, несомненно, увеличивает их терапевтический потенциал.

Ключевые слова: фукоидан, фукозилированный хондроитинсульфат, COVID-19, S-гликопротеин, гепарансульфат

DOI: 10.31857/S013234232206015X

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	633
ПРОТИВОКОРОНАВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ.....	637
ЛЕЧЕНИЕ И ПРОФИЛАКТИКА ИММУНОСУПРЕССИИ.....	637

АНТИКОАГУЛЯНТНЫЕ СВОЙСТВА СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ.....	638
ПРОТИВОФИБРОЗНАЯ АКТИВНОСТЬ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ.....	639
ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ЭФФЕКТ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ.....	640
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	641
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	642

ВВЕДЕНИЕ

Морские водоросли и некоторые виды животных содержат сульфатированные полисахариды

Сокращения: COVID-19 — коронавирусная инфекция 2019 года; НИТ — тромбоцитопения, индуцируемая гепарином; LPS — липополисахарид; НК-клетки — естественные киллеры, тип цитотоксических лимфоцитов; SARS-CoV-2 — коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2; TGF-β — трансформирующий фактор роста бета; TNF-α — фактор некроза опухоли альфа; ОРДС — острый респираторный дистресс-синдром; СФ — сульфатированные фуканы; ФХС — фукозилированные хондроитинсульфаты.

Автор для связи: (эл. почта: kisele@inbox.ru, nep@ioc.ac.ru).

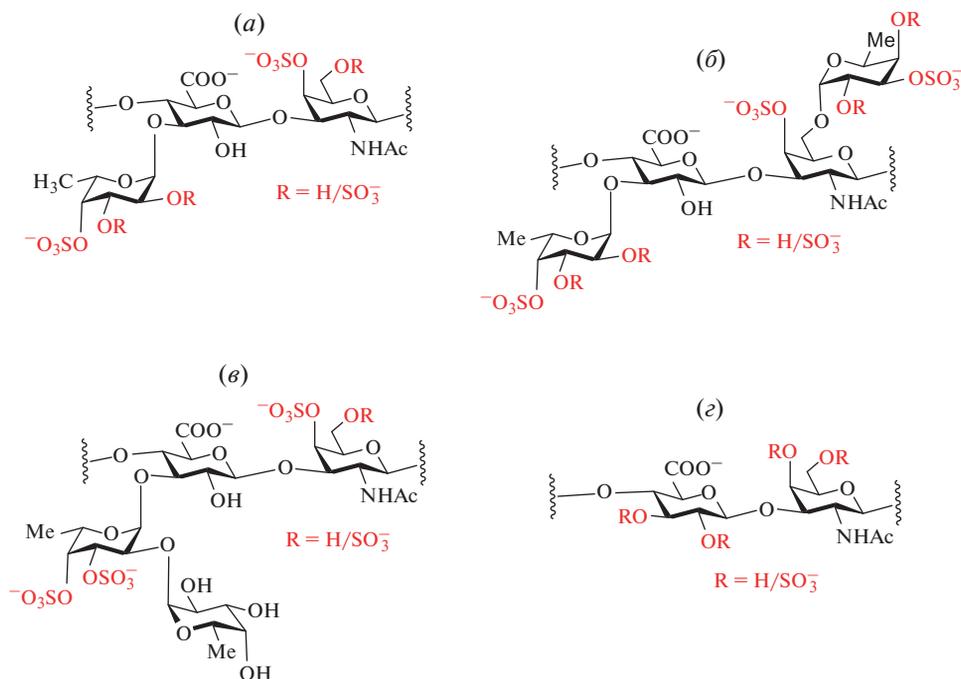


Рис. 1. Примеры фукозилированных хондроитинсульфатов (ФХС) из голотурий: (а) – полисахарид из *Cucumaria japonica* [2], имеющий трисахаридное повторяющееся звено, типичное для большинства известных ФХС; (б) – фрагмент углеводной цепи ФХС из *Cucumaria frondosa* [3], содержащий разветвления как при О-3 остатка глюкуроновой кислоты, так и при О-6 остатка *N*-ацетил-галактозамина; (в) – фрагмент углеводной цепи ФХС из *Eupentacta fraudatrix*, содержащий в качестве боковой цепи (1→2)-связанный дифукозильный остаток [4]; (г) – фрагмент другого ФХС из *Eupentacta fraudatrix*, содержащего 2,3-дисульфатированный остаток глюкуроновой кислоты [4]. Красным цветом выделены сульфаты в фиксированных положениях и варьируемые заместители R.

различной структуры. Наиболее изучены полисахариды с высоким содержанием фукозы, выделенные из иглокожих (морских ежей и морских огурцов) и бурых водорослей. Так, в стенке тела голотурий (морских огурцов) содержатся два типа указанных полисахаридов: фукозилированные хондроитинсульфаты (ФХС) и сульфатированные фулканы (СФ). ФХС – уникальные полисахариды голотурий. В основе их молекул лежит линейная цепь, построенная из чередующихся остатков *N*-ацетилгалактозамина и глюкуроновой кислоты, соединенных в дисахаридный блок $\rightarrow 3$)- β -D-GalNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcA-(1 \rightarrow . Строение этой цепи не отличается от строения углеводной цепи ФХС позвоночных [1], однако молекулы ФХС несут разветвления, чаще всего в виде остатков α -L-фукозы при О-3 остатков глюкуроновой кислоты. Встречаются и более сложные боковые цепи, такие как дисахаридные блоки, состоящие из остатков Fuc, Gal и GalNAc, присоединенные не только к О-3 глюкуроновой кислоты, но и также к О-4 или О-6 *N*-ацетил-галактозамина. Сульфатные группы обычно расположены при О-4 или О-6 (или одновременно при О-4 и О-6) остатков *N*-ацетил-галактозамина, занимают различные положения в остатках фукозы и иногда могут встречаться при О-2 или О-3

остатков глюкуроновой кислоты (рис. 1) [2–4]. Структуры ФХС, выделенных из различных видов голотурий, специфичны для данных видов животных [5].

Образцы СФ были впервые получены из морских ежей. СФ – компоненты гидрофильной оболочки яйцеклеток, играющие ключевую роль в процессе оплодотворения. Цепи этих полисахаридов, как правило, линейны и построены из соединенных через (1→3)-связь остатков α -L-фукозы с различным профилем сульфатирования. Специфичное расположение сульфатных групп в цепи обычно приводит к образованию тетрасахаридного повторяющегося звена [6]. Эти полисахариды могут быть получены из морских ежей в очень ограниченных количествах, но похожие СФ вместе с ФХС присутствуют в более значимых количествах в стенке тела голотурий. СФ из голотурий более разнообразны по структуре, они представляют собой линейные цепи, построенные из (1→3)- или (1→4)-связанных остатков фукозы, которые могут содержать разветвления. Сульфатные группы в СФ могут располагаться как в основной цепи, так и в боковых звеньях (рис. 2). В одном виде морских огурцов часто обнаруживают только один тип СФ [7], но известны примеры выделения из одного вида (например,

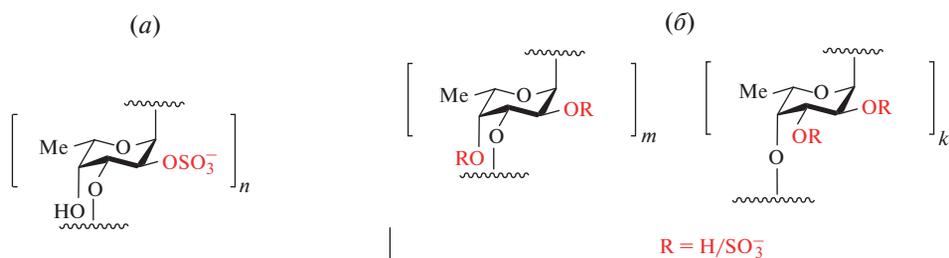


Рис. 2. Примеры сульфатированных фукоанов из голотурий: высокорегулярный полисахарид из *Stichopus horrens* [7] (а) и смесь различающихся по структуре полисахаридов из *Pattalus mollis* [8] (б). Красным цветом выделены сульфаты в фиксированных положениях и варьируемые заместители R.

из *Pattalus mollis*) нескольких различных по структуре СФ [8].

Бурые водоросли – практически неисчерпаемый источник сульфатированных полисахаридов с высоким содержанием фукозы, но эти биополимеры обычно обладают более сложным строением, чем ФХС и СФ. Наряду с остатками фукозы, они могут содержать другие моносахариды, такие как галактоза, ксилоза, манноза, глюкуроновая кислота [9]. Эти гетерогенные полисахариды были названы специфическим термином “фукоиданы”. Полисахаридная фракция, полученная из водорослей, часто представляет собой смесь различных по структуре биополимеров, у которых СФ может быть главным компонентом. Состав такой смеси зависит от вида и возраста водоросли, а также от условий произрастания. Цепи водорослевых СФ могут быть построены из повторяющихся (1→3)-связанных остатков фукозы [10] или из чередующихся (1→3)- и (1→4)-связанных фукозных звеньев [11], часто с ответвлениями в виде единичных остатков фукозы или разнообразных коротких олигосахаридов. Структурная регулярность, как правило, замаскирована произвольным расположением сульфатов или разветвлений. Полисахаридный экстракт из водорослей обычно содержит другие сульфатированные полисахариды, такие как галактофукоаны, фукоглюкурономаннаны и фукоглюкуронаны [12] (рис. 3).

Сульфатированные полисахариды демонстрируют различную биологическую активность благодаря взаимодействию с белками, определяющими протекание многих физиологических процессов. Наиболее хорошо изученным примером выступает антикоагулянтное действие, подобное эффекту гепарина [13]. Поскольку фукоиданы – это нетоксичные, биосовместимые и относительно легко доступные соединения, их рассматривают как перспективную основу для разработки новых медицинских препаратов с противовирусной, противовоспалительной, противоопухолевой, иммуномодулирующей и антикоагулянтной активностью. Уже опубликованы сотни статей, посвященных потенциальному терапевтическому эффекту фу-

коиданов и других полисахаридов с высоким содержанием фукозы [14–20].

Биологическое действие фукоиданов связывают, в первую очередь, с их высокой степенью сульфатирования, хотя другие тонкие детали структуры и молекулярный вес также играют существенную роль. Детальный структурный анализ фукоиданов чрезвычайно сложен из-за нерегулярности и гетерогенности их структуры [9]. Важно отметить, что большинство опубликованных биологических исследований фукоиданов было выполнено с использованием коммерческих образцов, которые получают без специальной очистки и подтверждения химического строения. В результате точная корреляция между структурой и биологической активностью таких продуктов не может считаться корректно установленной.

Большинство работ, предметом которых выступает биологическая активность сульфатированных фукозосодержащих полисахаридов, посвящены характеристике их антикоагулянтного и антитромботического действия [21–23]. Однако недавно противовирусная активность этих полисахаридов, сходная с действием гепарина [24], привлекла повышенное внимание из-за пандемии, вызванной вирусом SARS-CoV-2 (коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2) [25–31]. Детальное рассмотрение этой проблемы представлено в данном обзоре.

Клиническая картина COVID-19 варьирует от бессимптомного течения заболевания до потенциально опасной для жизни пневмонии, которая в конечном итоге может привести к острому респираторному дистресс-синдрому (ОРДС) [32, 33]. Хотя большинство случаев COVID-19 можно отнести к легкой или средней степени, тем не менее ~15% составляют тяжелые заболевания, требующие кислородной поддержки, и ~5% – критические заболевания, требующие интенсивной вентиляции легких. SARS-CoV-2 инфицирует различные клетки, включая альвеолярные макрофаги, что активирует их и вызывает развитие цитокинового шторма [34, 35].

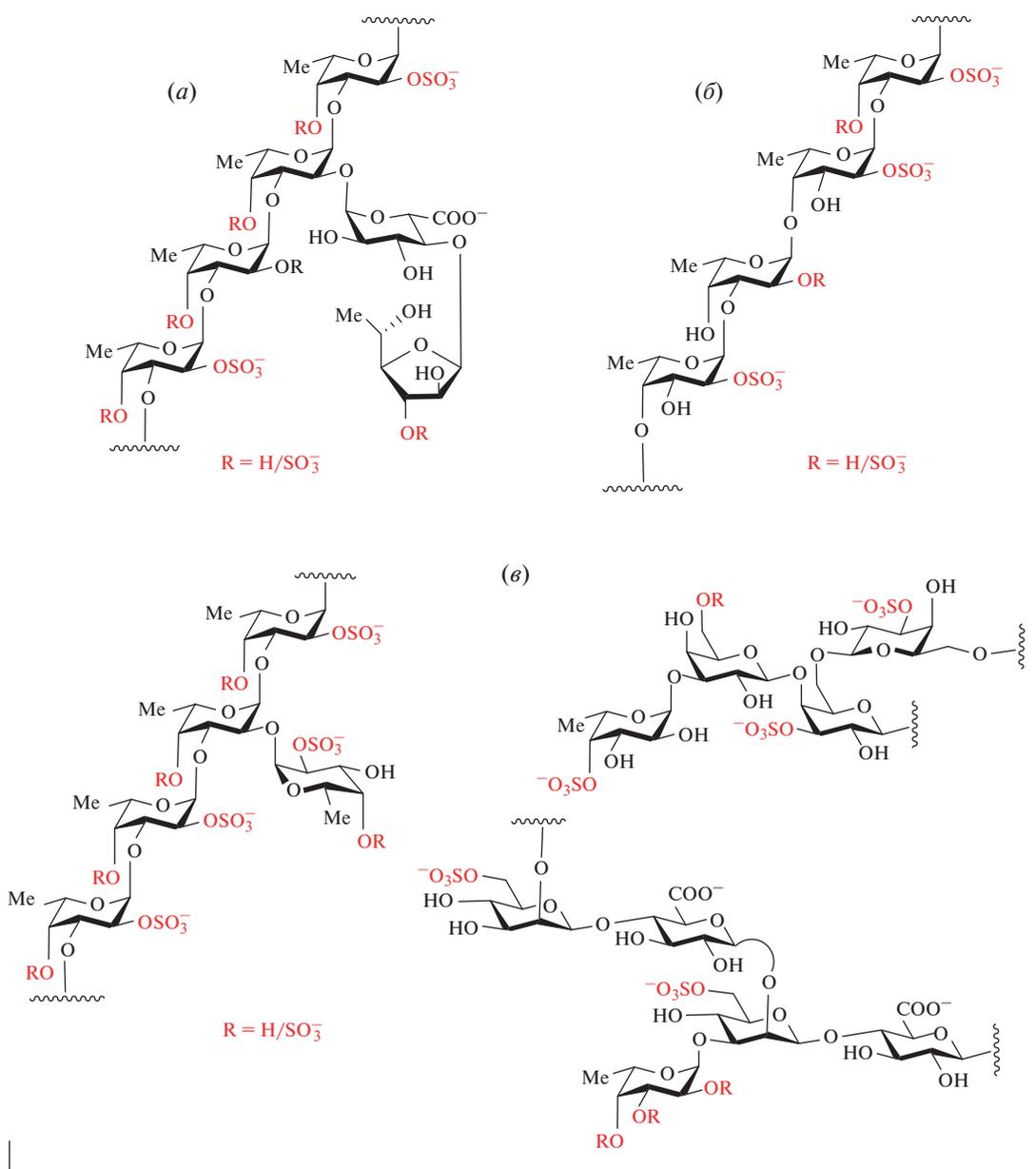


Рис. 3. Примеры сульфатированных полисахаридов, продуцируемых бурами водорослями *Chordaria flagelliformis* [10] (а), *Fucus evanescens* [11] (б) и *Saccharina latissima* [12] (в). Красным цветом выделены сульфаты в фиксированных положениях и варьируемые заместители R.

Исследования показали, что COVID-19 может значительно влиять на гемопоэз и иммунную систему, приводя к лимфопении, тромбоцитопении, дисфункции нейтрофилов и анемии [36–39]. В настоящее время для лечения COVID-19 используются лекарственные препараты с различным механизмом действия, которые наряду с клинической эффективностью могут вызывать нежелательные явления. Особая проблема заключается в разработке тактики лечения постковидного синдрома у больных, требующих длительной сопроводительной терапии. Поэтому природные

препараты привлекают значительное внимание, поскольку они содержат биологически активные соединения, которые можно использовать для разработки лекарств с широким спектром биологической активности с минимальными побочными эффектами [40]. Один из перспективных классов природных соединений – фукоиданы, обладающие целым спектром свойств: антиоксидантной, противовоспалительной, иммунорегулирующей, антифиброзной, противовирусной и антикоагулянтной активностью, которые уже отмечались выше, а также способностью стимулировать ге-

мопоз [41]. Проведенные в последнее время исследования свидетельствуют о возможном терапевтическом потенциале фукоиданов при лечении COVID-19 и профилактике постковидного синдрома [17, 42, 43]. Этому вопросу отчасти посвящен и недавний обзор Pradhan et al. [44], однако в нем не рассматриваются гемостимулирующая, антифибrotическая, антикоагулянтная и противовоспалительная активность фукоиданов, которые проанализированы в нашем обзоре.

ПРОТИВОКОРОНАВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

Коронавирусы SARS, несмотря на разнообразие, обладают общими функциональными элементами, в том числе гликопротеинами Spike (SGP, Spike glycoprotein, S-белок, S-гликопротеин), образующими характерные “шипы” на поверхности вируса, которые придают ей вид короны, определившей название этой группы вирусов. Ранее считалось, что взаимодействие S-белка с ангиотензин-превращающим ферментом 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) – начальный этап инфицирования [40, 45–47], но в последнее время выяснено, что инфицирование начинается со взаимодействия S-белка с гепарансульфатом [24, 48], экспонированном на поверхности моноцитов и макрофагов. Вирус SARS-CoV-2 может проникать в клетку организма-хозяина также за счет взаимодействия S-гликопротеина с еще одним рецептором – нейропилином-1 (NRP1) [41, 42, 49, 50].

Ингибирование взаимодействия S-гликопротеинов SARS-CoV-2 с гепарансульфатом и ACE2 с помощью сульфатированных полисахаридов, фукоиданов, хондроитинсульфатов, фукозилированных хондроитинсульфатов и других полисахаридов, в настоящее время активно изучается в специализированных лабораториях для создания средств профилактики и лечения COVID-19. Например, в опытах *in vitro* было показано, что фракции фукоиданов RPI-27 (100 кДа) и RPI-28 (~12 кДа) из морской водоросли *Saccharina japonica* специфически и эффективно связываются с S-белком SARS-CoV-2 и, вероятно, тем самым могут препятствовать связыванию S-белка с гепарансульфатом на клетках организма-хозяина и подавлять вирусную инфекцию [25]. Предполагается, что противовирусный эффект фукоиданов аналогичен ранее описанному действию гепаринов [51]. При этом полисахариды из *Saccharina japonica* эффективнее ингибировали связывание с S-белком SARS-CoV-2, чем гепарин, и не оказывали цитотоксического действия на клетки линии Vero [25].

Установлено, что противовирусная активность зависит от молекулярной массы и степени

сульфатирования полисахаридов. Так, фукоиданы с более высокой молекулярной массой и уровнем сульфатирования проявляли более выраженную вирус-ингибирующую активность. Таким образом, молекулярная масса и уровень сульфатирования – это два важных фактора, определяющих противовирусную активность фукоиданов, что было продемонстрировано на примерах и других полисахаридов [26]. Противовирусная активность фукоиданов ранее была показана по отношению к другим возбудителям, таким как вирус гриппа А, вирус гепатита В, вирус чумы собак и вирус иммунодефицита человека [30, 52, 53].

ЛЕЧЕНИЕ И ПРОФИЛАКТИКА ИММУНОСУПРЕССИИ ПРИ COVID-19

При тяжелых формах COVID-19, как и при других инфекциях и сепсисе, обычно наблюдается глубокая иммунная дисрегуляция, характеризующаяся переходом от гипервоспалительных состояний к иммуносупрессии. Аналогичные механизмы были описаны для тяжелой формы COVID-19 с присоединением вторичной инфекции [54]. Тяжелая форма COVID-19 характеризуется появлением предшественников нейтрофилов, что свидетельствует об экстренном миелопоэзе (emergency myelopoiesis) [55]. Этот процесс характеризуется мобилизацией незрелых миелоидных клеток, что приводит к иммуносупрессии и, соответственно, к резкому снижению противoinфекционной функции иммунитета [56]. При COVID-19 отмечается тесная корреляция тяжести заболевания и выраженности лимфопении. У инфицированных детей редко наблюдается лимфопения и смертность близка к нулю, в то время как у лиц пожилого возраста лимфопения встречается чаще, особенно в тяжелых случаях, и смертность от COVID-19 высокая. Было обнаружено, что повышенное отношение нейтрофилов к лимфоцитам, соотношение моноцитов и лимфоцитов и повышенные уровни цитокинов, таких как растворимый рецептор интерлейкина-2 (IL-2R), а также отношение IL-2R к количеству лимфоцитов коррелируют с тяжестью заболевания и неблагоприятным прогнозом [57]. У пациентов с тяжелой формой COVID-19 отмечали истощение лимфоидных клеток-предшественников костного мозга и накопление незрелых клеток. Эти данные свидетельствуют о том, что тяжелые формы COVID-19 приводят к нарушению регуляции кроветворения в костном мозге [58].

Лимфопения на фоне тяжелых форм COVID-19 сопровождается резким снижением числа естественных киллеров (NK) и активированных CD8⁺-Т-клеток – основных эффекторов противoinфекционного иммунитета [59]. В частности, NK-клетки проявляют противовирусную активность, снижая количество клеток, инфицирован-

ных SARS-CoV-2, а также продуцируют противовирусный цитокин IFN- γ .

Помимо противовирусной активности, IL-2-активированные НК-клетки также ограничивают фиброз тканей, снижая экспрессию генов профибротических маркеров COL1A1 и ACTA2 в фибробластах легких человека [60]. Функция НК- и CD8⁺-Т-клеток истощена у пациентов с COVID-19, а у выздоравливающих количество НК- и CD⁺-Т-клеток восстанавливается. Эти факты позволяют предположить, что функциональное истощение цитотоксических лимфоцитов связано с инфекцией SARS-CoV-2. Следовательно, инфекция SARS-CoV-2 может нарушить противовирусный иммунитет уже на ранней стадии [61, 62]. Было высказано предположение, что SARS-CoV-2 вследствие взаимодействия с рецепторами ACE2, CD147 и CD26 эритроцитов вызывает гемолиз и, соответственно, гипохромную анемию [63, 64]. Дисфункция гемопоэза в виде снижения числа лимфоидных предшественников и накопления незрелых и дисфункциональных фагоцитов в костном мозге, а также признаки тромбоцитопении и анемии требуют проведения коррекции несбалансированной дифференцировки клеток костного мозга.

Перспективным кандидатом на роль иммунокорректоров могут быть сульфатированные полисахариды и олигосахариды, большинство из которых безопасны, о чем свидетельствуют данные острой и хронической токсичности [65]. Ряд исследований продемонстрировал иммуностимулирующий эффект пероральных полисахаридов у взрослых людей. Например, при потреблении здоровыми взрослыми фукоиданов из бурой водоросли *Undaria pinnatifida* наблюдались как иммуностимулирующий, так и подавляющий эффекты, включая увеличение содержания стромального фактора-1, IFN- γ , CD34⁺-клеток и CXCR4-экспрессирующих CD34⁺-клеток, а также снижение числа лейкоцитов и лимфоцитов в крови [66].

Фукоидан из водоросли *Chordaria flagelliformis* активирует поглощение бактерий и дрожжей нейтрофилами (начальная фаза фагоцитоза), но не опосредованную кислородзависимыми механизмами деструкцию фагоцитированных микроорганизмов (завершение фагоцитоза). Эту особенность действия полисахарида на нейтрофилы можно рассматривать как стимулирующее влияние на клеточный противоинфекционный иммунитет, исключая избыточное выделение активных радикалов кислорода, которые способны вызывать повреждение органов и тканей [67]. В данных условиях также отмечена стимуляция цитотоксической активности НК-клеток. Молекулярный механизм стимулирующего действия фукоидана из *C. flagelliformis* на эффекторы противоинфекционного иммунитета реализуется с уча-

стием интегрина CD11c. Способность стимулировать активность НК-клеток, как и в случае нейтрофилов, опосредована активацией экспрессии мембраносвязанных молекул CD11c в НК-клетках, обеспечивающих контакт эффекторов с клетками-мишенями.

Ряд исследований показал, что сульфатированные полисахариды обладают, наряду с низкой токсичностью, способностью стимулировать кроветворение. Недавно было обнаружено, что фукан, выделенный из морского огурца *Holothuria polii*, ускорял восстановление количества лейкоцитов (в том числе нейтрофилов) у мышей после воздействия циклофосамида [68]. Авторы также отмечают тенденцию к восстановлению числа эритроцитов. Ранее мы наблюдали аналогичные эффекты для фукоидана из бурой водоросли *C. flagelliformis* [10] и фукозилированного хондроитинсульфата из морского огурца *Massinium magnum* [69], а также для их модифицированных производных [70, 71]. Кроме того, показано, что исследуемые полисахариды способны восстанавливать пролиферативный потенциал гемопоэтических стволовых клеток костного мозга. Учитывая способность фукоиданов и фукозилированных хондроитинсульфатов стимулировать гемопоэз и уменьшать проявления иммуносупрессии, а также их способность снижать уровень IL-6, представляется целесообразным изучение этих полисахаридов и их производных с точки зрения потенциала данных соединений в комплексной профилактике и иммуносупрессивной терапии у больных COVID-19 [41].

АНТИКОАГУЛЯНТНЫЕ СВОЙСТВА СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

Тромботические осложнения — одна из основных причин неблагоприятных исходов COVID-19 [72]. Гиперкоагуляция связана с прямым действием вируса SARS-CoV-2 и развитием цитокинового шторма [73]. У пациентов с COVID-19 наблюдается тромбоцитоз, повышенный уровень D-димера, продукта деградации фибрина, что коррелирует с тяжестью заболевания и плохим прогнозом [74]. Показано, что частота тромботических осложнений у пациентов с тяжелым течением COVID-19, находящихся в отделениях интенсивной терапии, может достигать 79% [75, 76]. Кроме того, патоморфологическое исследование пациентов, умерших от COVID-19, показало, что у 58% были недиагностированные тромбозы глубоких вен, при этом непосредственной причиной смерти в ряде случаев была массивная легочная эмболия [77]. Поэтому тромбопрофилактика стала неотъемлемой частью терапевтического метода лечения COVID-19. Однако до настоящего времени окончательно не решен вопрос о выборе антикоагулянта, дозы и длительности антикоагулянт-

ной терапии для пациентов с COVID-19. Кроме того, до конца не ясно, необходима ли антикоагулянтная терапия для амбулаторных пациентов и выздоравливающих больных [78].

Вместе с тем у пациентов с постковидным синдромом нередко развивается коагулопатия в виде тромботических явлений, что требует длительного применения антикоагулянтов [79]. Хотя такие препараты снижают риск органной и полиорганной недостаточности и смерти при коронавирусной инфекции, у критически больных пациентов гепарин в терапевтических дозах не улучшал исходы заболевания и с высокой вероятностью вызывал развитие побочных эффектов [80, 81]. Наиболее значимое нежелательное последствие антикоагулянтной терапии – индуцируемая гепарином тромбоцитопения (heparin-induced thrombocytopenia, HIT) – иммуноопосредованное осложнение, приводящее к транзиторной тромбоцитопении, сопровождающейся протромботическим состоянием [82].

Применение нефракционированного гепарина (unfractionated heparin, UFH) или низкомолекулярного гепарина (low-molecular-weight heparin, LMWH) показано госпитализированным пациентам с COVID-19, однако их широкое применение может привести к увеличению частоты HIT из-за гиперстимуляции иммунитета, связанной с COVID-19 [83]. Однако до настоящего времени нет четкого представления о необходимости продолжительной антикоагулянтной терапии у выздоравливающих больных. На этом этапе лечения пероральные антикоагулянты предпочтительнее парентеральных антикоагулянтов для удобства пациента. Вместе с тем предлагается избегать длительной антикоагулянтной терапии для снижения риска развития кровотечений [84]. Растущая частота тромбозов во время и после инфекции COVID-19 требует дальнейшего изучения предполагаемых механизмов тромбозов и поиска новых методов лечения.

Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что сульфатированные полисахариды, подобно гепарину, обладают антикоагулянтной и антитромботической активностью, что позволяет рассматривать этот класс соединений в качестве перспективных препаратов для профилактики тромбозов [85]. Механизмы антикоагулянтной и антитромботической активности сульфатированных фукоиданов из морских водорослей включают воздействие на факторы внешнего и внутреннего путей свертывания крови [86]. Несмотря на сходство эффектов, механизм антитромботического действия фукоидана отличается от такового у гепарина и включает воздействие на завершающий этап свертывания – превращение фибриногена в фибрин под влиянием тромбина. При этом важная особенность низкомолекуляр-

ных фракций фукоиданов, обладающих антитромботическим эффектом при венозном и артериальном тромбозе, – низкий геморрагический риск [87]. Эта особенность фукоиданов может иметь большое значение для проведения длительной антикоагулянтной терапии при COVID-19 и у пациентов с постковидным синдромом, склонных к геморрагическим реакциям. Установлено, что низкомолекулярный фукоидан оказывает заметное ингибирующее действие на индуцированную тромбином агрегацию тромбоцитов *in vivo* и *in vitro*, в то время как эти полисахариды со средней молекулярной массой могут стимулировать агрегацию тромбоцитов человека *in vitro* и не оказывают значительного ингибирующего действия на индуцированную тромбином агрегацию тромбоцитов у крыс. Это свидетельствует о перспективности низкомолекулярных фукоиданов и родственных синтетических олигосахаридов [88, 89] в качестве потенциальных антитромботических агентов при терапии COVID-19 и постковидного синдрома.

ПРОТИВОФИБРОЗНАЯ АКТИВНОСТЬ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

Фиброз легких – одно из основных осложнений у пациентов с COVID-19. Патогенез постинфекционного легочного фиброза включает повреждение легочного эпителия и эндотелия сосудов с неконтролируемой фибропролиферацией, а также нарушение регуляции высвобождения матричных металлопротеиназ во время воспалительной фазы ОРДС. Существует также сосудистая дисфункция, выступающая ключевым моментом перехода от ОРДС к фиброзу, с вовлечением фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и цитокинов, таких как IL-6 и TNF- α . Пораженный вирусом эпителий способствует высвобождению медиаторов воспаления посредством активации нейтрофилов и макрофагов, которые управляют активацией, миграцией, пролиферацией и дифференцировкой фибробластов, что приводит к продукции компонентов внеклеточного матрикса и разрушению легочной архитектуры [87]. Кроме того, наблюдается трансдифференцировка эпителиальных клеток в фибробластоподобные клетки – эпителиально-мезенхимальный переход [90, 91]. Его основной индуктор – трансформирующий фактор роста- β 1 (TGF- β 1), хотя различные цитокины, хемокины и факторы роста также вовлечены в этот процесс [92]. Несмотря на то что в настоящее время существуют антифибротические препараты (пирфенидон и нинтеданиб), их эффективность при COVID-19 требует дальнейших исследований [93, 94].

В целом ряде работ было показано, что фукоиданы обладают способностью предотвращать развитие фиброза легких. В частности, в одном из

первых исследований в данном направлении было продемонстрировано, что фракция сульфатированных олигосахаридов MS80 со средней молекулярной массой 8 кДа, выделенная из морских водорослей, ингибировала развитие фиброза легких у крыс, индуцированного блеомицином, без признаков токсичности. Применение MS80 приводило к уменьшению патологических параметров и снижению содержания коллагена в легких за счет конкурентного ингибирования взаимодействия с TGF- β 1 и угнетения активности матриксной металлопротеиназы [95].

При использовании низкомолекулярной фракции фукоидана из бурых водорослей *Saccharina japonica* также наблюдалось значительное ингибирование блеомицин-индуцированного легочного фиброза у мышей линии C57BL/6 за счет снижения уровня экспрессии TGF- β 1, ингибирования эпителиально-мезенхимального перехода, снижения экспрессии E-кадгерина и фибронектина [96]. Фукоидан, выделенный из *Sargassum hemiphyllum*, ингибировал проявление постлучевого фиброза легких у мышей линии C57BL/6, получавших облучение (10 Гр/выстрел) [91]. Введение этого фукоидана значительно ослабляло отложение коллагена 1 α , инфильтрацию ткани легких нейтрофилами и макрофагами, а также вызывало снижение экспрессии провоспалительных цитокинов и хемокинов (TIMP-1, CXCL1, MCP-1, MIP-2, IL-1RA, TREM-1, SDF-1/CXCL12, IL-16) в плевральном выпоте, индуцированном облучением [97].

Необходимо отметить, что легочные макрофаги экспрессируют несколько фиброзных медиаторов и играют важную роль в развитии фиброза. Их в настоящее время подразделяют на два фенотипа: классически активированные макрофаги (M1) с секрецией Th1-связанных цитокинов (включая TNF- α , IL-1 β и IL-6) и альтернативно активированные макрофаги (M2) с высвобождением Th2-связанных цитокинов, таких как IL-10 и IL-13. При этом способность к миграции и инвазии макрофагов M1 и M2 поддерживается хемотаксическим белком 1 моноцитов (MCP-1), хемокин в основном экспрессируется в альвеолярных макрофагах и участвует в хемотаксисе клеток [98]. Введение фукоидана, выделенного из *Sargassum hemiphyllum*, мышам с лучевым пневмонитом значительно снижало продукцию активированными макрофагами провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-6) и продукцию коллагена фибробластами, что коррелировало со снижением инфильтрации нейтрофилами и макрофагами ткани легких. Низкомолекулярный фукоидан, выделенный из *Laminaria japonica*, нивелировал проявления фиброза и воспалительных факторов в легочной ткани у мышей, стимулированных блеомицином, за счет снижения экспрессии β -катенина, TGF- β , TNF- α и IL-6. Кроме того, этот фуко-

идан блокировал развитие эпителиально-мезенхимального перехода, индуцированное TGF- β 1, посредством ингибирования сигнальных путей TGF- β /Smad и PI3K/AKT.

Таким образом, многочисленные экспериментальные исследования свидетельствуют о том, что фукоиданы воздействуют на все основные звенья патогенеза фиброза легких, нивелируя воспалительный каскад и ослабляя процесс формирования межклеточного матрикса. Эти данные позволяют рассматривать фукоиданы как основу для создания многообещающего терапевтического агента для лечения и профилактики постковидного фиброза легких [99, 100].

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ЭФФЕКТ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

В патогенезе COVID-19 значительную роль играет чрезмерная реакция иммунного ответа, называемая цитокиновым штормом. Цитокиновый шторм характеризуется гиперпродукцией провоспалительных цитокинов, приводящей к развитию острого респираторного дистресс-синдрома и полиорганной недостаточности, выступающих основными причинами смерти [101, 102]. Критическая роль цитокинового шторма согласуется с благоприятным исходом при введении стероидов, а также ингибиторов или блокаторов рецепторов IL-6 у пациентов на фоне инфекции SARS-CoV-2 [103]. Однако использование стероидов и ингибиторов IL-6 или его рецепторов у пациентов с COVID-19 может вызывать иммуносупрессию, а следовательно, способствовать угнетению противовирусного иммунитета и приводить к развитию вторичных бактериальных и грибковых инфекций [104, 105]. При этом у пациентов с COVID-19 и вторичной инфекцией в несколько раз увеличивается вероятность летального исхода.

Другой механизм чрезмерной воспалительной реакции — оксидативный стресс, индуцируемый продукцией свободных радикалов фагоцитами в ответ на вирусную инфекцию. Это, в свою очередь, стимулирует макрофаги продуцировать цитокин IL-6, формируя “порочный круг” [106]. Высокий уровень IL-6 и других воспалительных маркеров, включая C-реактивный белок, ферритин, D-димер и лактатдегидрогеназу, коррелирует с высоким риском летального исхода [107]. Появляются новые данные, указывающие на то, что тяжелое течение инфекции SARS-CoV-2 вызывает нарушение кишечного барьера вследствие инфицирования вирусом энтероцитов и активации врожденного и адаптивного иммунитета, способствуя системному распространению бактерий и/или микробных продуктов. Транслокация микробных продуктов из желудочно-кишечного тракта в периферическую кровь может усиливать гиперовоспалительное состояние и тяжесть тече-

ния COVID-19 [108–110] за счет активации макрофагов в инфицированной ткани и поддержания цитокинового шторма во время инфекции SARS-CoV-2 [111]. Это положение подтверждается тем, что у больных COVID-19 в критических состояниях наблюдалось значительное увеличение количества бактериального липополисахарида (LPS) и растворимого рецептора sCD14, связанное с повышенными системными уровнями IL-6, TNF- α , CCL5/RANTES и CCL2/MCP-1 [112].

Таким образом, нарушение функции кишечного барьера может быть одним из механизмов, которые способствуют присутствию бактериального токсина и бактериальной ДНК в крови пациентов с тяжелой формой COVID-19 [112]. Кишечная бактериальная транслокация может играть аддитивную/синергетическую роль в синдроме высвобождения цитокинов, лежащего в основе неблагоприятного развития COVID-19 [113].

Фукоиданы обладают выраженной противовоспалительной активностью [114] и действуют на различные стадии воспалительного процесса. Один из возможных механизмов действия фукоидана – подавление сигнальных путей MAPK и NF- κ B, последующее снижение продукции провоспалительных цитокинов и ингибирование активности селектинов [115]. Фукоиданы снижают секрецию провоспалительных медиаторов макрофагами в ответ на действие LPS. Так, было показано, что фракции фукоидана из *Fucus vesiculosus* угнетают секрецию TNF- α и IL-1 β и ингибируют нейтрофильную инфильтрацию, что свидетельствует о способности фукоиданов подавлять ранние стадии воспаления [116]. Другое исследование показало, что фукоидан снижает LPS-индуцированную продукцию оксида азота макрофагами по типу действия противовоспалительного цитокина IL-10 [117].

Фукоиданы могут конкурировать с бактериальным эндотоксином за связывание с Toll-подобными рецепторами и снижать эффект стимуляции LPS [118–120], а также ингибировать синтез PGE2 и провоспалительных медиаторов, таких как TNF- α , IL-1 β и IL-6 [121]. В частности, фракционированные фукоиданы из *Ecklonia cava* значительно снижали продукцию NO и уровни TNF- α , IL-1 β и IL-6 LPS-стимулированными макрофагами [122]. Показано, что фукоиданы из бурой водоросли *Sargassum horneri* снижают продукцию NO, PGE2 и провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-6 макрофагами мыши, обработанными LPS [123, 124]. Другие авторы [125] сообщили об ингибировании рекомбинантной циклооксигеназы человека COX-1 фукоиданом из *Fucus vesiculosus in vitro*. Фукоидан, полученный из *Undaria pinnatifida*, уменьшал воспаление при экспериментальном артрите, вызванном введением адьюванта Фрейнда у крыс [126].

Противовоспалительная активность фукоидана из бурых водорослей *in vitro* может быть связана с угнетением синтеза NO и экспрессии iNOS, снижением секреции PGE2, TNF- α , IL-1 β , IL-6 и IL-8. Исследования *in vivo* показали, что противовоспалительный эффект фукоидана может быть связан со снижением уровней сывороточных IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , PGE2, TGF- β 1, миелопероксидазы, уменьшением продукции свободных радикалов, ингибированием миграции нейтрофилов и повышением уровня IL-10 [127]. Фукоиданы из *Macrocystis pyrifera* снижали экспрессию провоспалительных цитокинов, индуцированных LPS. Примечательно, что полисахарид с наименьшей молекулярной массой был наиболее мощным ингибитором TNF- α и IL-1 β при стимуляции LPS лимфоидных клеток человека. При пероральном введении фукоиданы, как показано в опытах на мышах с экспериментальным колитом, могут снижать уровни провоспалительных цитокинов, включая TNF- α , IL-1 β и IL-6 [128, 129]. Ингибирование воспалительного каскада подтверждает потенциальную терапевтическую роль фукоиданов в качестве противовоспалительных препаратов при терапии больных COVID-19.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сульфатированные высоко- и низкомолекулярные полисахариды, содержащие значительное количество фукозных звеньев, обладают широким спектром биологических свойств, включая противовирусную, противофиброзную, антикоагулянтную, гемостимулирующую, противовоспалительную и иммунокорректирующую активность, что позволяет рассматривать этот класс биополимеров в качестве основы для создания лекарственных средств лечения и профилактики COVID-19 и постковидного синдрома. Наиболее перспективны низкомолекулярные фукоиданы и другие полисахариды, поскольку они демонстрируют высокую скорость абсорбции и биодоступность, что подтверждает их биологический потенциал [30, 130]. Данные о строении этих полисахаридов позволяют провести дизайн структурно родственных олигосахаридов строго определенного строения, которые с использованием имеющихся на сегодняшний день методов [88, 89, 131] могут быть произведены в промышленных масштабах с соблюдением стандартов качества фармацевтического производства.

Ключевой вопрос, который пока еще ждет своего решения, связан с необходимостью детального выяснения механизма биологического действия рассматриваемых полисахаридов. Очевидно, что он связан с их способностью выступать в роли миметиков биологически значимых сиалилированных и сульфатированных олигосахарид-

ных цепей, представленных на поверхности клеток человека. Отметим, что ферментативное получение [132] и химический синтез такого рода соединений, особенно сialiрированных, представляют достаточно сложную задачу [132–135]. Это делает сульфатированные фукоолигосахариды, которые более доступны для препаративного получения, чем названные выше клеточные олигосахариды, перспективной основой в создании лекарственных средств для лечения и профилактики COVID-19 и постковидного синдрома.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ-комфи: проекты № 17-00-00494, 17-00-00495 и 17-00-00496).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящий обзор не содержит описания каких-либо не опубликованных ранее исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pomin V.H. // *Mar. Drugs*. 2014. V. 12. P. 232–254. <https://doi.org/10.3390/md12010232>
2. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Dmitrenok A.S., Shashkov A.S., Kusaykin M.I., Stonik V.A., Nifantiev N.E., Usov A.I. // *Glycobiology*. 2016. V. 26. P. 449–459. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv119>
3. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Dmitrenok A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I. // *Carbohydr. Polym.* 2017. V. 165. P. 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.003>
4. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Dmitrenok A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I. // *Carbohydr. Polym.* 2017. V. 164. P. 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.034>
5. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Nifantiev N.E., Usov A.I. // *Pure Appl. Chem.* 2019. V. 91. P. 1065–1071. <https://doi.org/10.1515/pac-2018-1211>
6. Pereira M.S., Mulloy D., Mourão P.A.S. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 7656–7667. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.12.7656>
7. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Dmitrenok A.S., Borodina E.Yu., Nifantiev N.E., Usov A.I. // *Carbohydr. Res.* 2018. V. 456. P. 5–9. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2017.12.00>
8. Ma Y., Gao N., Zuo Z., Li S., Zheng W., Shi X., Liu Q., Ma T., Yin R., Li X., Zhao J. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2021. V. 186. P. 535–543. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.049>
9. Usov A.I., Bilan M.I. // *Russ. Chem. Rev.* 2009. V. 78. P. 785–799. <https://doi.org/10.1070/RC2009v078n08ABEH004063>
10. Bilan M.I., Vinogradova E.V., Tsvetkova E.A., Grachev A.A., Shashkov A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I. // *Carbohydr. Res.* 2008. V. 343. P. 2605–2612. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.06.001>
11. Bilan M.I., Grachev A.A., Ustuzhanina N.E., Shashkov A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I. // *Carbohydr. Res.* 2002. V. 337. P. 719–730. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(02\)00053-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00053-8)
12. Bilan M.I., Grachev A.A., Shashkov A.S., Kelly M., Sanderson C.J., Nifantiev N.E., Usov A.I. // *Carbohydr. Res.* 2010. V. 345. P. 2038–2047. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.07.009>
13. Casu B., Naggi A., Torri G. // *Carbohydr. Res.* 2015. V. 403. P. 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.06.023>
14. Fitton J.H. // *Mar. Drugs*. 2011. V. 9. P. 1731–1760. <https://doi.org/10.3390/md9101731>
15. Fitton J.H., Stringer D.N., Karpiniec S.S. // *Mar. Drugs*. 2015. V. 13. P. 5920–5946. <https://doi.org/10.3390/md13095920>
16. Fitton J.H., Stringer D.N., Park A.Y., Karpiniec S.S. // *Mar. Drugs*. 2019. V. 17. P. 571. <https://doi.org/10.3390/md17100571>
17. Luthuli S., Wu S.Y., Cheng Y., Zheng X.L., Wu M.J., Tong H.B. // *Mar. Drugs*. 2019. V. 17. P. 487. <https://doi.org/10.3390/md17090487>
18. Yangt J.-Y., Lim S.Y. // *Mar. Drugs*. 2021. V. 19. P. 436. <https://doi.org/10.3390/md19080436>
19. Fonseca R.J.C., Mourão P.A.S. // *Mar. Drugs*. 2021. V. 19. P. 425. <https://doi.org/10.3390/md19080425>
20. Xu Y., Zhou Q., Liu B., Chen F., Wang M. // *Carbohydr. Polym.* 2022. V. 275. P. 118691. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118691>
21. Mourão P.A.S. // *Mar. Drugs*. 2015. V. 13. P. 2770–2784. <https://doi.org/10.3390/md13052770>
22. Li H., Yuan Q., Lv K., Ma H., Gao C., Liu Y., Zhang S., Zhao L. // *Carbohydr. Polym.* 2021. V. 251. P. 117034. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117034>
23. Ustyuzhanina N.E., Ushakova N.A., Zyuzina K.A., Bilan M.I., Elizarova A.L., Somonova O.V., Madzhuga A.V., Krylov V.B., Preobrazhenskaya M.E., Usov A.I., Kiselevskiy M.V., Nifantiev N.E. // *Mar. Drugs*. 2013. V. 11. P. 2444–2458. <https://doi.org/10.3390/md11072444>
24. Kim S.Y., Jin W., Sood A., Montgomery D.W., Grant O.C., Fuster M.M., Fu L., Dordick J.S., Woods R.J., Zhang F. // *Antiviral Res.* 2020. V. 181. P. 104873. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104873>
25. Kwon P.S., Oh H., Kwon S.-J., Jin W., Zhang F., Fraser K., Hong J.J., Linhardt R.J., Dordick J.S. // *Cell Discovery*. 2020. V. 6. P. 50. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-00192-8>
26. Jin W., Zhang W., Mitra D., McCandless M.G., Sharma P., Tandon R., Zhang F., Linhardt R.J. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 163. P. 1649–1658. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.184>

27. Lu W.J., Yang Z.F., Chen J., Wang D., Zhang Y. // Carbohydr. Polym. 2021. V. 272. P. 118526. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118526>
28. Salih A.E.M., Thissera D., Yaseen M., Hassane A.S.I., El-Seedi H.R., Sayed A.M., Rateb M.E. // Mar. Drugs. 2021. V. 19. P. 406. <https://doi.org/10.3390/md19080406>
29. Yim S.K., Kim K., Kim I.H., Chun S.H., Oh T.H., Kim J.U., Kim J.W., Jung W.H., Moon H.S., Ku B.S., Jung K.J. // Mar. Drugs. 2021. V. 19. P. 219. <https://doi.org/10.3390/md19040219>
30. Fitton J.H., Park A.Y., Karpiniec S.S., Stringer D.N. // Mar. Drugs. 2021. V. 19. P. 4. <https://doi.org/10.3390/md19010004>
31. Dwivedi R., Samanta P., Sharma P., Zhang F., Mishra S.K., Kucheryavy P., Kim S.B., Aderibigbe A.O., Linhardt R.J., Tandon R., Doerksen R.J., Pomin V.H. // J. Biol. Chem. 2021. V. 297. P. 101207. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101207>
32. Eljaaly K., Malibary H., Alsulami S., Albanji M., Badawi M., Al-Tawfiq J.A. // Pathogens. 2021. V. 10. P. 692. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060692>
33. Hamed D.M., Belhoul K.M., Al Maazmi N.A., Ghayoor F., Moin M., Al Suwaidi M., Narainen M., Makki M., Rahman A.M. // J. Infect. Public Health. 2021. V. 14. P. 985–989. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.06.003>
34. Tay M.Z., Poh C.M., Rénia L., MacAry P.A., Ng L.F.P. // Nat. Rev. Immunol. 2020. V. 20. P. 36–374. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>
35. Cao X. // Nat. Rev. Immunol. 2020. V. 20. P. 269–270. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0308-3>
36. Tan L., Wang Q., Zhang D., Ding J., Huang Q., Tang Y.-Q., Wang Q., Miao H. // Target. Ther. 2020. V. 5. P. 33. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0148-4>
37. Liao M., Liu Y., Yuan J., Wen Y., Xu G., Zhao J., Cheng L., Li J., Wang X., Wang F., Liu L., Amit I., Zhang S., Zhang Z. // Nat. Med. 2020. V. 26. P. 842–844. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0901-9>
38. Lippi G., Plebani M., Henry B.M. // Clin. Chim. Acta. 2020. V. 506. P. 145–148. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.03.022>
39. Chen N., Zhou M., Dong X., Qu J., Gong F., Han Y., Qiu Y., Wang J., Liu Y., Wei J., Xia J., Yu T., Zhang X., Zhang L. // Lancet. 2020. V. 395. P. 507–513. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)
40. Tahir ul Qamar M., Maryam A., Muneer I., Xing F., Ali Ashfaq U., Khan F. A., Anwar F., Geesi M.H., Khalid R.R., Rauf S.A., Siddiqi A.R. // Sci. Rep. 2019. V. 9. P. 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38450-1>
41. Ustyuzhanina N.E., Anisimova N.Y., Bilan M.I., Donenko F.V., Morozovich G.E., Yashunsky D.V., Usov A.I., Siminyan N.G., Kirgisov K.I., Varfolomeeva S.R., Kiselevskiy M.V., Nifantiev N.E. // Pharmaceuticals. 2021. V. 14. P. 1074. <https://doi.org/10.3390/ph14111074>
42. Yoo H.J., You D.J., Lee K.W. // Mar. Drugs. 2019. V. 17. P. 447. <https://doi.org/10.3390/md17080447>
43. Jin W., Wu W., Tang H., Wei B., Wang H., Sun J., Zhang W., Zhong W. // Mar. Drugs. 2019. V. 17. P. 52. <https://doi.org/10.3390/md17010052>
44. Pradhan B., Nayak R., Patra S., Bhuyan P.P., Behera P.K., Mandal A.K., Behera C., Ki J.-S., Adhikary S.P., Ali D.M., Jena M. // Carbohydr. Polym. 2022. V. 291. P. 119551. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119551>
45. Letko M., Marzi A., Munster V. // Nat. Microbiol. 2020. V. 5. P. 562–569. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0688-y>
46. Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A., Wall A., Mc-Guire A.T., Veesler D. // Cell. 2020. V. 181. P. 281–292. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
47. Xu X., Chen P., Wang J. // Sci. China Life Sci. 2020. V. 63. P. 457–460. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1637-5>
48. Clausen T.M., Sandoval D.R., Spliid C.B., Pihl J., Perrett H.R., Painter C.D., Narayanan A., Majowicz S.A., Kwong E.M., McVicar R.N., Thacker B.E., Glass C.A., Yang Z., Torres J.L., Golden G.J., Bartels P.L., Porell R.N., Garretson A.F., Laubach L., Feldman J., Yin X., Pu Y., Hauser B.M., Caradonna T.M., Kellman B.P., Martino C., Gordts P.L.S.M., Chanda S.K., Schmidt A.G., Godula K., Leibel S.L., Jose J., Corbett K.D., Ward A.B., Carlin A.F., Esko J.D. // Cell. 2020. V. 183. P. 1043–1057. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.033>
49. Zhou P., Yang X.-L., Wang X.-G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H.-R., Zhu Y., Li B., Huang C.-L., Chen H.D., Chen J., Luo Y., Guo H., Jiang R.D., Liu M.Q., Chen Y., Shen X.R., Wang X., Zheng X.S., Zhao K., Chen Q.J., Deng F., Liu L.L., Yan B., Zhan FX., Wang Y.Y., Xiao G.F., Shi Z.L. // Nature. 2020. V. 579. P. 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
50. Daly J.L., Simonetti B., Klein K., Chen K.-E., Williamson M.K., Antón-Plágaro C., Shoemark D.K., Simón-Gracia L., Bauer M., Hollandi R., Greber U. F., Horvath P., Sessions R.B., Helenius A., Hiscox J.A., Teesalu T., Matthews D.A., Davidson A.D., Collins B.M., Cullen P.J., Yamauchi Y. // Science. 2020. V. 370. P. 861–865. <https://doi.org/10.1126/science.abd3072>
51. Mycroft-West C.J., Su D., Pagani I., Rudd T.R., Elli S., Gandhi N.S., Guimond S.E., Miller G.J., Meneghetti M.C.Z., Nader H.B., Li Y., Nunes Q.M., Procter P., Mancini N., Clementi M., Bisio A., Forsyth N.R., Ferro V., Turnbull J.E., Guerrini M., Fernig D.G., Vicenzi E., Yates E.A., Lima M.A., Skidmore M.A. // Thromb. Haemost. 2020. V. 120. P. 1700–1715. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1721319>
52. Kuznetsova T., Ivanushko L., Persiyanova E.V., Shu-tikova A.L., Ermakova S.P., Khotimchenko M.Y., Besednova N.N. // Biomed. Khim. 2017. V. 63. P. 553–558. <https://doi.org/10.18097/pbmc20176306553>
53. Li H.F., Li J., Tang Y., Lin L., Xie Z. // Virol. J. 2017. V. 14. P. 178. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0848-8>
54. Giamarellos-Bourboulis E.J., Netea M.G., Rovina N., Akinosoglou K., Antoniadou A., Antonakos N., Damoraki G., Gkavogianni T., Adami M.E., Katsaounou P. //

- Cell Host Microbe. 2020. V. 27. P. 992–1000.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.04.009>
55. Schulte-Schrepping J., Reusch N., Paclik D., Baßler K., Schlickeiser S., Zhang B., Krämer B., Krammer T., Brumhard S., Bonaguro L., De Domenico E., Wendisch D., Grasshoff M., Kapellos T.S., Beckstette M., Pecht T., Saglam A., Dietrich O., Mei H.E., Schulz A.R., Conrad C., Kunkel D., Vafadarnejad E., Xu C.J., Horne A., Herbert M., Drews A., Thibeault C., Pfeiffer M., Hippenstiel S., Hocke A., Müller-Redetzky H., Heim K.M., Machleidt F., Uhrig A., Bosquillon de Jarce L., Jürgens L., Stegemann M., Glösenkamp C.R., Volk H.D., Goffinet C., Landthaler M., Wylter E., Georg P., Schneider M., Dang-Heine C., Neuwinger N., Kappert K., Tauber R., Cormann V., Raabe J., Kaiser K.M., Vinh M.T., Rieke G., Meisel C., Ulas T., Becker M., Geffers R., Witzenth M., Drosten C., Suttrop N., von Kalle C., Kurth F., Händler K., Schultze J.L., Aschenbrenner A.C., Li Y., Nattermann J., Sawitzki B., Saliba A.E., Sander L.E. // Cell. 2020. V. 182. P. 1419–1440.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.001>
 56. Schultze J.L., Mass E., Schlitzer A. // Immunity. 2019. V. 50. P. 288–301.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.01.019>
 57. Tavakolpour S., Rakhshandehroo T. // Immunol. Lett. 2020. V. 225. P. 31–32.
<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2020.06.013>
 58. Wang X., Wen Y., Xie X., Liu Y., Tan X., Cai Q., Zhang Y., Cheng L., Xu G., Zhang S., Wang H., Wei L., Tang X., Qi F., Zhao J., Yuan J., Liu L., Zhu P., Ginhoux F., Zhang S., Cheng T., Zhang Z. // Cell Discov. 2021. V. 7. P. 60.
<https://doi.org/10.1038/s41421-021-00296-9>
 59. Prager I., Watzl C. // J. Leukoc. Biol. 2019. V. 105. P. 1319–1329.
<https://doi.org/10.1002/JLB.MR0718-269R>
 60. Krämer B., Knoll R., Bonaguro L., ToVinh M., Raabe J., Astaburuaga-García R., Jonas Schulte-Schrepping J., Kaiser K.M., Rieke G.J., Bischoff J., Monin M.B., Hoffmeister C., Schlabe S., De Domenico E., Reusch N., Händler K., Reynolds G., Blüthgen N., Hack G., Finnemann C., Nischalke H., Strassburg C.P., Stephenson E., Su Y., Gardner L., Yuan D., Chen D., Goldman J., Rosenstiel P., Schmidt S.V., Latz E., Hrusovsky K., Ball A.J., Johnson J.M., Koenig P.-A., Schmidt F.I. // Immunity. 2021. V. 54. P. 2650–2669.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.09.002>
 61. Zheng M., Gao Y., Wang G., Song G., Liu S., Sun D. // Mol. Immunol. 2020. V. 17. P. 533–535.
<https://doi.org/10.1038/s41423-020-0402-2>
 62. Bi J. // Cell Mol. Immunol. 2022. V. 13. P. 1–3.
<https://doi.org/10.1038/s41423-021-00825-2>
 63. Foy B.H., Carlson J.C.T., Reinertsen E., Padros I Valls R., Pallares Lopez R., Palanques-Tost E., Mow C., Westover M.B., Aguirre A.D., Higgins J.M. // JAMA Netw Open. 2020. V. 3. P. e2022058.
<https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.22058>
 64. Horiuchi Y., Hayashi F., Iwasaki Y., Matsuzaki A., Nishibe K., Kaniyu K., Marutani S., Saito K., Matsuo S., Uchihashi K., Miida T., Ai T., Tabe Y. // Int. J. Lab. Hematol. 2021. V. 43. P. 1309–1318.
<https://doi.org/10.1111/ijlh.13696>
 65. Ramberg J.E., Nelson E.D., Sinnott R.A. // Nutr. J. 2010. V. 9. P. 54.
<https://doi.org/10.1186/1475-2891-9-54>
 66. Irhimeh M.R., Fitton J.H., Lowenthal R.M. // Exp. Hematol. 2007. V. 35. P. 989–994.
<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2007.02.009>
 67. Anisimova N.Y., Ustyuzhanina N.E., Donenko F.V., Bilan M.I., Ushakova N.A., Usov A.I., Nifantiev N.E., Kiselevskiy M.V. // Biochemistry (Moscow). 2015. V. 80. P. 925–933.
<https://doi.org/10.1134/S0006297915070111>
 68. Li C., Niu Q., Li S., Zhang X., Liu C., Cai C., Li G., Yu G. // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 154. P. 1123–1131.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.036>
 69. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Dmitrenok A.S., Borodina E.Y., Stonik V.A., Nifantiev N.E., Usov A.I. // Carbohydr. Polym. 2017. V. 167. P. 20–26.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.101>
 70. Anisimova N., Ustyuzhanina N., Donenko F., Bilan M., Usov A., Nifantiev N., Kiselevskiy M. // Mar. Drugs. 2017. V. 15. P. 301.
<https://doi.org/10.3390/md15100301>
 71. Anisimova N.Y., Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Donenko F.V., Ushakova N.A., Usov A.I., Kiselevskiy M.V., Nifantiev N.E. // Mar. Drugs. 2018. V. 16. P. 333.
<https://doi.org/10.3390/md16090333>
 72. Klok F.A., Kruip M.J.H.A., Van der Meer N.J.M., Arbous M.S., Gommers D.A.M.P.J., Kant K.M., Kaptein F.H.J., van Paassen J., Stals M.A.M., Huisman M.V., Endeman H. // Thromb. Res. 2020. V. 191. P. 145–147.
<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2020.04.013>
 73. Pessoa M.S.L., Lima C.F.C., Pimentel A.C.F., Costa J.C.G., Holanda J.L.B. // Eur. J. Case Rep. Intern. Med. 2020. V. 7. P. 1747.
https://doi.org/10.12890/2020_001747
 74. Tang N., Li D., Wang X., Sun Z. // J. Thromb. Haemost. 2020. V. 18. P. 844–847.
<https://doi.org/10.1111/jth.14768>
 75. Nahum J., Morichau-Beauchant T., Daviaud F., Echeugut P., Fichet J., Maillet J.-M., Thierry S. // JAMA Netw. Open. 2020. V. 3. P. e2010478.
<https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.10478>
 76. Middeldorp S., Coppens M., van Haaps T.F., Foppen M., Vlaar A.P., Müller M.C.A., Bouman C.C.S., Beenen L.F.M., Kooite R.S., Heijmans J., Smits L.P., Bonta P.I., van Es N. // J. Thromb. Haemost. 2020. V. 18. P. 1995–2002.
<https://doi.org/10.1111/jth.14888>
 77. Wichmann D., Sperhake J.P., Lütgehetmann M., Steurer S., Edler C., Heinemann A., Heinrich F., Mushumba H., Knipf I., Schröder A.S., Burdelski C., de Heer G., Nierhaus A., Frings D., Pfeifferle S., Becker H., Bredereke-Wiedling H., Weerth A., Paschen H.-R., Sheikhzadeh-Eggers S., Stang A., Schmiedel S., Bokemeyer C., Ado M.M., Aepfelbacher M., Püschel K., Kluge S. //

- Ann. Intern. Med. 2020. V. 73 (4). P. 268–277.
<https://doi.org/10.7326/M20-2003>
78. Begic E., Naser N., Begic N. // e-J. Cardiol. Practice. 2021. V. 21.
<https://www.escardio.org/Journals/E-Journal-of-Cardiology-Practice/Volume-21/hypercoagulability-in-covid-19-and-post-covid-patients-characteristics-and-cur>
79. Fan B.E., Umapathi T., Chua K., Chia Y.W., Wong S.W., Tan G.W.L., Chandrasekar S., Lum Y.H., Vasoo S., Dalian R. // J. Thromb. Thrombolysis. 2021. V. 51. P. 971–977.
<https://doi.org/10.1007/s11239-020-02332-z>
80. Goligher E.C., Bradbury C.A., McVerry B.J., Lawler P.R., Berger J.S., Gong M.N., Carrier M., Reynolds H.R., Kumar A., Turgeon A.F., Kornblith L.Z., Kahn S.R., Marshall J.C., Kim K.S., Houston B.L., Derde L.P.G., Cushman M., Tritschler T., Angus D.C., Godoy L.C., McQuilten Z., Kirwan B.A., Farkouh M.E., Brooks M.M., Lewis R.J., Berry L.R., Lorenzi E., Gordon A.C., Ahuja T., Al-Beidh F., Annane D., Arabi Y.M., Aryal D., Baumann Kreuziger L., Beane A., Bhimani Z., Bihari S., Billett H.H., Bond L., Bonten M., Brunkhorst F., Buxton M., Buzgau A., Castellucci L.A., Chekuri S., Chen J.T., Cheng A.C., Chkhikvadze T., Coiffard B., Contreras A., Costantini T.W., de Brouwer S., Detry M.A., Duggal A., Džavik V., Effron M.B., Eng H.F., Escobedo J., Estcourt L.J., Everett B.M., Fergusson D.A., Fitzgerald M., Fowler R.A., Froess J.D., Fu Z., Galanaud J.P., Galen B.T., Gandotra S., Girard T.D., Goodman A.L., Goossens H., Green C., Greenstein Y.Y., Gross P.L., Haniffa R., Hegde S.M., Hendrickson C.M., Higgins A.M., Hindenburg A.A., Hope A.A., Horowitz J.M., Horvat C.M., Huang D.T., Hudock K., Hunt B.J., Husain M., Hyzy R.C., Jacobson J.R., Jayakumar D., Keller N.M., Khan A., Kim Y., Kindzelski A., King A.J., Knudson M.M., Kornblith A.E., Kutcher M.E., Laffan M.A., Lamontagne F., Le Gal G., Leeper C.M., Leifer E.S., Lim G., Gallego Lima F., Linstrum K., Litton E., Lopez-Sendon J., Lother S.A., Marten N., Saud Marinez A., Martinez M., Mateos Garcia E., Mavromichalis S., McAuley D.F., McDonald E.G., McGlothlin A., McGuinness S.P., Middeldorp S., Montgomery S.K., Mouncey P.R., Murthy S., Nair G.B., Nair R., Nichol A.D., Nicolau J.C., Nunez-Garcia B., Park J.J., Park P.K., Parke R.L., Parker J.C., Parnia S., Paul J.D., Pompilio M., Quigley J.G., Rosenson R.S., Rost N.S., Rowan K., Santos F.O., Santos M., Santos M.O., Satterwhite L., Saunders C.T., Schreiber J., Schutgens R.E.G., Seymour C.W., Siegal D.M., Silva D.G., Jr., Singhal A.B., Slutsky A.S., Solvason D., Stanworth S.J., Turner A.M., van Bentum-Puijk W., van de Veerdonk F.L., van Diepen S., Vazquez-Grande G., Wahid L., Wareham V., Widmer R.J., Wilson J.G., Yuriditsky E., Zhong Y., Berry S.M., McArthur C.J., Neal M.D., Hochman J.S., Webb S.A., Zarychanski R. // N. Engl. J. Med. 2021. V. 385. P. 777–789.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa210341>
81. Sadeghipour P., Talasaz A.H., Rashidi F., Sharif-Kashani B., Beigmohammadi M.T., Farrokhpour M., Sezavar S.H., Payandemehr P., Dabbagh A., Moghadam K.G., Jamalkhani S., Khalili H., Yadollahzadeh M., Riahi T., Rezaeifar P., Tahamtan O., Matin S., Abedini A., Lookzadeh S., Rahmani H., Zoghi E., Mohammadi K., Abri H., Tabrizi S., Mousavian S.M., Shahmirzaei S., Bakhshandeh H., Amin A., Rafiee F., Baghizadeh E., Mohebbi B., Parhizgar S.E., Aliannejad R., Eslami V., Kashefzadeh A., Kakavand H., Hosseini S.H., Shafaghi S., Ghazi S.F., Najafi A., Jimenez D., Gupta A., Madhavan M.V., Sethi S.S., Parikh S.A., Monreal M., Hadavand N., Hajighasemi A., Maleki M., Sadeghian S., Piazza G., Kirtane A.J., Van Tassell B.W., Dobesh P.P., Stone G.W., Lip G.Y.H., Krumholz H.M., Goldhaber S.Z., Bikdeli B. // JAMA. 2021. V. 325. P. 1620–1630.
<https://doi.org/10.1001/jama.2021.4152>
82. Greinacher A. // N. Engl. J. Med. 2015. V. 373. P. 252–261.
<https://doi.org/10.1056/NEJMcp1411910>
83. Uaprasert N., Tangcheewinsirikul N., Rojnuckarin P., Patell R., Zwicker J.I., Chiasakul T. // Blood Adv. 2021. V. 5. P. 4521–4534.
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021005314>
84. Patell R., Bogue T., Koshy A., Bindal P., Merrill M., Aird W.C., Bauer K.A., Zwicker J.I. // Blood. 2020. V. 136. P. 1342–1346.
<https://doi.org/10.1182/blood.2020007938>
85. Cumashi A., Ushakova N.A., Preobrazhenskaya M.E., D’Incecco A., Piccoli A., Totani L., Tinari N., Morozevich G.E., Berman A.E., Bilan M.I., Usov A.I., Ustyuzhanina N.E., Grachev A.A., Sanderson C.J., Kelly M., Rabinovich G.A., Iacobelli S., Nifantiev N.E. // Glycobiology. 2007. V. 17. P. 541–552.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwm014>
86. Kuznetsova T.A., Andryukov B.G., Makarenkova I.D., Zaporozhets T.S., Besednova N.N., Fedyanina L.N., Kryzhanovsky S.P., Shchelkanov M.Y. // Molecules. 2021. V. 26. P. 2618.
<https://doi.org/10.3390/molecules26092618>
87. Durand E., Helley D., Ayman H.Z., Dujols C., Bruneval P., Collicer-Jouault S., Fischer A.-M., Antoine L. // J. Vasc. Res. 2008. V. 45. P. 529–537.
<https://doi.org/10.1159/000129687>
88. Krylov V.B., Kaskova Z.M., Vinnitskiy D.Z., Ustyuzhanina N.E., Grachev A.A., Chizhov A.O., Nifantiev N.E. // Carbohydr. Res. 2011. V. 346. P. 540–550.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.01.005>
89. Khatuntseva E.A., Ustuzhanina N.E., Zatonskii G.V., Shashkov A.S., Usov A.I., Nifant’ev N.E. // J. Carbohydr. Chem. 2000. V. 19. P. 1151–1173.
<https://doi.org/10.1080/07328300008544140>
90. Kalluri R., Weinberg R.A. // J. Clin. Invest. 2009. V. 119. P. 1420–1428.
<https://doi.org/10.1172/JCI39104>
91. Guan S., Zhou J. // Mol. Biosyst. 2017. V. 13. P. 2116–2124.
<https://doi.org/10.1039/c7mb00247e>
92. King T.J., Pardo A., Selman M. // Lancet. 2011. V. 378. P. 1949–1961.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60052-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60052-4)
93. Tale S., Ghosh S., Meitei S.P., Kolli M., Garbhapu A.K., Pudi S. // Post QJM. 2020. V. 113. P. 837–838.
<https://doi.org/10.1093/qjmed/hcaa25>
94. George P.M., Wells A.U., Jenkins R.G. // Lancet Respir. Med. 2020. V. 8. P. 807–815.
[https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30225-3](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30225-3)

95. Jiang H.D., Guan H.S. // *Acta Pharmacologica Sinica*. 2009. V. 30. P. 973–979. <https://doi.org/10.1038/aps.2009.86>
96. Wang J., Geng L.H., Yue Y., Zhang Q.B. // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2019. V. 163. P. 95–111. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2019.03.011>
97. Yu H.H., Chengchuan Ko. E., Chang C.L., Yuan K.S., Wu A.T.H., Shan Y.S., Wu S.Y. // *Mar. Drugs*. 2018. V. 16. P. 392. <https://doi.org/10.3390/md16100392>
98. Zhou S.B., Zhou Y.C., Yu J.J., Du Y.X., Tan Y., Ke Y.M., Ge F. // *Biomed. Pharmacother.* 2020. V. 126. P. 110058. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110058>
99. Wu N., Li Z., Wang J., Geng L., Yue Y., Deng Z., Wang Q., Zhang Q. // *Carbohydr. Polym.* 2021. V. 273. P. 118567. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118567>
100. Wang L., Zhang P., Li X., Zhang Y., Zhan Q., Wang C. // *Am. J. Transl. Res.* 2019. V. 11. P. 2590–2602.
101. Huang C., Wang Y., Li X., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Zhang L., Fan G., Xu J., Gu X., Cheng Z., Yu T., Xia J., Wei Y., Wu W., Xie X., Yin W., Li H., Liu M., Xiao Y., Gao H., Guo L., Xie J., Wang G., Jiang R., Gao Z., Jin Q., Wang J., Cao B. // *Lancet*. 2020. V. 395. P. 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
102. Moore J.B., June C.H. // *Science*. 2020. V. 368. P. 473–474. <https://doi.org/10.1126/science.abb8925>
103. Mahase E. // *BMJ*. 2020. V. 369. P. m2512. <https://doi.org/10.1136/bmj.m2512>
104. van Paassen J., Vos J.S., Hoekstra E.M., Neumann K.M.I., Boot P.C., Arbous S.M. // *Crit. Care*. 2020. V. 24. P. 696. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03400-9>
105. World Health Organization. Clinical Management of COVID-19: Interim Guidance, 27 May 2020. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/332196>
106. Shankar-Hari M., Vale C.L., Godolphin P.J., Fisher D., Higgins J.P.T., Spiga F., Savovic J., Tierney J., Baron G., Benbenishty J.S., Berry L.R., Broman N., Cavalcanti A.B., Colman R., de Buyser S.L., Derde L.P.G., Domingo P., Omar S.F., Fernandez-Cruz A., Feuth T., Garcia F., Garcia-Vicuna R., Gonzalez-Alvaro I., Gordon A.C., Haynes R., Hermine O., Horby P.W., Horick N.K., Kumar K., Lambrecht B.N., Landray M.J., Leal L., Lederer D.J., Lorenzi E., Mariette X., Merchante N., Misnan N.A., Mohan S.V., Nivens M.C., Oksi J., Perez-Molina J.A., Pizov R., Porcher R., Postma S., Rajasuriar R., Ramanan A.V., Ravaud P., Reid P.D., Rutgers A., Sancho-Lopez A., Seto T.B., Sivapalasingam S., Soim A.S., Staplin N., Stone J.H., Strohbehn G.W., Sunden-Cullberg J., Torre-Cisneros J., Tsai L.W., van Hoogstraten H., van Meerten T., Veiga V.C., Westerweel P.E., Murthy S., Diaz J.V., Marshall J.C., Sterne J.A.C. // *JAMA*. 2021. V. 326. P. 499–518. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.11330>
107. Mushtaq M.Z., Mahmood S.B.Z., Almas A., Ather Wasti S., Ahsan Ali S. // *Int. Immunopharmacol.* 2022. V. 102. P. 108384. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108384>
108. Kipkorir V., Cheruiyot I., Ngure B., Misiani B., Munguti J. // *J. Med. Virol.* 2020. V. 92. P. 2328–2331. <https://doi.org/10.1002/jmv.26007>
109. Sirivongrangson P., Kulvichit W., Payungporn S., Pisitkun T., Chindamporn A., Peerapornratana S., Pisitkun P., Chitcharoen S., Sawaswong V., Worasilchai N., Kampunya S., Pucharoen O., Thawitsri T., Leelayuwatanakul N., Kongpolprom N., Phoophiboon V., Sriprasart T., Samransamruajkit R., Tungsanga S., Tiankanon K., Lumlertgul N., Leelahavanichkul A., Sriphojanart T., Tantawichien T., Thitsyakorn U., Chirathaworn C., Praditpornsilpa K., Tungsanga K., Eiam-Ong S., Sitprija V., Kellum J.A., Srisawat N. // *Intensive Care Med. Exp.* 2020. V. 8. P. 72. <https://doi.org/10.1186/s40635-020-00362-8>
110. Zuo T., Zhang F., Lui G.C.Y., Yeoh Y.K., Li A.Y.L., Zhan H., Lui G.C.Y., Wan Y., Chung A.C.K., Cheung C.P., Chen N., Lai C.K.C., Chen Z., Tso E.Y.K., Fung K.S.C., Chan V., Ling L., Joynt G., Hui D.S.C., Chan F.K.L., Chan P.K.S., Ng S.C. // *Gastroenterology*. 2020. V. 159. P. 944–955. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.05.048>
111. Hoel H., Heggelund L., Reikvam D.H., Stiksrud B., Ueland T., Michelsen A.E., Otterdal K., Muller K.E., Lind A., Muller F., Dudman S., Aukrust P., Dyrhol-Rise A.M., Holter J.C., Traseid M. // *J. Int. Med.* 2021. V. 289. P. 523–531. <https://doi.org/10.1111/joim.13178>
112. Teixeira P.C., Dorneles G.P., Santana Filho P.C., da Silva I.M., Schipper L.L., Postiga I.A.L., Neves C.A.M., Rodrigues Junior L.C., Peres A., Souto J.T., Fonseca S.G., Eller S., Oliveira T.F., Rotta L.N., Thompson C.E., Romão P.R.T. // *Int. Immunopharmacol.* 2021. V. 100. P. 108125. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108125>
113. Cardinale V., Capurso G., Ianiro G., Gasbarrini A., Arcidiacono P.G., Alvarod D. // *Dig. Liver Dis.* 2020. V. 52. P. 1383–1389. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2020.09.009>
114. Preobragenskaja M.E., Berman A.E., Mikhajlov V.I., Ushakova N.A., Mazurov A.V., Semenov A.V., Usov A.I., Nifant'ev N.E., Bovin N.V. // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1997. V. 43. P. 443–451. <https://doi.org/10.1080/15216549700204231>
115. Zhang X.W., Liu Q., Thorlacius H. // *Scand. J. Gastroenterol.* 2001. V. 36. P. 270–275. <https://doi.org/10.1080/003655201750074555>
116. Jeong J.W., Hwang S.J., Han M.H., Lee D.S., Yoo J.S., Choi I.W., Cha H.J., Kim S., Kim H.S., Kim G.Y., Jeon Y.-J., Lee H.-J., Park H.T., Yoo Y.H., Choi Y.H. // *Mol. Cell. Toxicol.* 2017. V. 13. P. 405–417. <https://doi.org/10.1007/s13273-017-0045-2>
117. Amin M.L., Mawad D., Dokos S., Koshy P., Martens P.J., Sorrell C.C. // *Carbohydr. Polym.* 2020. V. 230. P. 115691. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115691>
118. Biondo P.D., Goruk S., Ruth M.R., O'Connell E., Field C.J. // *Int. Immunopharmacol.* 2008. V. 8. P. 1134–1142. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.04.003>
119. Neyrinck A.M., Mouson A., Delzenne N.M. // *Int. Immunopharmacol.* 2007. V. 7. P. 1497–1506. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.06.0>

120. Makarenkova I.D., Logunov D.Y., Tukhvatulin A.I., Semenova I.B., Zvyagintseva T.N., Gorbach V.I., Ermakova S.P., Besednova N.N. // *Biomed. Khim.* 2012. V. 58. P. 318–325.
https://doi.org/10.18097/pbmc20125803318
121. Ni L., Wang L., Fu X., Duan D., Jeon Y.J., Xu J., Gao X. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 156. P. 717–729.
https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.012
122. Lee S.H., Ko C.I., Ahn G., You S., Kim J.S., Heu M.S., Kim J., Jee Y., Jeon Y.J. // *Carbohydr. Polym.* 2012. V. 89. P. 599–606.
https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.056
123. Sanjeewa K.K.A., Fernando I.P.S., Kim E.A., Ahn G., Jee Y., Jeon Y.J. // *Nutr. Res. Pract.* 2017. V. 11. P. 3–10.
https://doi.org/10.4162/nrp.2017.11.1.3
124. Sanjeewa K.A., Fernando I.P.S., Kim S.Y., Kim H.S., Ahn G., Jee Y., Jeon Y.J. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. V. 107. P. 803–807.
https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.050
125. Pozharitskaya O.N., Obluchinskaya E.D., Shikov A.N. // *Mar. Drugs.* 2020. V. 18. P. 275.
https://doi.org/10.3390/md18050275
126. Phull A.R., Kim S.J. // *J. Funct. Foods.* 2017. V. 38. P. 415–426.
https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.05
127. Apostolova E., Lukova P., Baldzhieva A., Katsarov P., Nikolova M., Iliev I., Peychev L., Trica B., Oancea F., Delattre C., Kokova V. // *Polymers (Basel).* 2020. V. 12. P. 2338.
https://doi.org/10.3390/polym1210233
128. Ahmad T., Eapen M.S., Ishaq M., Park A.Y., Karpniec S.S., Stringer D.N., Sohal S.S., Fitton J.H., Guven N., Caruso V., Eri R. // *Mar. Drugs.* 2021. V. 19. P. 702.
https://doi.org/10.3390/md19120702
129. Lean Q.Y., Eri R.D., Fitton J.H., Patel R.P., Gueven N. // *PLoS One.* 2015. V. 10. P. e0128453.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128453
130. Matsubara K., Xue C., Zhao X., Mori M., Sugawara T., Hirata T. // *Int. J. Mol. Med.* 2005. V. 15. P. 695–699.
https://doi.org/10.3892/ijmm.15.4.695
131. Vinnitskiy D.Z., Ustyuzhanina N.E., Dmitrenok A.S., Shashkov A.S., Nifantiev N.E. // *Carbohydr. Res.* 2017. V. 438. P. 9–17.
https://doi.org/10.1016/j.carres.2016.11.015
132. Gambaryan A.S., Tuzikov A.B., Byramova N.E., Bovin N.V., Piskarev V.E., Nifant'ev N.E., Matroso- vich M.N. // *FEBS Lett.* 1995. V. 366. P. 57–60.
https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00488-U
133. Nifant'ev N.E., Tsvetkov Y.E., Shashkov A.S., Kono- nov L.O., Menshov V.M., Tuzikov A.B., Bovin N.V. // *J. Carbohydr. Chem.* 1996. V. 15. P. 939–953.
https://doi.org/10.1080/07328309608005700
134. Sherman A.A., Yudina O.N., Menshov V.M., Sha- shkov A.S., Nifant'ev N.N. // *Carbohydr. Res.* 2001. V. 330. P. 445–458.
https://doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00002-7
135. Sherman A.A., Yudina O.N., Mironov Y.V., Sukhova E.V., Shashkov A.S., Menshov V.M., Nifantiev N.E. // *Car- bohydr. Res.* 2001. V. 336. P. 13–46.
https://doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00213-0

Prospects for the Use of Marine Fucose-Rich Sulfated Polysaccharide in Treatment and Prevention of COVID-19 and Post-COVID-19 Syndrome

M. V. Kiselevskiy*, #, N. Yu. Anisimova*, M. I. Bilan**, A. I. Usov**, N. E. Ustyuzhanina**, A. A. Petkevich*, I. Zh. Shubina*, G. E. Morozevich***, and N. E. Nifantiev**, #

#E-mail: kisele@inbox.ru, nen@ioc.ac.ru

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

**Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 47, Moscow, 119991 Russia

***Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, ul. Pogodinskaya 10/8, Moscow, 119121 Russia

Symptoms of the new coronavirus infection that appeared in 2019 (COVID-19) range from low fever and fatigue to acute pneumonia and multiple organ failure. The clinical picture of COVID-19 is heterogeneous and involves most physiological systems; therefore, drugs with a wide spectrum of mechanism of action are required. The choice of the treatment strategy for post-COVID-19 syndrome is still a challenge to be resolved. Polysaccharides with a high fucose content derived from seaweed and marine animals can form the basis for the subsequent development of promising agents for the treatment of COVID-19 and post-COVID-19 syndrome. This class of biopolymers is characterized by a variety of biological activities, including antiviral, antithrombotic, anticoagulant, hemostimulating, anti-inflammatory and immunoregulatory. Low molecular weight derivatives of these polysaccharides, as well as synthetic oligosaccharides with optimized structure and molecular size, as well as degree and position of sulfates may be considered as the most promising compounds due to their better bioavailability, which undoubtedly increases their therapeutic potential.

Keywords: fucoidan, fucosylated chondroitin sulfate, COVID-19, S-glycoprotein, heparan sulfate



УДК 54.057+547.388.3+615.076.7

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ *N*-АЦИЛГИДРАЗОНОВ

© 2022 г. Э. Р. Беляева*, #, Ю. В. Мясоедова*, Н. М. Ишмуратова*, Г. Ю. Ишмуратов*

*Уфимский Институт химии – обособленное структурное подразделение
ФГБНУ “Уфимский федеральный исследовательский центр” РАН, Россия, 450054 Уфа, просп. Октября, 71

Поступила в редакцию 16.02.2022 г.

После доработки 08.04.2022 г.

Принята к публикации 31.05.2022 г.

Синтез гибридных молекул, содержащих фрагменты природных соединений и фармакофорные группы, дает возможность получения широкого спектра новых потенциально биологически активных веществ. Ацилгидразоновые фрагменты присутствуют во многих биологически активных молекулах и придают им разнообразные виды фармакологической активности: антибактериальную, противотуберкулезную, противогрибковую, противоопухолевую, противовоспалительную, противосудорожную, противовирусную и антипротозойную. В обзоре рассмотрены примеры синтеза *N*-ацилгидразонов различного строения на основе природных и синтетических соединений, приведены данные по их фармакологическим свойствам: противотуберкулезной активности (против *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv), противомикробной и антибактериальной активности, противовирусной (вирусы гриппа, простого герпеса 1-го типа, Эпштейна–Барр, иммунодефицита человека) и противовоспалительной (в том числе анальгетической) активности, противоопухолевой активности (против линий клеток рака легких, груди, желудка, печени, толстой кишки и др.), а также пестицидной активности (фунгициды, ларвициды, инсектициды и регуляторы роста).

Ключевые слова: ацилгидразоны, синтез, биологическая активность

DOI: 10.31857/S0132342322060082

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	648
<i>N</i> -АЦИЛГИДРАЗОНОВ С ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ.....	650
<i>N</i> -АЦИЛГИДРАЗОНОВ С ПРОТИВОМИКРОБНОЙ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ.....	655
<i>N</i> -АЦИЛГИДРАЗОНОВ С ПРОТИВОВИРУСНОЙ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ.....	659
<i>N</i> -АЦИЛГИДРАЗОНОВ С ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ.....	664
<i>N</i> -АЦИЛГИДРАЗОНОВ С ПЕСТИЦИДНОЙ АКТИВНОСТЬЮ.....	667
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	672
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	672

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время поиск химических соединений, обладающих биологической активностью, проводят на основании научных принципов и количественных подходов, позволяющих прогнозировать структуру соединений и проводить их целенаправленный синтез. В развитии научных исследований в этой области прослеживается несколько тенденций, одна из которых – введение в структуру искомого молекулы фармакофорных фрагментов. К таким фрагментам можно отнести гидразидную группу [1, 2].

Ацилгидразоны – перспективный класс органических соединений, который привлекает внимание ученых благодаря наличию в молекуле связанных азометиновой (–NH–N=CH–) и карбонильной групп [3, 4]. Подобное сочетание функциональных групп обуславливает разнообразие фармацевтических свойств гидразонов [5–14], позволяющих использовать их для лечения онкологических заболеваний [15, 16], туберкулеза [17, 18], аллергических проявлений [19], и определяет перспективность их применения для синтеза координационных соединений [20], а также использование в синтезе различных гетероциклических каркасов [21], таких как 1,3,4-оксадиазолины [22], азетидин-2-оны [23], кумарины [24], 1,3-тиазолидин-4-оны [25, 26] и 1,3-бензотиазин-4-оны [27].

Основной способ синтеза ацилгидразонов – конденсация соответствующих гидразидов карбо-

Сокращения: ED₅₀ – средняя эффективная доза; IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования; MIC – минимальная ингибирующая концентрация.

Автор для связи: (тел.: +7 (937) 860-02-64; эл. почта: ern_lbrn@bk.ru).

новых или гетерокарбоновых кислот с различными альдегидами или кетонами в органических растворителях, чаще всего спиртового типа [28–36].

Производные гидразина, в том числе гидразиды кислот (1), за счет содержания хотя бы одной первичной аминной группы способны присоединяться к карбонильным соединениям (2). Меха-

низм образования гидразонов включает в себя атаку свободной электронной парой конечного атома азота поляризованного карбонила и последующее отщепление воды. Первая стадия – перенос протона от атома азота гидразина к кислороду карбонильной группы, вторая стадия – элиминирование второго протона (схема 1).

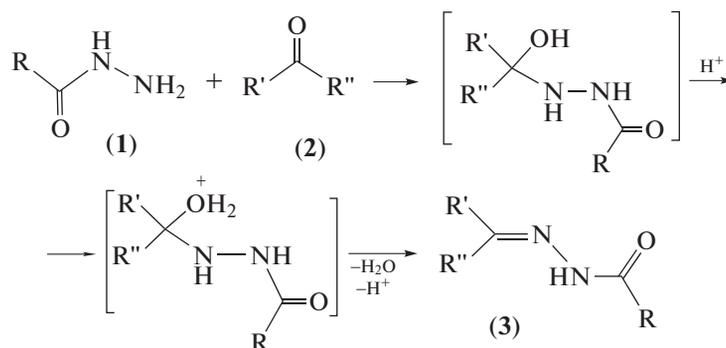


Схема 1. Общая схема синтеза ацилгидразонов.

Данная реакция обратима, однако равновесие в обычных условиях смещено в сторону образования гидразона (3). У гидразонов с плохой растворимостью обратимость реакции не наблюдается. Кислоты катализируют дегидратацию карбинола, при этом кислота превращает карбонильное соединение в сопряженную кислоту, облегчая и дальнейшее присоединение.

Оптимальное значение pH реакционной среды подбирается для каждой пары “гидразин – карбонильное соединение”, обычно оно близко к значению pK_a исходного гидразина.

Основные различия в синтезе гидразонов заключаются в использовании различных растворителей, катализаторов, температурных условий, продолжительности реакции. Подбор условий диктуется свойствами исходных соединений и образующихся гидразонов [37, 38].

Применение ацеталей как объекта конденсации с гидразидами кислот обусловлено тем, что многие альдегиды нестабильны и могут быть получены только с защищенной карбонильной группой. Так, был предложен синтез гидразонов (4a–f) и (5a–f) [39], в котором в качестве объектов конденсации с гидразидом изоникотиновой кислоты и гидразидом *para*-бромбензойной кислоты использовали ацетали замещенного уксусного, пропионового и некоторых других альдегидов. Для этого гидразиды, воду и соляную кислоту нагревали при 70°C до полного растворения и при перемешивании добавляли ацетали. Конденсация протекает в течение 30 мин в две стадии в одном реакторе без выделения и очистки промежуточных продуктов. Авторы отмечают, что метод имеет достаточно общий характер и может быть применен для синтеза широкого круга подобных соединений с незначительной корректировкой условий (схема 2).

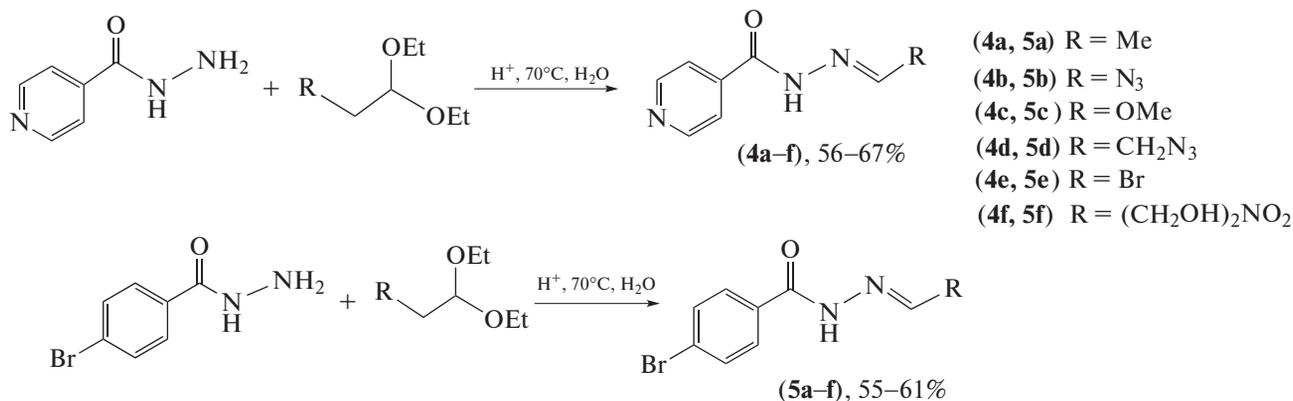


Схема 2. Синтез ацилгидразонов на основе изоникотиновой и *para*-бромбензойной кислот.

Традиционные методы синтеза ацилгидразонов предполагают использование органических растворителей и длительное нагревание. В 2018 г. Zhao et al. [40] сообщили о разработке нового “зеленого” синтеза ряда ацилгидразо-

нов (**6a–p**) реакцией производных бензальдегида с гидразидом этилоксалата в воде. Для большинства соединений реакцию проводили при 25°C, выход целевых соединений составил 60–98% (схема 3).

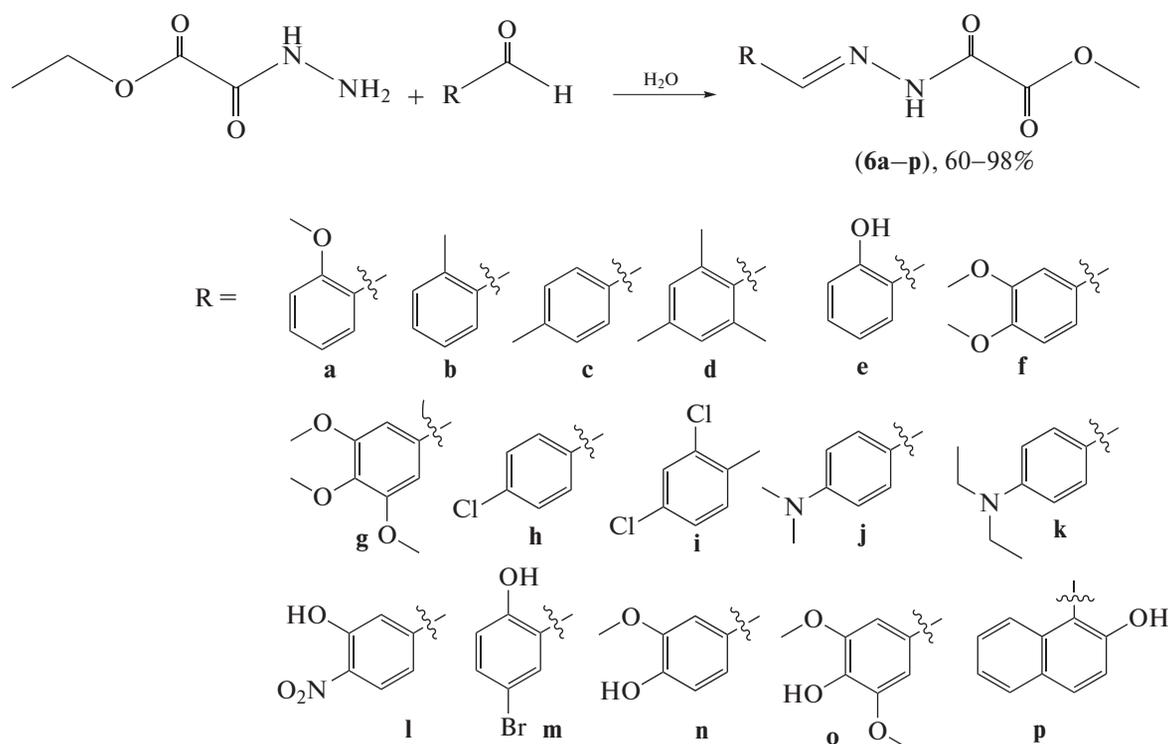


Схема 3. “Зеленый” синтез ацилгидразонов.

Изучив влияние природы заместителей и их положения в ароматическом кольце, авторы отмечают, что стерическое препятствие оказывает очевидное воздействие на скорость реакции, в то время как электронный эффект менее существен: ароматические альдегиды без *орто*-стерических помех были более реакционноспособны, чем *орто*-замещенные.

В зависимости от своего строения *N*-ацилгидразоны проявляют самые разнообразные биологические свойства. Установлено, что среди них есть соединения с противомикробным, противотуберкулезным, антибактериальным, противовоспалительным, противоопухолевым, противовирусным, фунгицидным и инсектицидным действием. Далее в обзоре рассмотрены конкретные примеры синтеза такого рода соединений за последние 15 лет и приведены данные по их биологической активности.

N-АЦИЛГИДРАЗОНЫ С ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Многие гидразиды и гидразоны нашли широкое применение в терапии и профилактике туберкулеза. Туберкулостатическим действием обладает ряд препаратов, таких как Фтивазид, Тубазид, Изониазид, Флуренизид, Салюзид и др. Однако лечение туберкулеза остается проблемой, требующей новых противотуберкулезных препаратов из-за появления штаммов микобактерий с множественной лекарственной устойчивостью, в связи с чем ведется поиск соединений, обладающих туберкулостатической активностью наряду с низкой токсичностью.

Рифампицин, Амикацин, ПАСК, Теризидон, Офлоксацин, Ципрофлоксацин, Пиразинамид, Ломефлоксацин – широко известные препараты, применяемые в профилактике и лечении туберкулеза, в структуре которых содержатся аромати-

ческие фрагменты. Исследованию активности соединений, содержащих ароматические заместители, посвящен целый ряд работ.

Так, в статье Jordão et al. [41] описаны синтез и изучение противотуберкулезной активности *N*-замещенных фениламино-5-метил-1*H*-1,2,3-три-

азол-4-карбогидразидов. Среди нитрофурановых производных соединение (7) оказывало наиболее сильный эффект и показало значение MIC (2.5 мкг/мл), сопоставимое с другими применяемыми в терапии препаратами, такими как этамбутол (MIC = 2 мкг/мл) (схема 4).

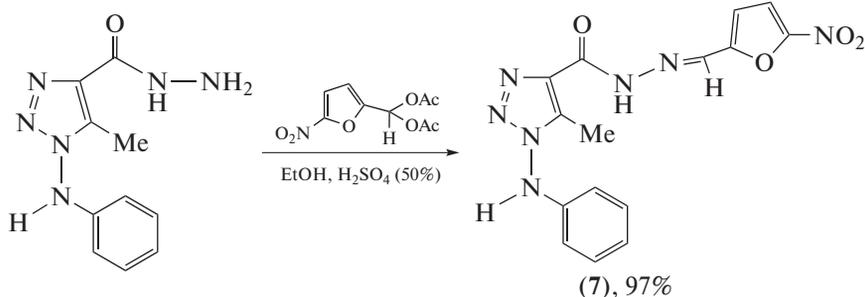


Схема 4. Синтез нитрофуранового производного (7).

С целью получения новых антимикобактериальных соединений Bedia et al. [42] синтезировали серию ацилгидразонов на основе гидразидов галоген- и нитрозамещенных бензойных кислот и провели скрининг противотуберкулезной активности против *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv – наиболее изученного штамма туберкулеза в исследовательских лабораториях [43]. Наибольшее ингибирование (99%) *M. tuberculosis* H₃₇Rv при постоянном уровне концентрации (6.25 мкг/мл) в этой серии ацилгидразонов показало фторпроизводное (8) (схема 5).

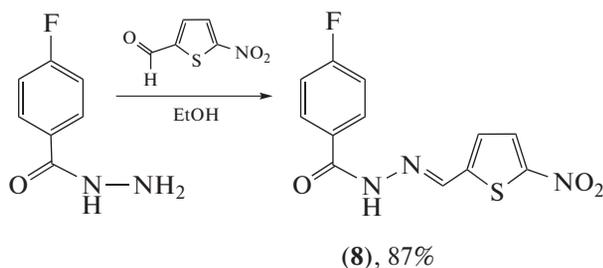


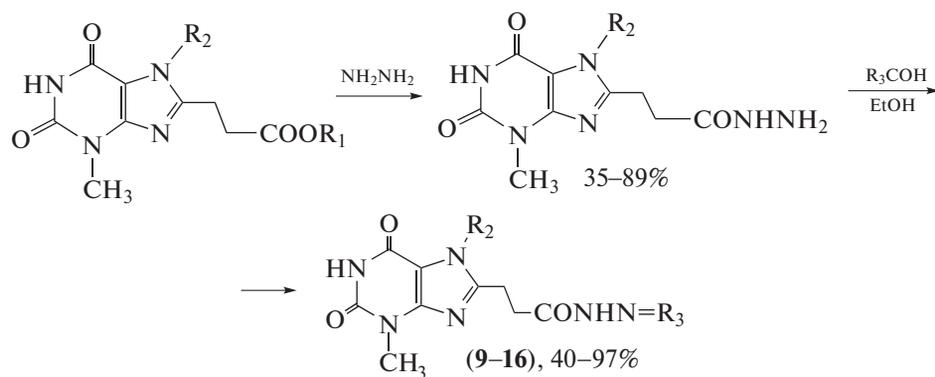
Схема 5. Синтез фторпроизводного (8).

В работе Казунина и Приймак [44] сообщается о синтезе гидразоновых производных ксантина с использованием гидразидов, содержащих в ароматическом кольце атомы галогенов, гидроксигруппы, нитро- и метоксигруппы, и изучении их противотуберкулезной активности (схема 6). При исследовании противотуберкулезной активности

соединений (9–16) было установлено, что исследуемый штамм *M. tuberculosis* H₃₇Rv проявляет чувствительность к большинству синтезированных ацилгидразонов: к производным (15) и (16), содержащим нитрогруппу в бензольном и фурановом циклах, он показал 100%-ную восприимчивость. Этот штамм *M. tuberculosis* H₃₇Rv не проявил чувствительности к гидразонам (9), (11) и (13), содержащим в ароматическом кольце галогены, гидроксигруппы и метоксигруппы.

На основе гидразидов пиридинкарбоновых кислот и фуросанила были синтезированы ацилгидразоны и изучена их активность в отношении штамма *M. tuberculosis* H₃₇Rv. Гибридное соединение *N*-(4-фенил-3-фуросанилметилиден)изониазид (17) в виде смеси изомеров *E* : *Z* (98 : 2) показало лучший антибактериальный профиль со значением MIC в 4.5 меньшим, чем для эталонного изониазида, против мультирезистентных штаммов (схема 7) [45].

В статье Vergara et al. [46] описаны синтез серии 26 *N*-[(*E*)-(монозамещенных бензилиден)]-2-пиразинкарбогидразидов (18–43) и исследование влияния этих соединений на жизнеспособность клеток – неинфицированных макрофагов и макрофагов, инфицированных *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guerin (BCG) (схема 8). Не проявившие цитотоксическую активность соединения (18), (20), (22), (29), (35), (37), (38), (41) и (42) испытали в отношении *M. tuberculosis* ATCC 27294. Ацилгидразоны (20), (37), (41) и (42) про-



$\text{R}_1 = \text{CH}_3$ (9, 11); C_2H_5 (10, 12–15); C_3H_7 (16)

$\text{R}_2 = \text{Ph}(4\text{-Cl})$ (9–11); H (12–16)

$\text{R}_3 =$ (9)

(10)

(11)

(12)

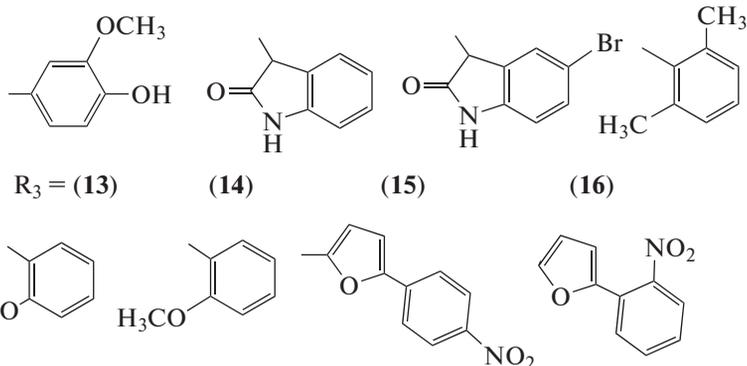


Схема 6. Синтез гидразоновых производных ксантина.

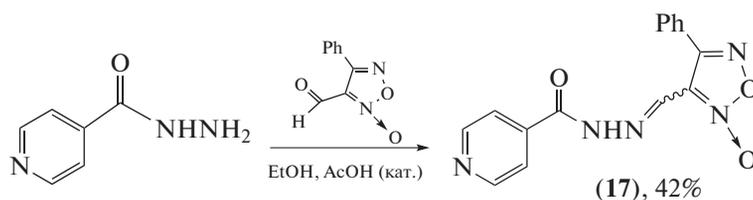


Схема 7. Гибридное соединение *N*-(4-фенил-3-фуроксанилметилен)изониазид (17).

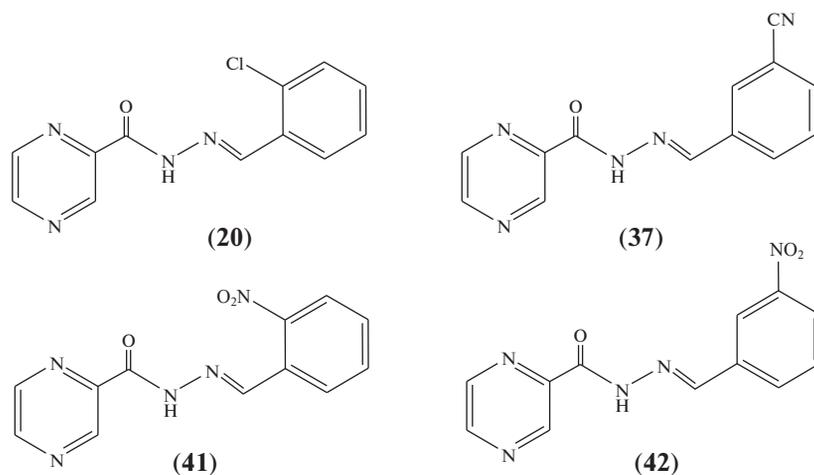


Рис. 1. Структуры ацилгидразонов (20), (37), (41) и (42).

явили значительную активность (50–100 мг/мл) по сравнению с препаратами первого ряда, таки-

ми как пиперазинамид, и не были цитотоксичны при соответствующих значениях МИС (рис. 1).

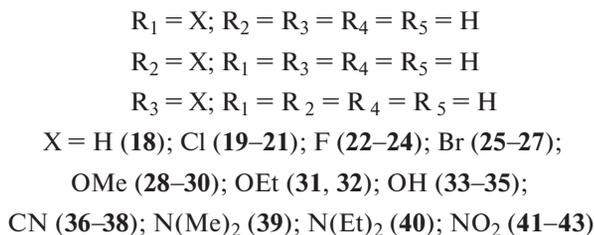
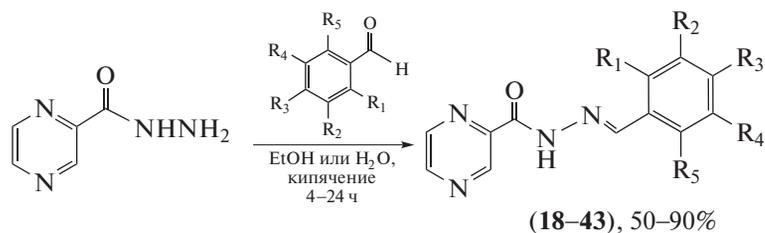


Схема 8. Синтез серии 26 *N*-[(*E*)-(монозамещенных бензилиден)]-2-пиразинкарбогидразидов (18–43).

Растущая проблема множественной лекарственной устойчивости туберкулеза привлекла внимание к разработке новых препаратов, которые не только активны, но и сокращают длительность терапии [47–49]. Одно из перспективных направлений – использование металлоценов. Среди металлоценов особое внимание привлекает ферроцен – химически стабильная и нетоксичная молекула [50]. Многие ферроценильные соединения проявляют значительную цитотоксическую [51,

52], противомаларийную [53–55], противогрибковую [56], антитоксоплазматическую [57] и ДНК-расщепляющую активность [58]. С целью создания новых противотуберкулезных препаратов из-за развития устойчивых к изониазиду штаммов *M. tuberculosis* были синтезированы изоникотиноилгидразоны (44) и (45) с ферроценильными фрагментами, однако по сравнению с изониазидом соединения (44) и (45) оказались менее эффективными (схема 9) [59].

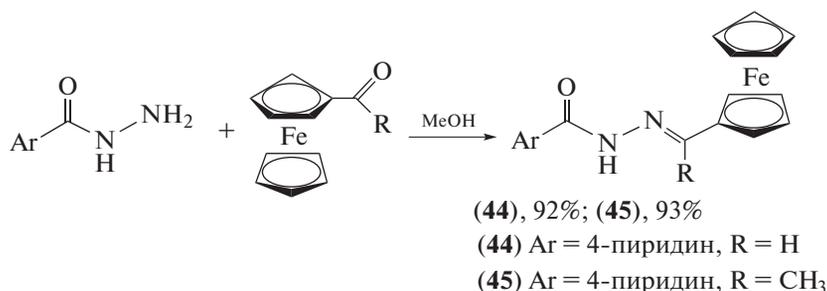


Схема 9. Синтез изоникотиноилгидразонов (44) и (45) с ферроценильными фрагментами.

Катаев с соавт. [60] установили, что изостевиол ингибирует рост *M. tuberculosis* (штамм H₃₇Rv *in vitro*) (МИС = 50 мкг/мл). В работе Андреевой с соавт. [61] структура этого природного метаболита противотуберкулезного действия была скомби-

нирована с известными синтетическими микостатиками (схема 10). Показано, что ацилгидразоны (46), (48), (49) и (52) ингибируют рост *M. tuberculosis* при МИС = 20 мкг/мл, а соединения (47), (50) и (51) – при МИС = 10 мкг/мл.

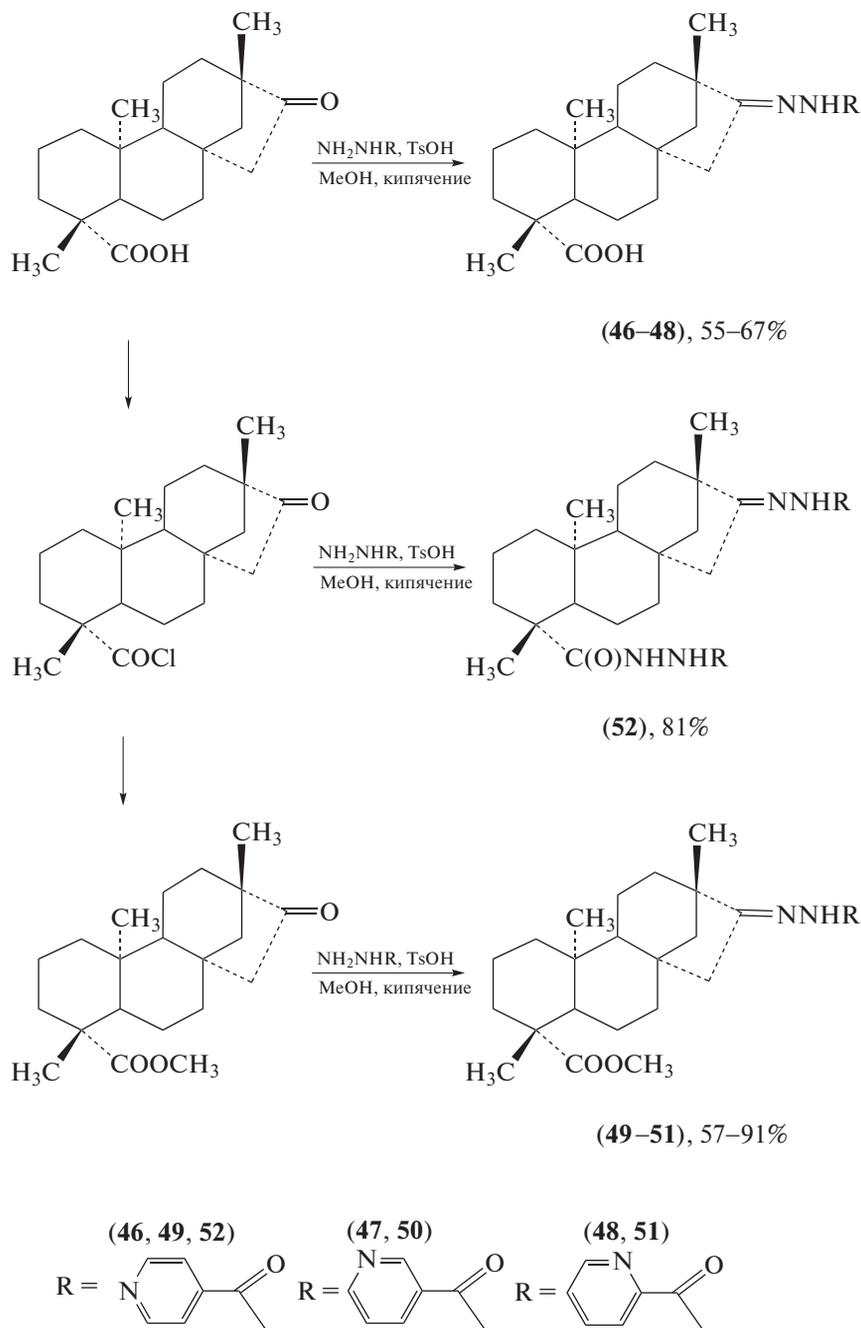
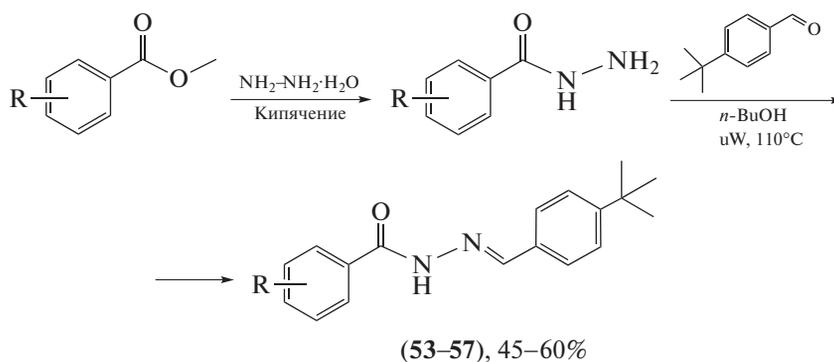


Схема 10. Синтез ацилгидразонов на основе изостевиола.

Пространственно затрудненные фенолы, как и ацилгидразоны, — это известные фармакофоры, обладающие различными видами биологической активности, что обуславливает интерес к синтезу гибридных соединений, сочетающих эти фрагменты. Опираясь на собственные исследования о взаимосвязи “структура–активность”, Lin et al. [62] синтезировали ацилгидразоны с фенольными-

ми группами, проявившие противотуберкулезную и антибактериальную активность. Для этого сложные эфиры обрабатывали гидразином с получением гидразидов, которые затем обрабатывали альдегидами в *n*-бутиловом спирте при микроволновом нагревании с получением ацилгидразонов (53–57), выход которых составил 45–60% (схема 11).



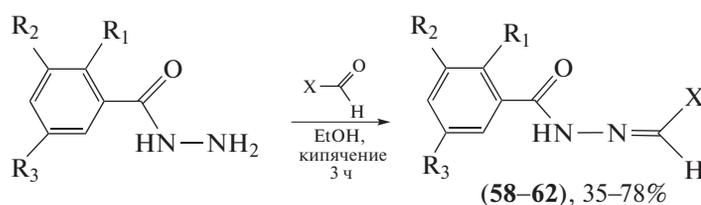
R: 4-OH (53); H (54); 2-OH (55); 3-OH (56); 3,4-(OH)₂ (57)

Схема 11. Синтез ацилгидразонов (53–57).

N-АЦИЛГИДРАЗОНЫ С ПРОТИВОМИКРОБНОЙ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

В научной литературе имеется огромное количество работ, посвященных поиску соединений с противомикробной и антибактериальной активностью среди производных гидразидов карбоновых кислот. Интерес исследователей к синтезу таких соединений связан с появлением большого количества устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий, вызванным нерациональным использованием противомикробных и антибактериальных препаратов. Сенная, кишечная и синегнойная палочки, кандида альбиканс, аспергилл черный, золотистый стафилококк, пневмококки – болезнетворные биологические агенты, известные виды бактерий и грибов, которые вызывают сильнейшие инфекционные заболевания в организме человека, приводящие к серьезным последствиям, даже к летальному исходу. Поэтому существует острая необходимость в разработке новых антибактериальных агентов.

Синтезирован ряд производных гидразидов ароматических кислот и изучена их антимикробная активность *in vitro* против пяти репрезентативных микроорганизмов (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Staphylococcus aureus*) (схема 12) [63]. Присутствие электроакцепторных групп в остатке бензойной кислоты увеличивало антимикробную активность. Кроме того, присутствие гетероциклического фуранового кольца не улучшало антимикробную активность замещенных гидразидов. В случае *S. aureus* наиболее активными были соединения (58) и (62) (MIC = 2.65 и 2.67 мкг/мл соответственно). Против *B. subtilis* наиболее эффективными кандидатами оказались соединения (58) и (59). В случае *E. coli* самая высокая активность была выявлена у динитропроизводного (60) и соединения с хлор- и нитро-заместителями (62). Соединение (60) также наиболее эффективно ингибировало *C. albicans*. Соединения (60) и (61) оказались наиболее эффективными противогрибковыми агентами относительно *A. niger*.



- (58) R₁ = Br; R₂ = R₃ = H; X = 4-NO₂C₆H₄
- (59) R₁ = Cl; R₂ = H; R₃ = NO₂; X = 4-NO₂C₆H₄
- (60) R₁ = H; R₂ = R₃ = NO₂; X = 3,4-CH₃C₆H₃
- (61) R₁ = Br; R₂ = H; R₃ = NO₂; X = 3,4-CH₃C₆H₃
- (62) R₁ = Cl; R₂ = H; R₃ = NO₂; X = 3,4-CH₃C₆H₃

Схема 12. Синтез ряда производных гидразидов ароматических кислот (58–62).

Противомикробное действие проявил 3-бензилиденамино-6-иод-2-фенилхиназолин-4(3*H*)-он (63),

активность которого в отношении штаммов *S. aureus* и *E. coli* составила 250 мкг/мл (схема 13) [64].

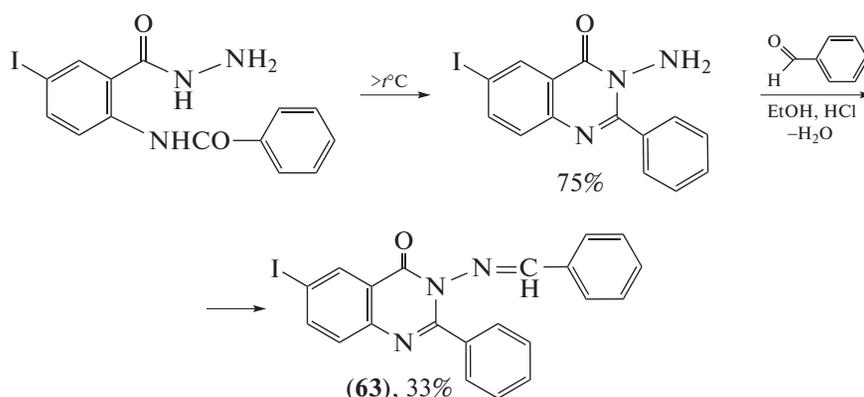


Схема 13. Синтез 3-бензилиденамино-6-иод-2-фенилхиназолин-4(3*H*)-она (63).

В работе Шматковой с соавт. [65] синтезированы пиридиноилгидразоны (64–69) ряда *R*-бензальдегидов ($R = \text{H}, 4\text{-N}(\text{CH}_3)_2, 2\text{-OH}$) (схема 14). Также проведен сравнительный анализ влияния

полученных ацилгидразонов на рост условно-патогенных бактерий *S. aureus*, *E. coli* и *B. subtilis*. Высокую активность проявили соединения (67) и (69) (100%-ное подавление роста).

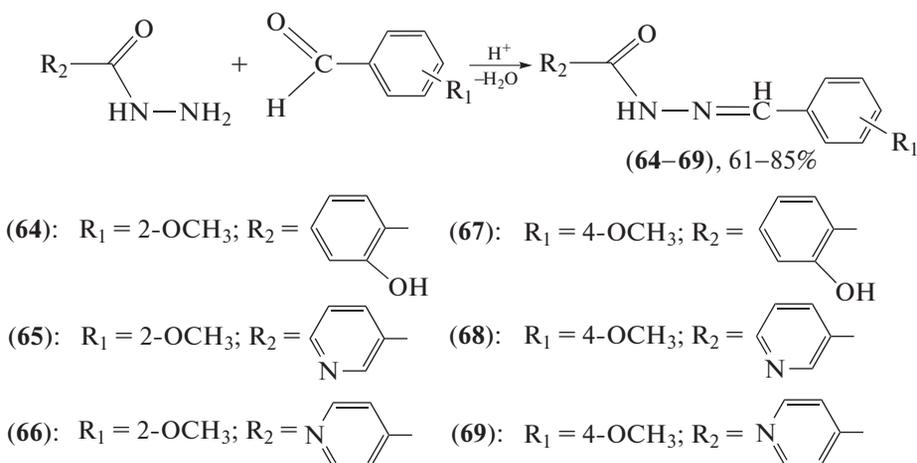


Схема 14. Синтез пиридиноилгидразонов (64–69).

Получены ацилгидразоны пиримидина, два из которых – соединения (70) и (71) – проявили активность в качестве ингибиторов *E. coli* PDHс-Е1 (рис. 2) [66, 67].

Описан [68] синтез ряда новых *N*-ацилгидразонов (72–81) с выходом 80–90% конденсацией гидразида никотиновой кислоты с соответствующими альдегидами и кетонами в этаноле в условиях кислого катализа (схема 15). Проведена

оценка антибактериальной активности серии соединений (72–81) *in vitro* в отношении двух грамотрицательных (*Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae*) и двух грамположительных (*Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*) бактерий. Установлено, что гидразоны (72) и (76) эффективны против *P. aeruginosa* (MIC = 0.220 и 0.195 мкг/мл соответственно).

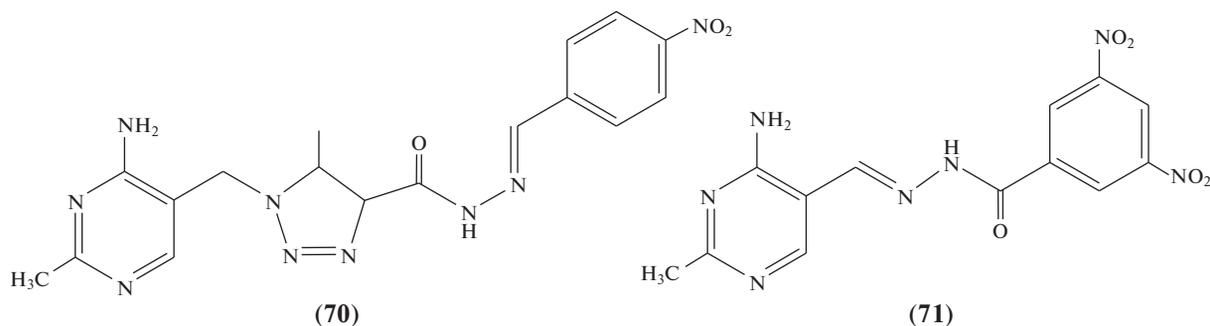


Рис. 2. Структуры 1-[(4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил]-5-метил-*N*-[(1*E*)-(4-нитрофенил)метилден]-4,5-дигидро-1*H*-1,2,3-триазол-4-карбогидазида (**70**) и *N'*-[(1*E*)-(4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метилден]-3,5-динитробензогидазида (**71**).

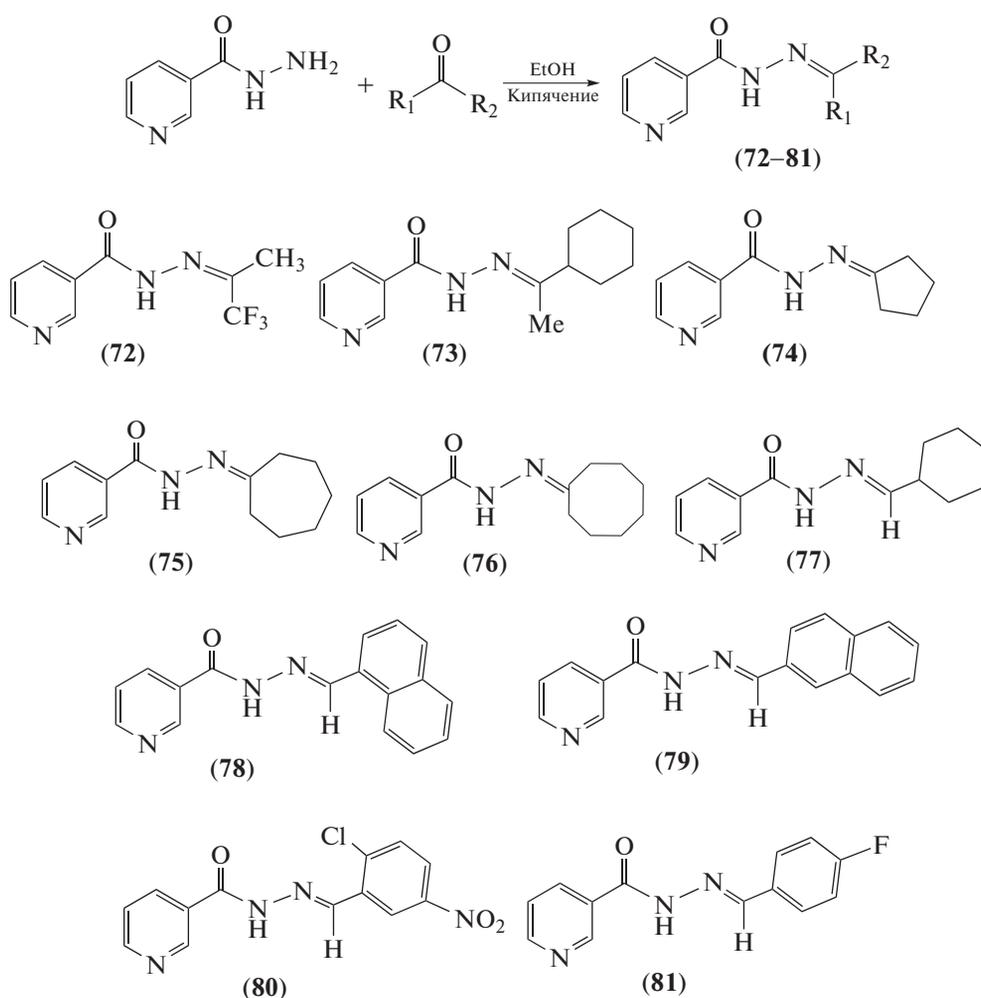


Схема 15. Синтез ряда новых *N*-ацилгидразонов на основе никотиновой кислоты (**72–81**).

При использовании гидразида салициловой кислоты были получены гетероциклические соединения различного строения и природы (схема 16) [69, 70]. Их активность против *S. aureus* изменялась

следующим образом: (**82**) > (**85–87**) > (**83**), в то время как соединение (**84**) вовсе не проявило активности. Наблюдаемый ряд активности против *C. albicans* был следующим: (**83**) > (**82**) > (**84**) > (**86**) > (**85**).

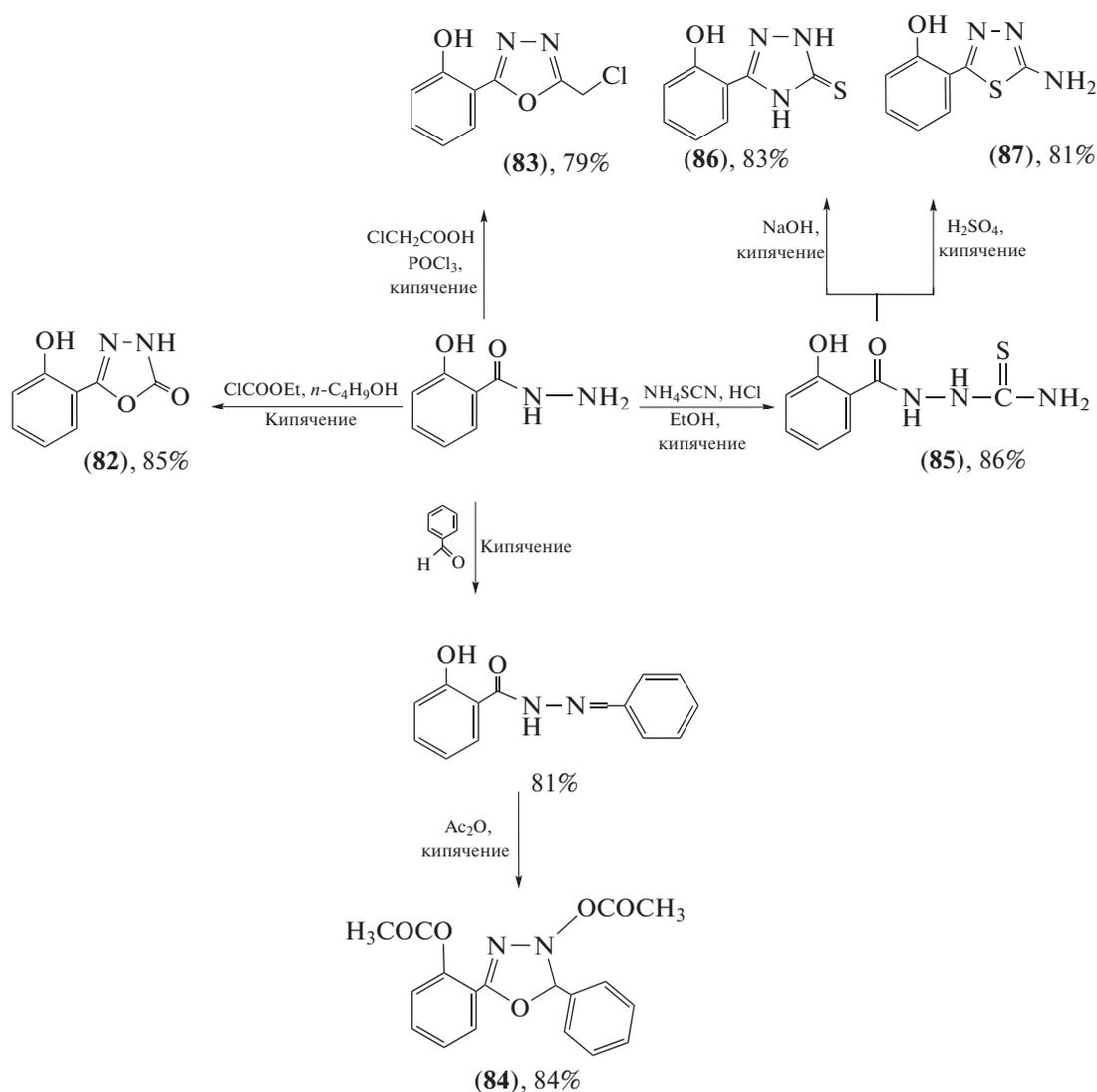


Схема 16. Получение новых производных на основе гидразида салициловой кислоты.

Синтезирована новая серия гликозилированных ацилгидразонов (**88–95**) и выполнен скрининг их антибактериальной, противогрибковой и противовирусной активности (схема 17) [71]. При этом пять соединений (соединения **88–91**) и (**94**) проявили умеренную противогрибковую активность против оцениваемых штаммов *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* и *Candida albicans*. У производного (**90**) выявлена фунгицидная активность в отношении *Candida glabrata* в концентрации 173.8 мкМ, причем углеводный остаток способствовал увеличению противогрибкового потенциала в отношении этого штамма. Дополнительные химические манипуляции с производным (**90**) могут привести к получению новых потенциально антимикробных агентов.

Новый бифункциональный ацилгидразон (**96**) (рис. 3) был синтезирован реакцией 5-метилизоксазол-4-карбоилгидразина с бензальдегидом.

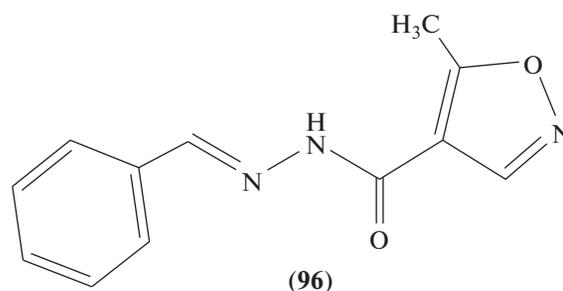


Рис. 3. Строение 5-метил-*N*-[(1*E*)-фенилметил]изоксазол-4-карбогидразида (**96**).

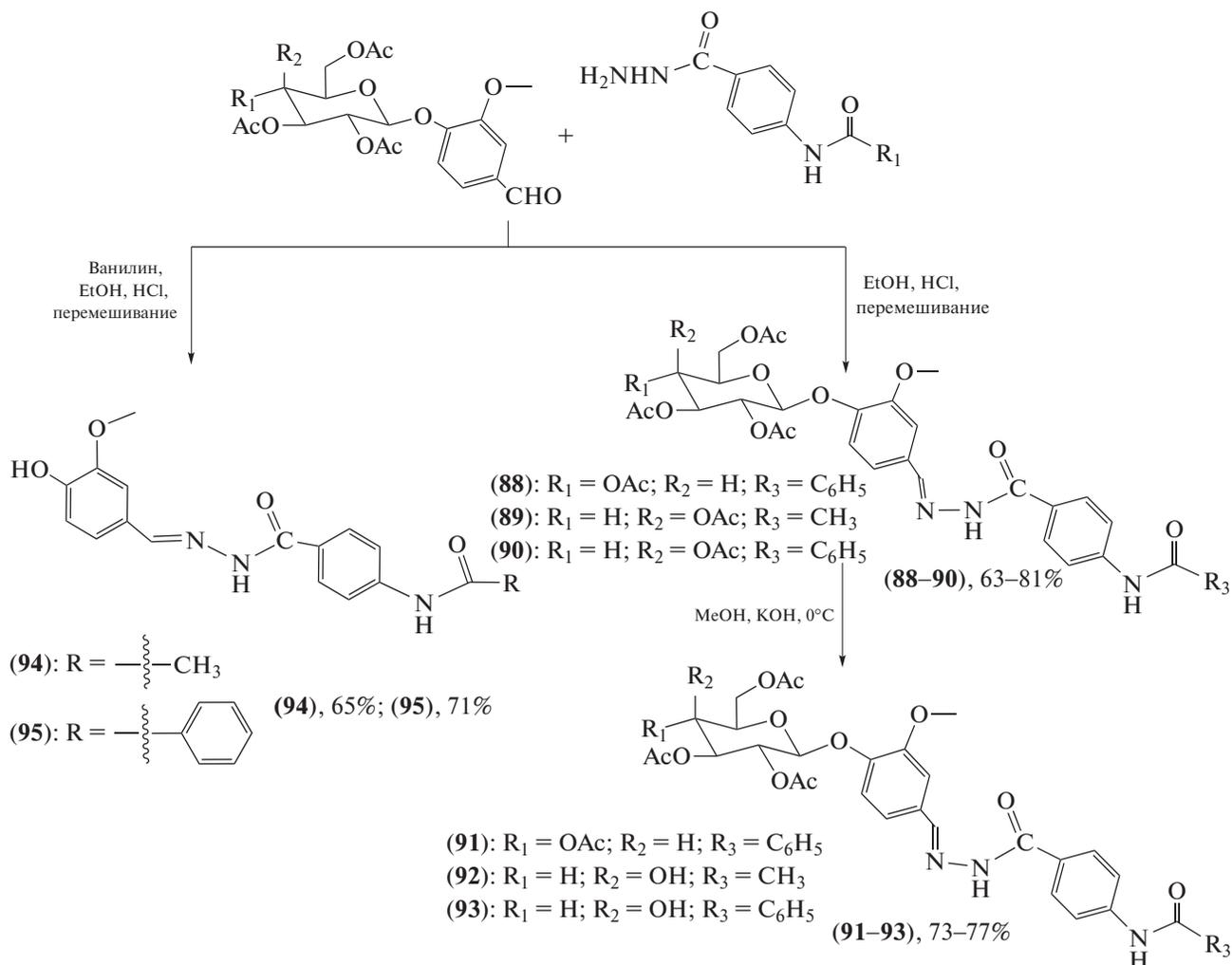


Схема 17. Синтез новой серии гликозилированных ацилгидразонов (88–95).

Соединение обладает умеренной антибактериальной активностью, а также вызывает бактериостаз широкого спектра действия [72].

N-АЦИЛГИДРАЗОНЫ С ПРОТИВОВИРУСНОЙ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Исследование противовирусной активности соединений, содержащих в своем составе фрагмент ацилгидразона, проводили на различных вирусных объектах. Было установлено, что данные соединения оказывают влияние на вирусы гриппа, простого герпеса 1-го и 2-го типов, вирус Эпштейна–Барр, цитомегаловирус, вирусы гепатита А и вирус иммунодефицита человека [73–78].

Так, в работе Zhao et al. [73] получены ацилгидразоны с амидным и морфолиновым фрагментами для лечения гриппа А и В (схема 18). Соединения

(97) ($IC_{50} = 2.61 \text{ мкМ}$), (98) ($IC_{50} = 2.37 \text{ мкМ}$) и (99) ($IC_{50} = 3.15 \text{ мкМ}$) проявляют более высокую ингибирующую активность, чем известный лекарственный препарат осельтамивир карбоксилат ($IC_{50} = 3.84 \text{ мкМ}$).

Заражение вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) стало причиной смерти почти 33 млн человек, поиск эффективных схем лечения ВИЧ остается серьезной глобальной проблемой общественного здравоохранения. Проведены эксперименты по синтезу противовирусных агентов (схемы 19–21) [74–76]. Установлено, что синтезированные ацилгидразоновые соединения могут ингибировать сборку капсида (капсидный белок ВИЧ-1 играет важную роль в цикле репликации вируса) и обладают противовирусными свойствами, из которых соединения (100–105) проявляли высокую противовирусную активность со значениями IC_{50} , равными 0.21–0.56 мкг/мл.

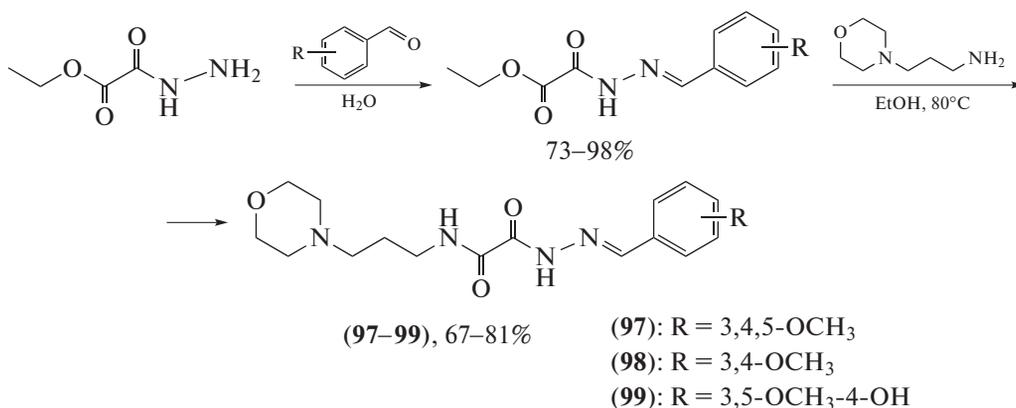


Схема 18. Получение ацилгидразонов с амидным и морфолиновым фрагментами.

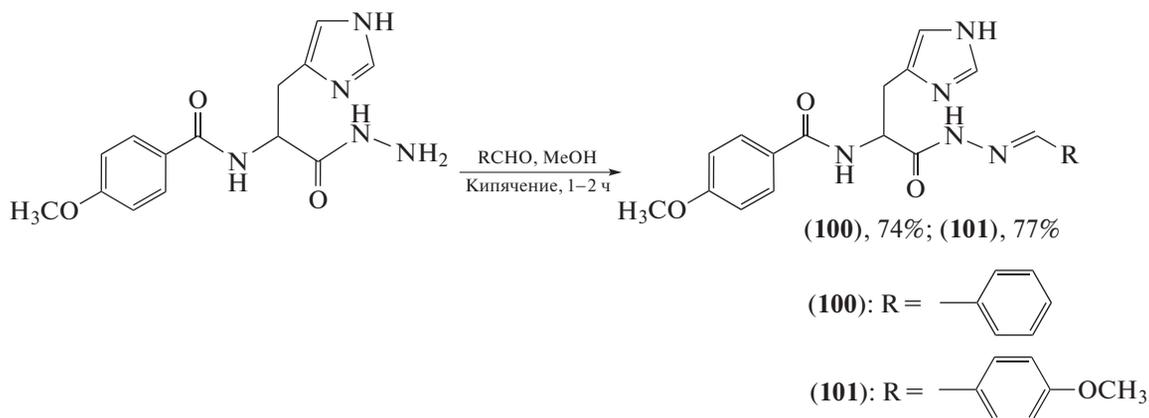


Схема 19. Синтез ацилгидразонов (100) и (101).

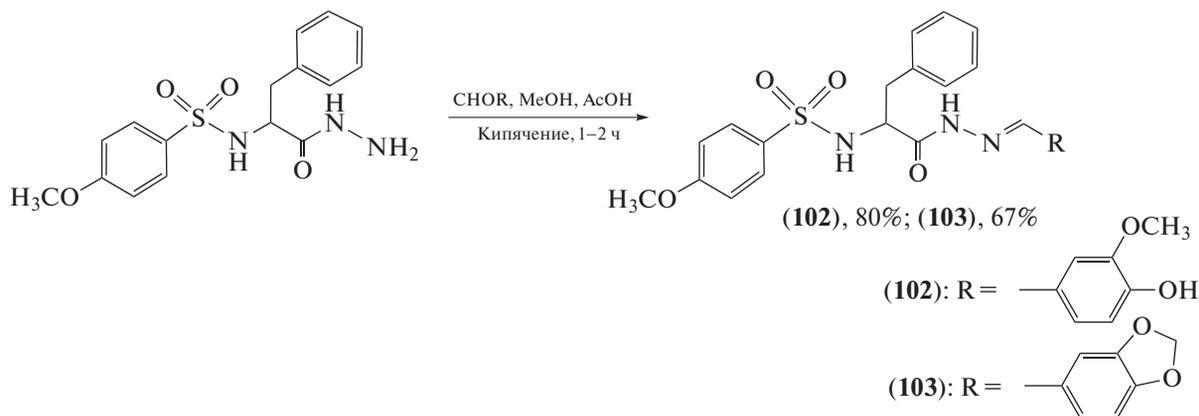


Схема 20. Синтез ацилгидразонов (102) и (103).

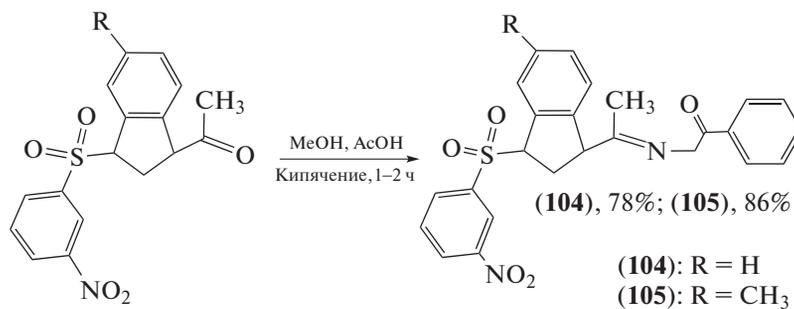
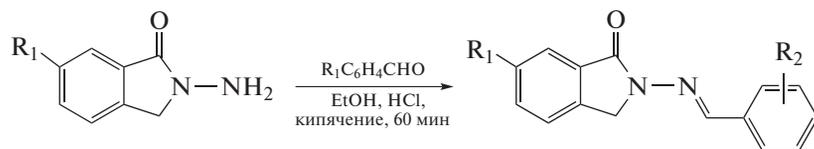


Схема 21. Синтез ацилгидразонов (104) и (105).

Показано, что в классе ацилгидразонов бензотиазола бензо[*d*]изотиазол-3(2*H*)-оновый фрагмент (соединения (106–114)) крайне важен для проявления антиретровирусной активности (схема 22) [77].



(106–114), 81–95%

(106) R₁ = H, R₂ = H

(107) R₁ = H, R₂ = 3-F

(108) R₁ = H, R₂ = 4-Cl

(109) R₁ = H, R₂ = 3-NO₂

(110) R₁ = H, R₂ = 4-OH

(111) R₁ = CH₃, R₂ = 4-F

(112) R₁ = CH₃, R₂ = 4-Cl

(113) R₁ = CH₃, R₂ = 3-NO₂

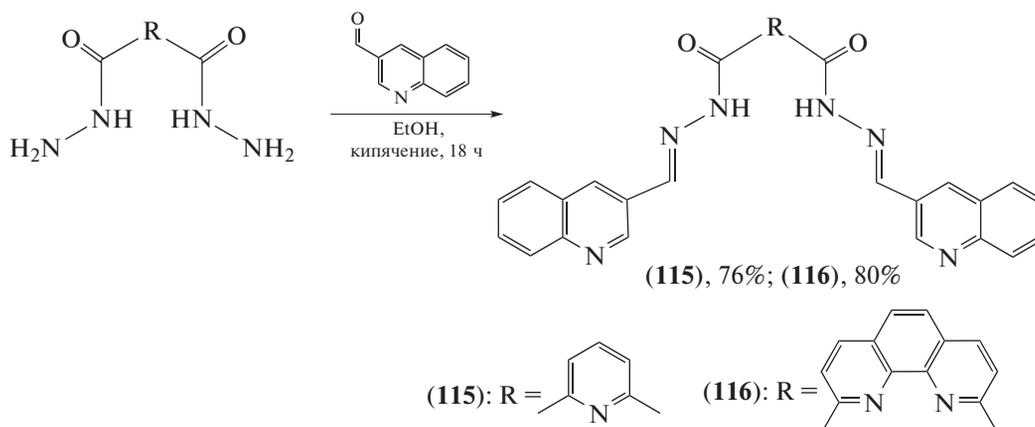
(114) R₁ = CH₃, R₂ = 3-OH

Схема 22. Синтез производных с бензо[*d*]изотиазол-3(2*H*)-оновым фрагментом (106–114).

Гидразоны (115) и (116), содержащие пиридинный, фенантроминовый и хинолиновый фрагменты (схема 23) и используемые в концентрации 5 мкМ, были способны значительно снизить экс-

прессию вируса Эпштейна–Барр в тестируемых клетках *in vitro* [78].

Циклопропилкарбоксиацилгидразон (117) (схема 24) проявлял активность против вируса простого герпеса 1-го типа [79].



(115), 76%; (116), 80%

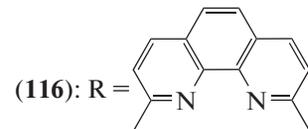
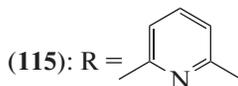
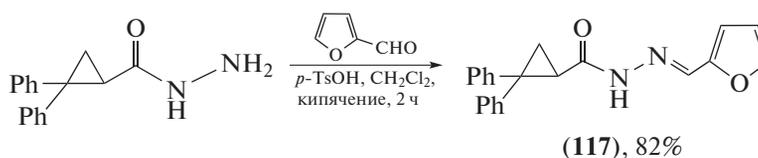


Схема 23. Синтез гидразонов (115) и (116).



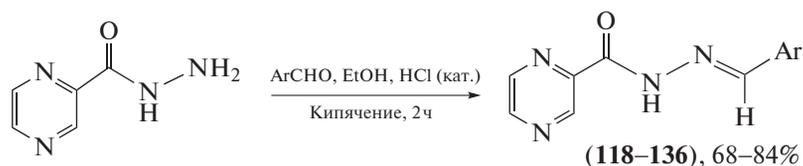
(117), 82%

Схема 24. Синтез циклопропилкарбоксиацилгидразона (117).

В лечении острых вирусных инфекций важная роль отводится использованию противовоспалительных и анальгетических препаратов, т.к. они снижают температуру тела, облегчают симптомы вирусной инфекции за счет жаропонижающего и обезболивающего эффектов. Почти все нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), такие как ибупрофен, диклофенак и фенпрофен, проявляют клиническую токсичность в отношении желудочно-кишечного тракта из-за прямого контакта присутствующих свободных карбоксильных групп со слизистой оболочкой и ингибирования фермента циклооксигеназы [80]. Поэтому поиск безопасных и малотоксичных препаратов крайне актуален. Обширная база структур для

исследований в этой области молекул включает фрагмент $C=N-NH-C(C=O)$.

Фармакологическая оценка на различных моделях боли и воспаления синтезированных производных пиразин-*N*-ацилгидразона (**118–136**) (схема 25) в качестве новых анальгетиков и противовоспалительных препаратов-кандидатов приведена в работе da Silva et al. [81]. Обнаружено, что все полученные производные обладают антиноцицептивной (обезболивающей) и противовоспалительной активностью, особенно соединение (**133**) (2-*N*-[(*E*)-(3,4,5-триметоксифенил)метилен]-2-пиразинкарбогидразид), которое предлагается авторами как новое обезболивающее и противовоспалительное средство для разработки лекарств.



- (118) Ar = 4-Pr¹Ph; (119) Ar = Ph; (120) Ar = 2-Nh;
 (121) Ar = 9-An; (122) Ar = 4-PhBn; (123) Ar = 4-FPh;
 (124) Ar = 4-(3-F)CH₃Ph; (125) Ar = 4-NO₂Ph; (126) Ar = 4-OHPh;
 (127) Ar = 2-OHPh; (128) Ar = 3,5-ди(*мет*-Bu)-4-OHPh;
 (129) Ar = 1,3-PhO₂CH₂; (130) Ar = 4-OH-3-OCH₃Ph;
 (131) Ar = 3-OH-4-OCH₃Ph; (132) Ar = 3,4-OCH₃Ph;
 (133) Ar = 3,4,5-OCH₃Ph; (134) Ar = 4-O-4*H*-2-хромен;
 (135) Ar = 4-C₅H₄N; (136) Ar = 2-C₅H₄N

Схема 25. Синтез производных пиразин-*N*-ацилгидразона (**118–136**).

Данный вид активности выявлен также у фуроксанил-*N*-ацилгидразонов [82]. Среди синтезированных соединений (схема 26) фуроксанил-*N*-ацилгидразоны (**137**) и (**138**) проявляли как анальгетическую,

так и противовоспалительную активность. Отсутствие мутагенности активных производных (**137**) и (**138**) позволяет рассматривать их в качестве кандидатов для дальнейших клинических исследований.

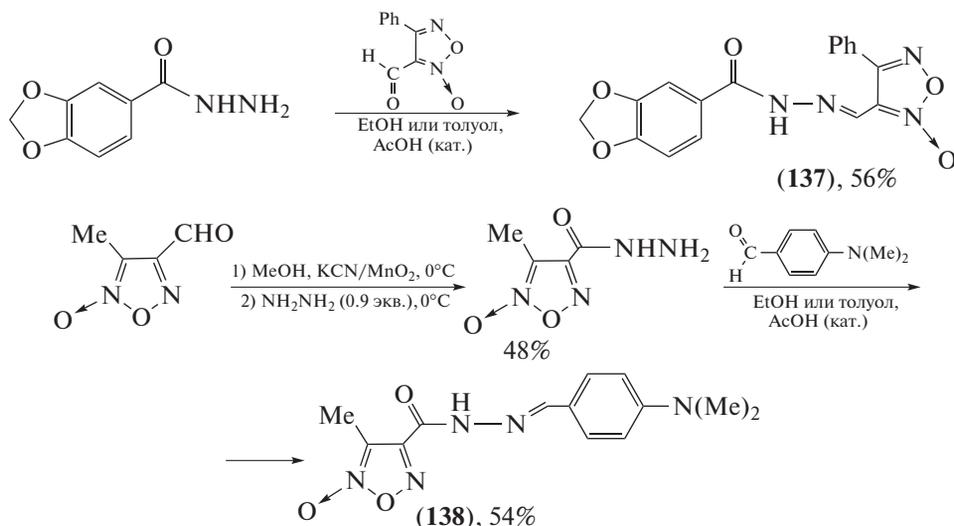
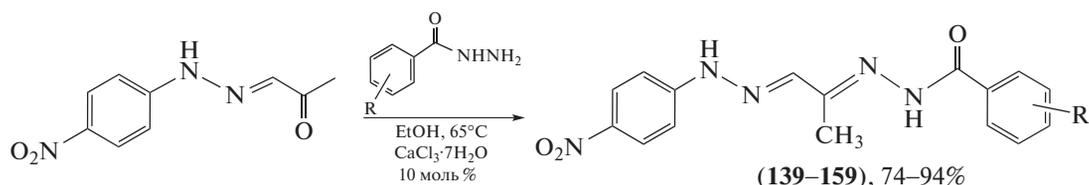


Схема 26. Синтез производных пиразин-*N*-ацилгидразона (**118–136**).

В работе Meira et al. [83] продемонстрирован синтез, выявлены структурные требования и механизм, лежащий в основе противовоспалительной активности нового семейства гидразон-*N*-ацилгидразонов (**139–159**). Производные 4-(нитрофенил)-*N*-ацилгидразона (**139–159**) были синтезированы (схема 27) и подвергнуты скринингу для подавления пролиферации лимфоцитов и ингибирования нитритов в макрофагах. Противовоспалительная активность соединений достигается за счет модулирования секреции IL-1 β , синтеза простагландина E2 в макрофагах и ингибирования ак-

тивности кальциневринфосфатазы в лимфоцитах. Взаимосвязь “структура–активность” изучали изменением положения заместителей, а также присоединением структурно-связанных заместителей. Показано, что изменение положения заместителя оказывает существенное влияние на противовоспалительную активность соединения. Отмечено также, что *N*-метильная группа, присоединенная к фрагменту 4-(нитрофенил)гидразона, снижает активность. Соединение (**150**) значительно уменьшало миграцию воспалительных клеток на модели перитонита, вызванного каррагинаном.



- (139) R = H; (140) R = 4-OCH₃; (141) R = 4-CF₃;
 (142) R = 4-*mpem*-Bu; (143) R = 4-NH₂; (144) R = 4-N(CH₃)₂;
 (145) R = 4-Cl; (146) R = 4-OH; (147) R = 4-NO₂;
 (148) R = 3-OCH₃; (149) R = 3,5-(–CH₂OCH₂–);
 (150) R = 3,5-(NO₂)₂; (151) R = 2-CH₃; (152) R = 3-CH₂;
 (153) R = 2-F; (154) R = 2-Cl; (155) R = 2-I;
 (156) R = 2-OH; (157) R = 2-OPh;
 (158) R = 2-NH₂; (159) R = 2-NHPh

Схема 27. Синтез производных 4-(нитрофенил)-*N*-ацилгидразонов (**139–159**).

Известные антиангиогенные и противовирусные активности гидразонов бетулиновой и бетулоновой кислот обусловили синтез гидразонов (**160**) и (**161**). Для получения целевых соединений (**160**) и (**161**) [84] на основе аллобетулина окислением селенистой кислотой промежуточ-

ных алкенов синтезированы *18a,19bH*-урсановый и *19b,28*-эпокси-*18aH*-олеанановый альдегиды соответственно, вовлеченные далее во взаимодействие по стандартной методике с ацетилгидразином в этаноле в присутствии уксусной кислоты (схема 28).

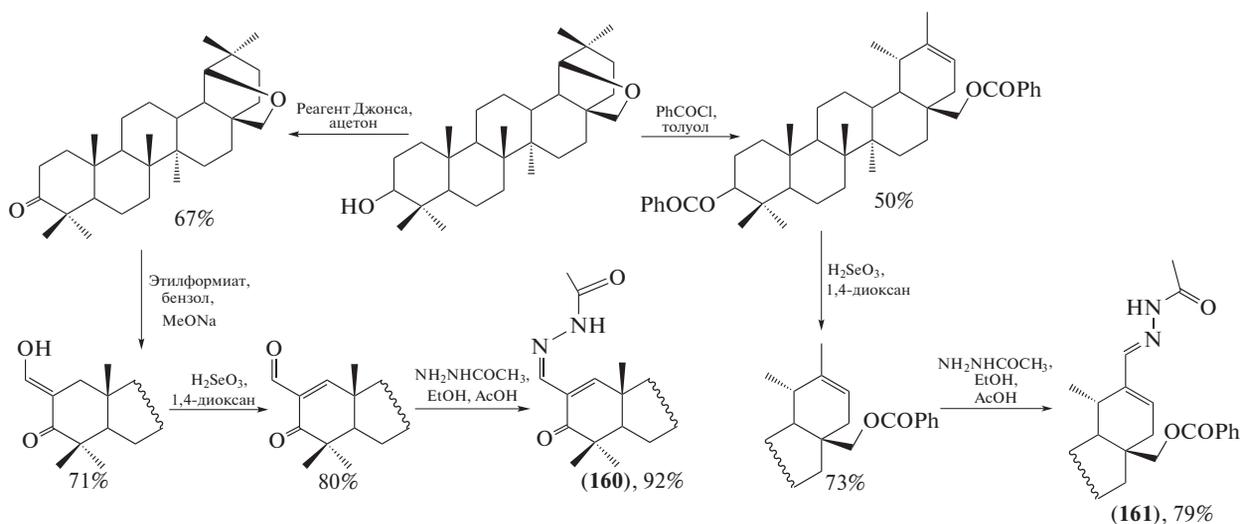
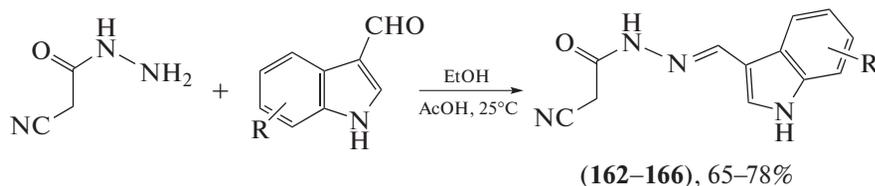


Схема 28. Синтез гидразонов на основе аллобетулина.

Целью работы Moraes et al. [85] были синтез и оценка противовоспалительного потенциала *in vitro*, *in vivo* и *in silico* новых производных индол-*N*-ацилгидразона (**162–166**), полученных конденсацией эквимольных количеств гидразида α -цианоуксусной кислоты и различных 3-индольных карбоксальдегидных производных (схема 29). Реакцию проводили в условиях кислотного катализа, необходимого для образования иона

оксония (карбоксальдегида), подвергающегося далее нуклеофильной атаке гидразидным азотом. Последующая дегидратация привела к получению целевых гидразонов (**162–166**) с выходом 61–98%. Проведены испытания полученных соединений *in vitro* и *in vivo*, производное (**163**) предлагается авторами в качестве соединения-лидера для разработки противовоспалительных препаратов.



(**162**) R = 5-Br; (**163**) R = H; (**164**) R = 5-CH₃;
(**165**) R = 4-NO₂; (**166**) R = 5-OCH₃

Схема 29. Синтез новых производных индол-*N*-ацилгидразона (**162–166**).

N-АЦИЛГИДРАЗОНЫ С ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Онкологические заболевания – это широкий и разнообразный класс болезней. Рак – вторая ведущая причина смерти во всем мире, вследствие онкологических заболеваний в 2018 г. умерло ~10 млн человек. У мужчин наиболее распространены рак легких, простаты, толстой кишки, желудка и печени, тогда как у женщин – рак груди, колоректальный рак, рак легких, шейки матки и щитовидной железы.

Гидразоны стали важным объектом исследований в поиске противоопухолевых агентов, т.к. производные на основе гидразона обладают активностью против клеточных линий различных опухолей. Так, *N*-ацилгидразон диарилмочевины (**167**) (рис. 4) проявил наиболее сильную антипролиферативную активность против трех клеточных

линий: линии лейкемии человека (HL-60), линии эпителиальных клеток аденокарциномы легкого человека (A549) и линии клеток рака молочной железы человека (MDA-MB-231) со значениями IC₅₀, равными 0.13, 0.7 и 0.5 мМ соответственно [86].

Арилиден-1*H*-индол-2-карбогидразоны (**168–170**) (рис. 5) [87] и бензофурангидразоны (**171–173**) (рис. 6) [88] продемонстрировали высокую степень антипролиферативного эффекта на клеточных линиях эритролейкемии человека K562 и меланомы Colo-38.

Соединения на основе катапаса (**174**) и (**175**) (рис. 7) [88] проявили явно селективную цитотоксическую активность против клеточных линий гепатокарциномы Huh-7 *in vitro* ((**174**), IC₅₀ = 7.74 ± 2.18 мкг/мл; (**175**), IC₅₀ = 4.46 ± 1.05 мкг/мл) по сравнению с противоопухолевым препаратом 5-FU (IC₅₀ = 10.41 ± 3.41 мкг/мл).

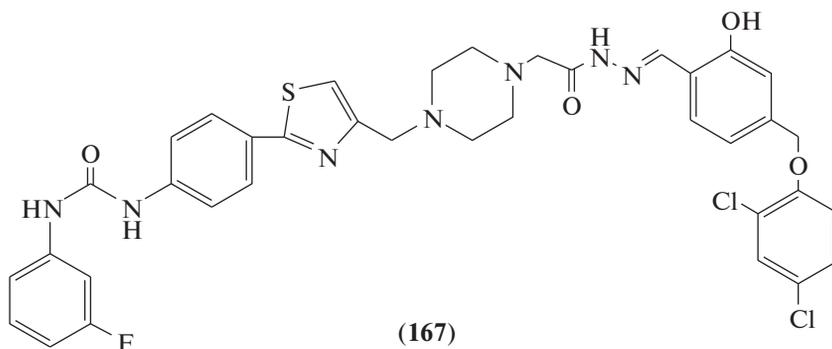


Рис. 4. Строение *N*-ацилгидразона (**167**).

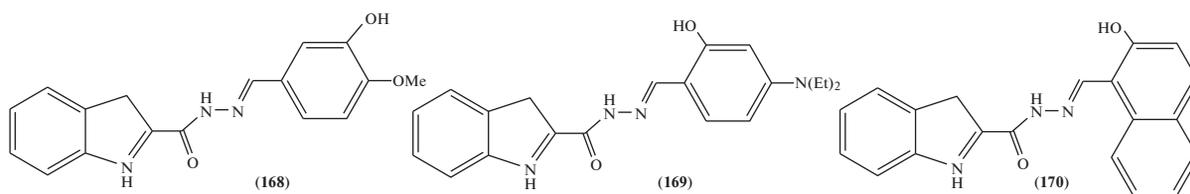


Рис. 5. *N*-Ацилгидразоны (168–170).

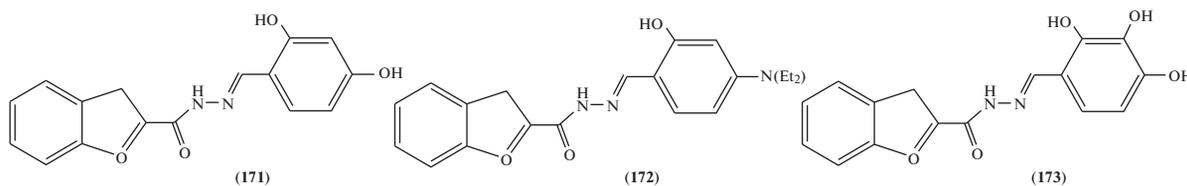


Рис. 6. *N*-Ацилгидразоны (171–173).

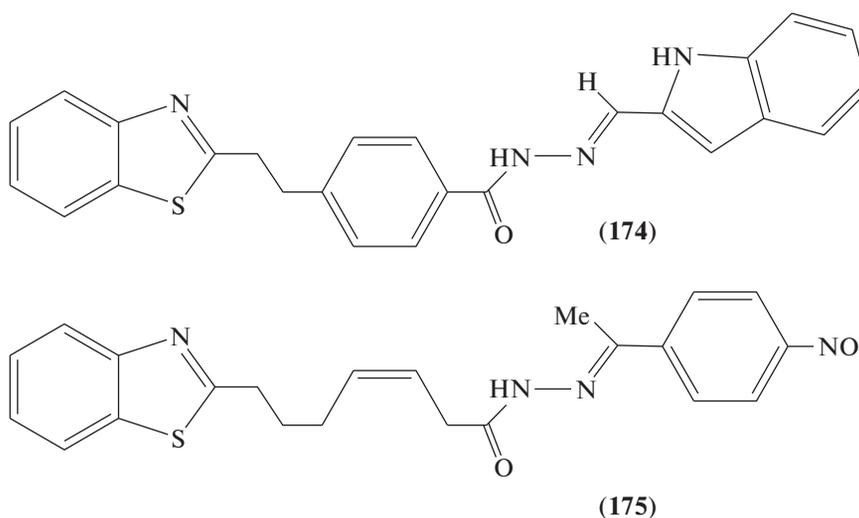


Рис. 7. Строение ацилгидразонов на основе катапаса (174) и (175).

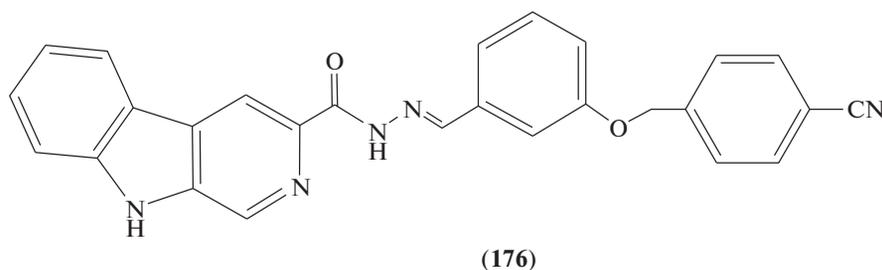


Рис. 8. Производное β -карболина (176).

Ацилгидразон с β -карболиновым фрагментом (176) (рис. 8) [89] проявлял наиболее высокую противоопухолевую активность со значениями IC_{50} , равными 1–2 мкМ, против клеточных линий MCF-7, MCF-7/ADR (рака молочной железы) и сохранял значительную активность в раковых клетках со множественной лекарственной устойчивостью.

Производное фенилаланилгидразона (177) (рис. 9) [90] может служить потенциальным со-

единением для клеточных “мишеней” гиперэкспрессированного рака желудка LSD1.

Ацилгидразон (178), полученный при кипячении салициальдегида и 5-(2,4-дифторфенил)-2-фурангидразида в этаноле в присутствии катализатора $AcOH$ (схема 30), проявил активность против клеточных линий промиелоцитарного лейкоза человека HL-60 ($IC_{50} = 16.4$ мМ), в 3 раза превосходящую активность известного цитостатического препарата доксорубина ($IC_{50} = 53.3$ мМ) [91].

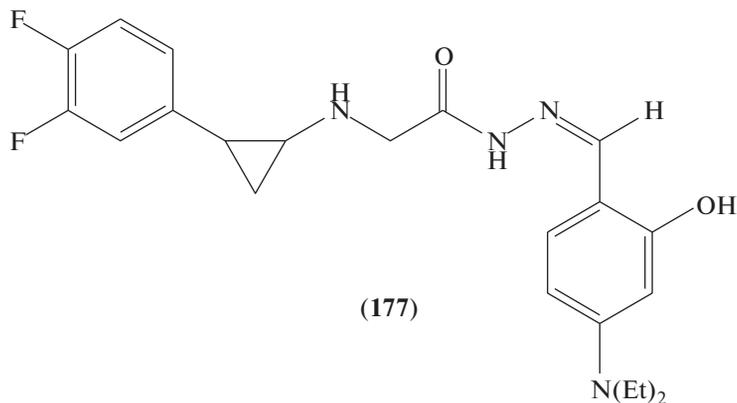


Рис. 9. Ацилгидразон (177).

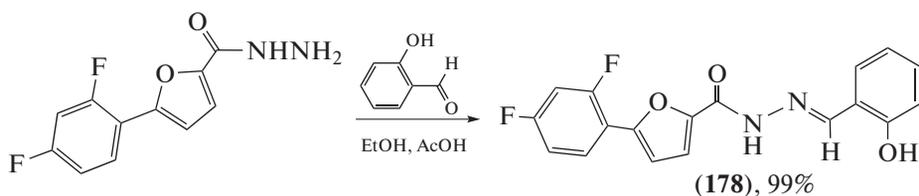


Схема 30. Ацилгидразон (178), полученный при кипячении салициальдегида и 5-(2,4-дифторфенил)-2-фурангидразида.

Производные 2-гидроксипбензилиденовых производных гидразида *N*-(2-трифторметилпиридин-4-ил)антрапиловой кислоты и некоторые аналоги, содержащие (2-трифторметил)пиридин-4-иламиногруппу в 3-м или 4-м положениях бензогидразида или 4-м положении фенилацетогидразида, были получены (схема 31) и изучены в качестве по-

тенсиальных противоопухолевых агентов [92]. Соединения (179–182), несущие 4-(диэтиламино)салицилиденовую группу, проявляли сильную цитотоксичность со средними значениями IC_{50} в субмикромольном диапазоне и различную клеточную селективность при наномольных концентрациях.

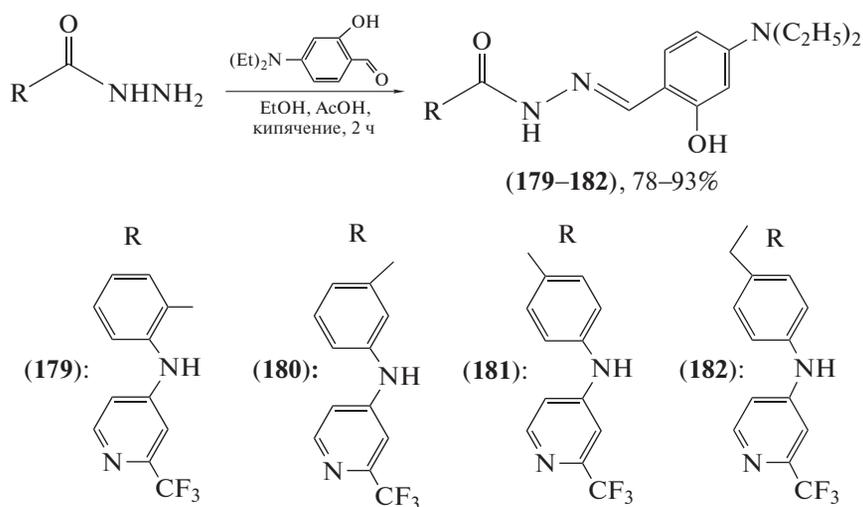
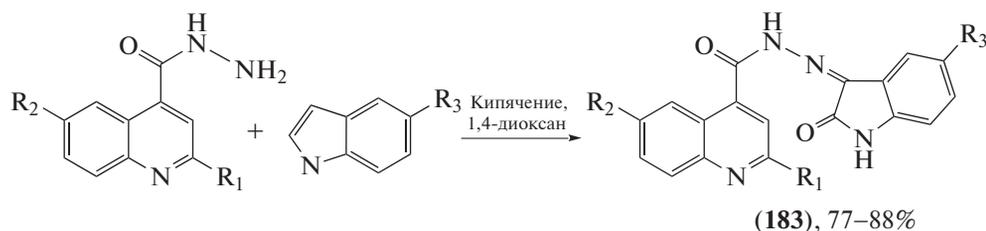


Схема 31. Синтез ацилгидразонов (179–182).

Интерес использования производных изатина в реакции конденсации с гидразидами карбоновых кислот обусловлен их известностью в качестве лекарственных противоопухолевых препаратов и биологически активных веществ (триптофан, серотонин, грамин, тиосемикарбазоны изатина) [93, 94]. С целью поиска новых высокоэффективных биологически активных веществ осуществлен синтез 2*R*,6*R'*-(5-*X*-2-оксо-1,2-дигидро-3*H*-индол-3-или-

ден)хинолин-4-карбоксихидразидов (**183a–o**) кипячением гидразидов 2*R*,6*R'*-хинолинкарбоновых кислот с замещенными 5-изатинами в течение 24 ч в 1,4-диоксане, выход продуктов составил 77–88% (схема 32) [95]. Соединения показали значительную антипролиферативную активность в отношении тестируемых линий раковых клеток человека – почечной аденокарциномы (769-Р) и гепатоцеллюлярной карциномы (НерG2).



(183a), 88%: R₁ = CH₃, R₂ = H, R₃ = H; (183b), 86%: R₁ = CH₃, R₂ = CH₃, R₃ = H;
 (183c), 82%: R₁ = CH₃, R₂ = H, R₃ = CH₃; (183d), 78%: R₁ = CH₃, R₂ = CH₃, R₃ = CH₃;
 (183e), 82%: R₁ = CH₃, R₂ = OCH₃, R₃ = H; (183f), 86%: R₁ = CH₃, R₂ = OCH₃, R₃ = CH₃;
 (183g), 79%: R₁ = CH₃, R₂ = OCH₃, R₃ = OCH₃; (183h), 78%: R₁ = CH₃, R₂ = H, R₃ = OCH₃;
 (183i), 83%: R₁ = CH₃, R₂ = CH₃, R₃ = OCH₃; (183j), 87%: R₁ = Ph, R₂ = H, R₃ = H;
 (183k), 85%: R₁ = Ph, R₂ = CH₃, R₃ = H; (183l), 82%: R₁ = Ph, R₂ = H, R₃ = CH₃;
 (183m), 80%: R₁ = Ph, R₂ = CH₃, R₃ = CH₃; (183n), 83%: R₁ = Ph, R₂ = OCH₃, R₃ = H;
 (183o), 80%: R₁ = Ph, R₂ = OCH₃, R₃ = CH₃; (183p), 77%: R₁ = Ph, R₂ = OCH₃, R₃ = OCH₃;
 (183q), 86%: R₁ = Ph, R₂ = H, R₃ = OCH₃; (183r), 81%: R₁ = Ph, R₂ = CH₃, R₃ = OCH₃

Схема 32. Синтез 2*R*,6*R'*-(5-*X*-2-оксо-1,2-дигидро-3*H*-индол-3-илиден)хинолин-4-карбоксихидразидов (**183a–o**).

N-АЦИЛГИДРАЗОНЫ С ПЕСТИЦИДНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Помимо проявления различных видов фармакологической активности, гидразоны широко используются в сельском хозяйстве с целью обеспечения защиты растений от насекомых-вредителей, грибов-паразитов и др.

Термин “пестицид” охватывает широкий спектр соединений, включая инсектициды, фунгициды, гербициды, родентициды, моллюскоциды, нематоциды, регуляторы роста растений. Среди них хлорорганические инсектициды, успешно используемые для борьбы с рядом заболеваний, таких как малярия и тиф, были запрещены или ограничены в применении после 1960-х гг. в большинстве технологически развитых стран. Внедрение фосфорорганических инсектицидов в 1960-х, карбаматов в 1970-х и пиретроидов в 1980-х, а также гербицидов и фунгицидов в 1970–1980-х гг. в значительной степени способствовало борьбе с вредителями в сельско-

хозяйственном производстве [96]. Длительное использование инсектицидов вызывает резистентность вредителей к ним, поэтому поиск новых соединений, обладающих инсектицидной активностью, актуален для развития сельскохозяйственной отрасли.

Был предложен и синтезирован ряд производных диенегидразида (**184–191**) (схема 33) на основе пиперина для использования в качестве инсектицидов против комара обыкновенного *Culex pipiens* [97]. Инсектицидная активность соединений (**184–191**) была испытана против личинок *C. pipiens* в диапазоне концентраций 0.1–1.2 мг/мл. Конечная смертность при концентрации 0.75 мг/мл после 48 ч обработки варьировала в диапазоне 80.00–83.33%, а значения LC₅₀ составляли 0.221–0.094 мг/мл. В итоге эти соединения продемонстрировали более высокую ларвицидную (против личинок и гусениц насекомых) активность, чем пиперин и дельтаметрин.

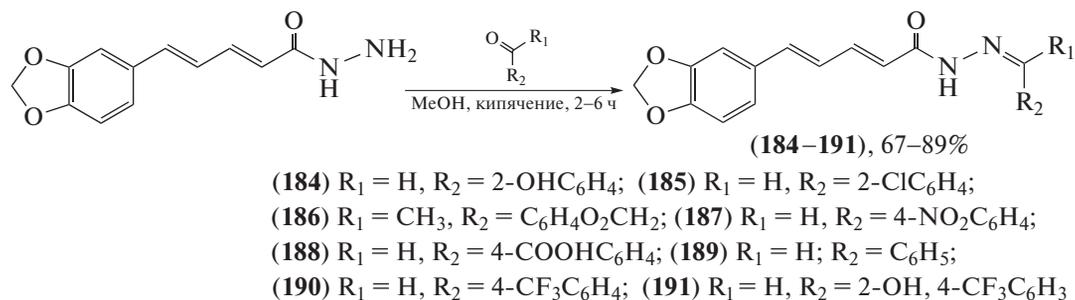
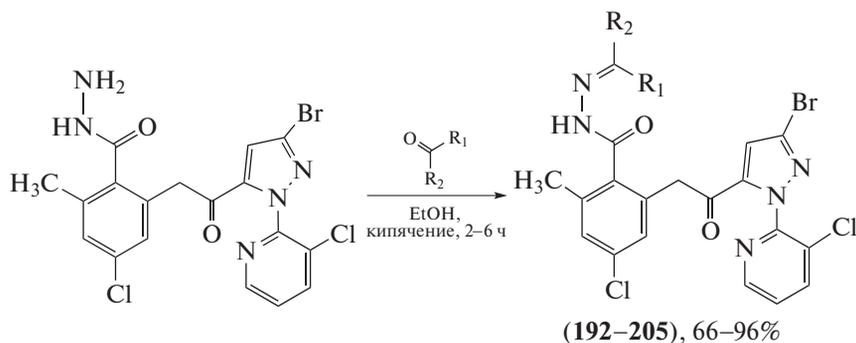


Схема 33. Синтез ряда производных диенегидразида (184–191).

Производные пиразола и гидразона обладают высокой инсектицидной активностью, их структурные единицы широко используются при разработке пестицидов. В попытке создать новые молекулы с высокой инсектицидной активностью был синтезирован (схема 34) и подвергнут биологическому анализу ряд производных пиразоламида, содержащих гидразоновые фрагменты [98]. Тесты *in vivo* показали, что некоторые из соединений (192–205) обладают высокой активностью против капустной моли (*Plutella xylostella*), хлопковой совки (*Helicoverpa armigera*), комара обыкновенного (*Culex*

pipiens pallens), мелкого муравья (*Laemodonta exigua*), азиатской хлопковой совки (*Spodoptera litura*), бурой рисовой цикадки (*Nilaparvata lugens*) и тли кукурузного листа (*Rhopalosiphum maidis*). Конъюгат (198) проявлял 100%-ную активность против *H. armigera* в концентрации 25 мг/л. Соединения, содержащие фрагменты алкена (203), пиррола (204) и пиридина (205), полностью уничтожали *C. pipiens pallens* в концентрации 0.5 мг/л. Ацилгидразон (199) проявил 100%-ную активность против *L. exigua* (200 мг/л), а соединения (196–198) полностью подавляли *S. litura* в концентрации 20 мг/л.



- (192) $R_1 = CH_3, R_2 = CH_3$; (193) $R_1 = H, R_2 = CH_2CH_2CH_3$;
 (194) $R_1 = CH_3, R_2 = CH_2CH_3$; (195) $R_1 = H, R_2 = CH_2CH(CH_3)_2$;
 (196) $R_1 = H, R_2 = CH(CH_3)_2$; (197) $R_1 = H, R_2 = CH_2CH_3$;
 (198) $R_1 = H, R_2 = N(CH_3)_2$; (199) $R_1 = CH_3, R_2 = CH_2CH_2CH_3$;
 (200) $R_1 = H, R_2 = C_4H_9O$; (201) $R_1 = H, R_2 = CH=CH_2$;
 (202) $R_1 = H, R_2 = C_4H_9S$; (203) $R_1 = H, R_2 = C_4H_9N$;
 (204) $R_1 = H, R_2 = C_4H_9NH$; (205) $R_1 = H, R_2 = C_5H_9N$

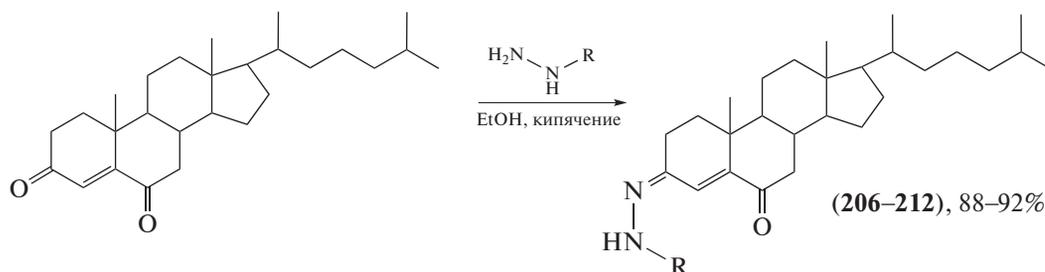
Схема 34. Синтез ряда производных пиразоламида, содержащих гидразоновые фрагменты.

Восточная луговая совка (*Mythimna separata*) — вид бабочек из семейства совок, гусеницы которых — опасные вредители в сельском хозяйстве: они повреждают овес, пшеницу, ячмень, озимую рожь, кукурузу, сою, кормовые травы, режу рис, зерновое сорго. Были синтезированы [99–102] новые гидразоны, перспективные пестицидные агенты против *M. separata* на основе холестерина (206–

212) (схема 35), пиперина (213–217) (схема 36) и лигнанового подофиллотоксина (218–221) (схема 37). Сделаны предположения о взаимосвязи “структура — инсектицидная активность”: все производные (206–212) проявляли более высокую инсектицидную активность, чем их предшественник холестерин. Это может послужить основой для дальнейшей структурной модифика-

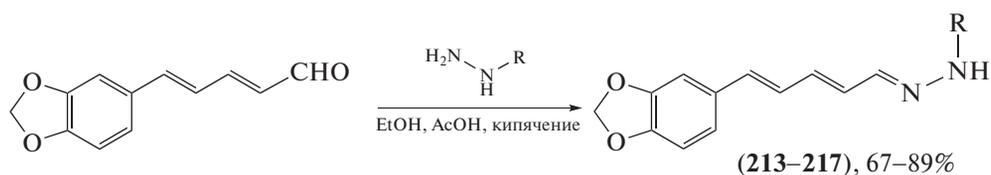
ции и развития холестерина как инсектицидного агента. Введение заместителей в положение С-2 фенильного кольца производных гидразона (213–217) имеет большее значение для проявления инсектицидной активности, а введение в положение С-9 подофиллотоксина гидразидов, содержащих различные гетероциклы, необходимо для получе-

ния гидразонов в качестве инсектицидных агентов. Некоторые производные проявляли более выраженную инсектицидную активность в концентрации 1 мг/мл по сравнению с тоосенданином, коммерческим ботаническим (полученным из растений) инсектицидом, выделенным из *Melia azedarach*.



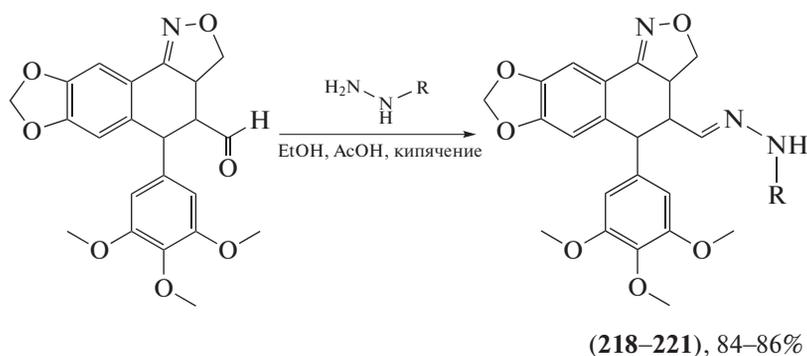
- (206) R = C₆H₅C=O; (207) R = CNCH₂C=O;
 (208) R = 4-CH₃C₆H₄C=O; (209) R = 2,4-NO₂C₆H₃;
 (210) R = 4-NO₂C₆H₄; (211) R = C₄H₃SC=O;
 (212) R = 3-CH₃C₆H₄C=O

Схема 35. Синтез гидразонов на основе холестерина.



- (213) R = 4-NO₂C₆H₄; (214) R = 2-NO₂C₆H₄;
 (215) R = 3-CH₃C₆H₃C=O; (216) R = 4-FC₆H₃C=O;
 (217) R = 2-ClC₆H₃C=O

Схема 36. Синтез гидразонов на основе пиперина.



- (218) R = SO₂-2-BrC₆H₄; (219) R = SO₂-4-NO₂C₆H₃C=O;
 (220) R = C₄H₃SC=O; (221) R = 5-ClC₄H₂SC=O

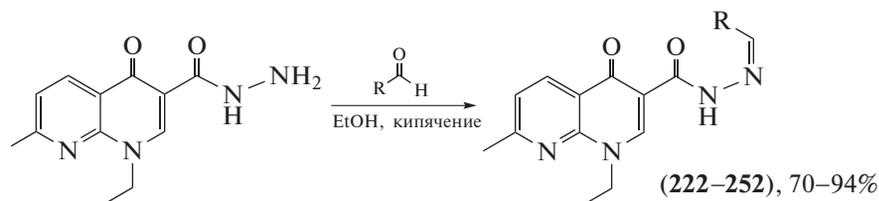
Схема 37. Синтез гидразонов на основе лигнанового подофиллотоксина.

Ряд замещенных гидразонов (222–252) был синтезирован (схема 38) из гидразида налидиксовой кислоты [103]. Эти соединения оценивали на пред-

мет различной биологической активности – фунгицидной и инсектицидной. Фунгицидную активность определяли для пяти видов патогенных гри-

бов (*Rhizoctonia bataticola*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* и *Alternaria porii*). Ацилгидразоны показали максимальное ингибирование *A. porii* ($ED_{50} = 34.2-151.3$ мкг/мл). Активность была сопоставима с таковой для коммерческого фунгицида гексаконазола ($ED_{50} = 25.4$ мкг/мл). Соединения также тестировали на инсектицидную

активность против личинок третьего поколения азиатской хлопковой совки (*Spodoptera litura*) и взрослых особей четырехпятнистой зерновки (*Callosobruchus maculatus*) и хрущака малого булавоусого (*Tribolium castaneum*). При применении большинства исследуемых соединений смертность *S. litura* достигала 70–100% при введении в дозе 0.1%.

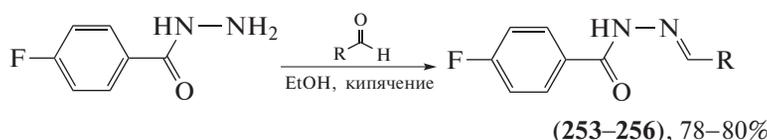


- (222) R = 2-FC₆H₄; (223) R = 4-FC₆H₄; (224) R = 3-BrC₆H₄;
 (225) R = 2-ClC₆H₄; (226) R = 3-ClC₆H₄;
 (227) R = 4-ClC₆H₄; (228) R = 2-NO₂C₆H₄;
 (229) R = 3-NO₂C₆H₄; (230) R = 4-NO₂C₆H₄;
 (231) R = 4-OHC₆H₄; (232) R = 3-OCH₃C₆H₄;
 (233) R = 4-OCH₃C₆H₄; (234) R = 2-CH₃C₆H₄;
 (235) R = 3-CH₃C₆H₄; (236) R = 4-CH₃C₆H₄;
 (237) R = 4-CH(CH₃)₂C₆H₄; (238) R = 2,4-ClC₆H₃;
 (239) R = 2,6-ClC₆H₃; (240) R = 2,4-OHC₆H₃;
 (241) R = 2,4-OCH₃C₆H₃; (242) R = 3,4-OCH₃C₆H₃;
 (243) R = 3-OCH₃, 4-OHC₆H₃; (244) R = 3-OC₂H₅, 4-OHC₆H₃;
 (245) R = 3,4,5-OCH₃C₆H₂; (246) R = 2-пиридил; (247) R = 1-нафтил; (248) R = 2-нафтил;
 (249) R = 9-антрил; (250) R = циклогексил; (251) R = адмантил; (252) R = кротонил

Схема 38. Синтез ряда замещенных гидразонов (222–252) из гидразида налидиксовой кислоты.

Галогенсодержащие гидразоны проявляют высокую инсектицидную активность. Так, синтезирован ряд *N*-ацилгидразонов (253–256) [104] на основе гидразида 4-фторбензойной кислоты и бензальдегида или его Br-, F- и OH-замещенных производных (схема 39). Исследованы репеллентные и ларвицидные свойства галогенсодержащих гидразонов (253–256) против комара желтолихорадочного (*Aedes aegypti*). Соединение (255) про-

явило самую высокую репеллентную активность (BDI (индекс сдерживания укусов) = 1.025). В ларвицидных крининговых биотестах ацилгидразоны (253–256) вызывали 100%-ную смертность личинок комара при самой низкой скрининговой дозе 0.01%. Инсектицидная и репеллентная активность коррелировали с присутствием атома галогена в фенильном заместителе гидразоновой части.

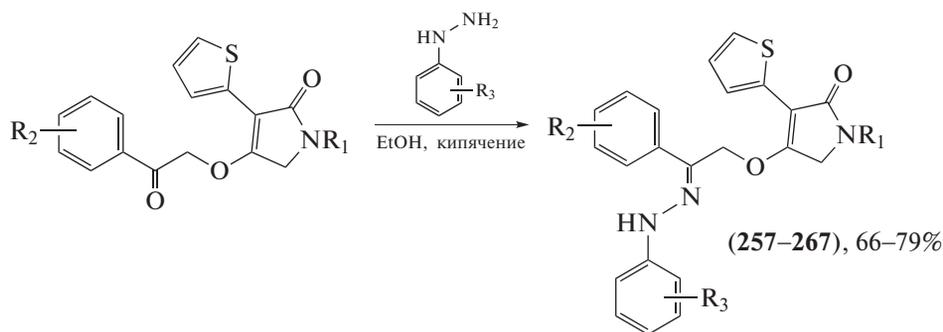


- (253) R = 4-BrC₆H₄; (254) R = C₆H₅;
 (255) R = 3-FC₆H₄; (256) R = 2-OHC₆H₄

Схема 39. Синтез ряда *N*-ацилгидразонов (253–256) на основе гидразида 4-фторбензойной кислоты и бензальдегида или его Br-, F- и OH-замещенных производных.

Фунгициды используются в сельском хозяйстве и способны полностью или частично подавлять рост болезнетворных паразитарных грибов. Было обнаружено, что тетрамовая кислота, производные тиофена и гидразона проявляют высокую фунгицидную активность. С целью создания новых молекул-матриц с высокой противогрибковой активностью была синтезирована и испытана серия новых производных 3-(тиофен-2-ил)-1,5-дигидро-2*H*-пиррол-2-она (257–267) (схема 40),

содержащих гидразоновую группу, на противогрибковую активность против *Fusarium graminearum*, *Rhizoctoria solani*, *Botrytis cinerea* и *Colletotrichum capsici in vitro* [105–109]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что производные 3-(тиофен-2-ил)-1,5-дигидро-2*H*-пиррол-2-она (257–267), содержащие гидразоновую группу, могут служить потенциальными структурными матрицами в поисках новых и высокоэффективных фунгицидов.



- (257) R₁ = H, R₂ = 4-CH₃, R₃ = 2-F; (258) R₁ = H, R₂ = 4-CH₃, R₃ = 2-Cl;
 (259) R₁ = H, R₂ = 4-CH₃, R₃ = 3-Cl; (260) R₁ = H, R₂ = 4-CH₃, R₃ = 4-F;
 (261) R₁ = H, R₂ = 4-CH₃, R₃ = 4-Cl; (262) R₁ = H, R₂ = 4-CH₃, R₃ = 4-Br;
 (263) R₁ = H, R₂ = 2-Cl, R₃ = 4-F; (264) R₁ = H, R₂ = 3-Cl, R₃ = 4-F;
 (265) R₁ = H, R₂ = 4-F, R₃ = 4-F; (266) R₁ = H, R₂ = 4-Cl, R₃ = 4-F;
 (267) R₁ = CH₃, R₂ = 4-OCH₃, R₃ = 4-F

Схема 40. Синтез серии новых производных 3-(тиофен-2-ил)-1,5-дигидро-2*H*-пиррол-2-она.

В основе создания новых противогрибковых препаратов лежит поиск соединений – ингибиторов хитинсинтазы, т.к. хитин – структурный компонент грибковых клеточных стенок, отсутствующий у позвоночных. Синтезирован ряд соединений (268–277) (схема 41), которые проявляли противогрибковую активность против грибов-паразитов в сельском хозяйстве: *Fusarium graminearum*, *Botrytis cinerea* и *Colletotrichum lagenarium*

[110–112]. Наиболее мощное из них – соединение (274) – продемонстрировало высокую ингибирующую активность по отношению к хитинсинтазе (IC₅₀ = 64.5 мкМ).

Гидразоны (278–280) (рис. 10) [113–115] также проявляют фунгицидную активность, вызывающую 2–3-кратное подавление развития *Fusarium sporotrichiella* var. *poae*.

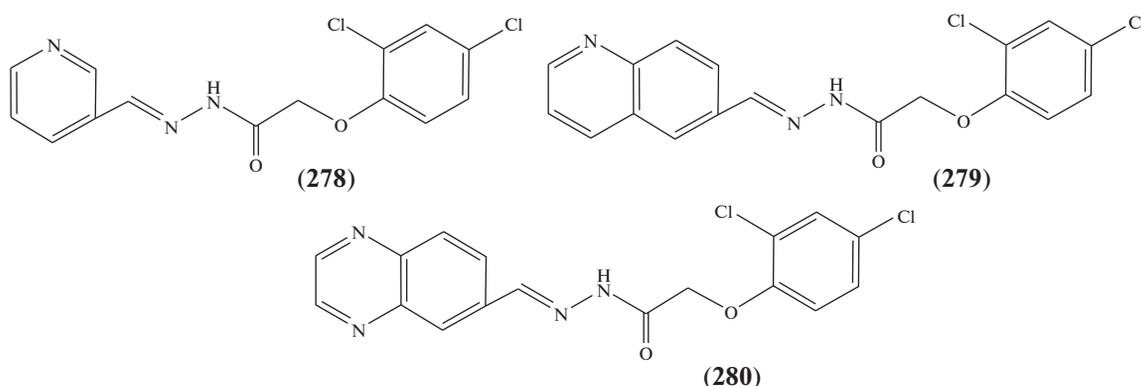
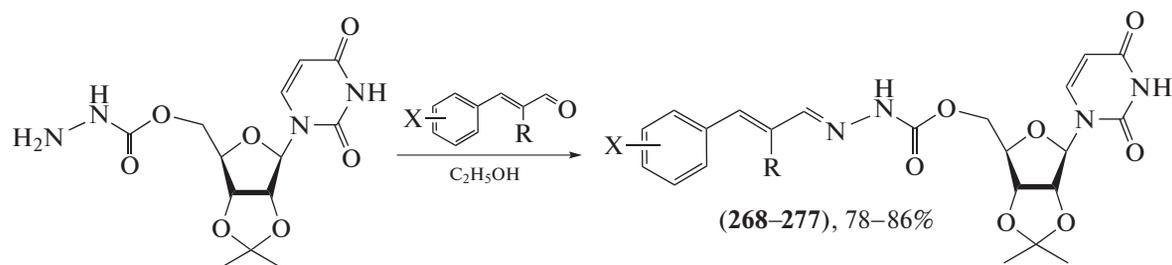


Рис. 10. *N*-Ацилгидразоны на основе 2-(2,4-дихлорофенилокси)ацетогидразида (278–280).



- (268) X = H, R = CH₃; (269) X = H, R = (CH₂)₃H; (270) X = H, R = (CH₂)₄H;
 (271) X = H, R = (CH₂)₅H; (272) X = H, R = (CH₂)₇H;
 (273) X = H, R = (CH₂)₉H; (274) X = 2-F, R = (CH₂)₅H;
 (275) X = 4-Cl, R = (CH₂)₅H; (276) X = 2-Br, R = (CH₂)₅H; (277) X = 4-CH₃, R = (CH₂)₅H

Схема 41. Синтез ряда ацилгидразоновых соединений, проявляющих противогрибковую активность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотрены примеры синтеза *N*-ацилгидразонов различного строения на основе природных и синтетических соединений и исследований их биологических свойств. Отмечено, что наиболее широко применяемый метод их получения – конденсация карбонильных соединений (альдегидов и кетонов) с соответствующими гидразидами органических кислот различной природы. Показано, что *N*-ацилгидразоны обладают широким спектром фармакологических свойств (противотуберкулезное, антибактериальное, противомикробное, противовирусное, противовоспалительное, противоопухолевое действие) и пестицидной активностью, что открывает перспективы их использования в медицине для создания лекарственных препаратов, а также в сельском хозяйстве для разработки пестицидов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке программы РАН “Фундаментальные основы химии”, тема № 8 “Хемо-, регио- и стереоселективные превращения терпеноидов, стероидов и липидов в направленном синтезе низкомолекулярных биорегуляторов” (№ госрегистрации АААА-А20-120012090023-8).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Нуркенов О.А., Сампаева Ж.Б., Кулаков И.В., Ахметова С.Б., Жаугашева С.К. // Журн. общ. химии. 2012. Т. 82. С. 582–585.
<https://doi.org/10.1134/S107036321204010X>
2. Колотова Н.В., Старкова А.В., Чащина С.В. // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. 2016. № 3(13). С. 15–23.
3. Smith M.B., Jerry M. // March's Advanced Organic Chemistry, 6th edition. John Wiley & Sons, Milton, Australia, 2007.
4. Lazny R., Nodzevska A. // Chem. Rev. 2010. V. 110. P. 1386–1434.
<https://doi.org/10.1021/cr900067y>
5. Belkheiri N., Bouguerne B., Bedos-Belval F., Duran H., Bernis C., Salvayre R., Nègre-Salvayre A., Baltas M. // Eur. J. Med. Chem. 2010. V. 45. P. 3019–3026.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.03.031>
6. Radwan M.A., Ragab E.A., Sabry N.M., El-Shenawy S.M. // Bioorg. Med. Chem. 2007. V. 15. P. 3832–3841.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.03.024>
7. Almasirad A., Tajik M., Bakhtiari D., Shafiee A., Abdollahi M., Zamani M.J., Khorasani R., Esmaily H. // J. Pharm. Pharm. Sci. 2005. V. 8. P. 419–425.
8. Sridhar S.K., Pandeya S.N., Stables J.P., Ramesh A. // Eur. J. Pharm. Sci. 2002. V. 16. P. 129–132.
[https://doi.org/10.1016/s0928-0987\(02\)00077-5](https://doi.org/10.1016/s0928-0987(02)00077-5)
9. Kaushik D., Khan S.A., Chawla G., Kumar S. // Eur. J. Med. Chem. 2010. V. 45. P. 3943–3949.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.05.049>
10. Duarte C.D., Barreiro E.J., Fraga C.A. // Mini Rev. Med. Chem. 2007. V. 7. P. 1108–1119.
<https://doi.org/10.2174/138955707782331722>
11. Salgin-Gökşen U., Gökhan-Kelekçi N., Göktaş O., Köysal Y., Kiliç E., Işık S., Aktay G., Ozalp M. // Bioorg. Med. Chem. 2007. V. 15. P. 5738–5751.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.06.006>

12. Deeb A., El-Mariah F., Hosny M. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2004. V. 4. P. 5013–5017. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.06.102>
13. Rasras A.J.M., Al-Tel T.H., Al-Aboudi A.F., Al-Qawas-meh R.A. // Eur. J. Med. Chem. 2010. V. 45. P. 2307–2313. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.02.006>
14. Ozkay Y., Tunalı Y., Karaca H., İşikdağ I. // Eur. J. Med. Chem. 2010. V. 45. P. 3293–3298. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.04.012>
15. Kumar D., Maruthi Kumar N., Ghosh S., Shah K. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2012. V. 22. P. 212–215. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.11.031>
16. Effenberger K., Breyer S., Schobert R. // Eur. J. Med. Chem. 2010. V. 45. P. 1947–1954. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.01.037>
17. Jordão A.K., Sathler P.C., Ferreira V.F., Campos V.R., de Souza M.C., Castro H.C., Lannes A., Lourenco A., Rodrigues C.R., Bello M.L., Lourenco M.C., Carvalho G.S., Almeida M.C., Cunha A.C. // Bioorg. Med. Chem. 2011. V. 19. P. 5605–5611. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.07.035>
18. Mahajan A., Kremer L., Louw S., Guérardel Y., Chibale K., Biot C. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2011. V. 21. P. 2866–2868. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.03.082>
19. Зеленин К.Н. // Соросовский образовательный журнал. 1998. Т. 42. № 5. С. 59–65.
20. Stoica A.-I., Vinas C., Texidor F. // Chem. Commun. 2008. V. 48. P. 6492–6494. <https://doi.org/10.1039/B813285B>
21. Rollas S., Küçükgülzel Ş.G. // Molecules. 2007. V. 12. P. 1910–1939. <https://doi.org/10.3390/12081910>
22. Dogan H.N., Duran A., Rollas S., Şener G., Armutak Y., Keyer-Uysal M. // Med. Sci. Res. 1998. V. 26. P. 755–758.
23. Kalsi R., Shrimali M., Bhalla T.N., Barthwal J.P. // Indian J. Pharm. Sci. 2006. V. 41. P. 353–359.
24. Mohareb R.M., Fleita D.H., Sakka O.K. // Molecules. 2011. V. 16. P. 16–27. <https://doi.org/10.3390/molecules16010016>
25. Popiołek Ł., Biernasiuk A., Malm A. // Phosphorus Sulfur. 2015. V. 190. P. 251–260. <https://doi.org/10.1080/10426507.2014.919293>
26. Popiołek Ł., Stefańska J., Kiełczykowska M., Musik I., Biernasiuk A., Malm A., Wujec M. // J. Heterocycl. Chem. 2016. V. 53. P. 393–402. <https://doi.org/10.1002/jhet.2418>
27. Popiołek Ł., Biernasiuk A., Malm A. // J. Heterocycl. Chem. 2016. V. 53. P. 479–486. <https://doi.org/10.1002/jhet.2429>
28. Bala S., Uppal G., Kajal A., Kamboj S., Sharma V. // Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 2013. V. 18. P. 65–74.
29. Popiołek Ł., Biernasiuk A., Malm A. // Phosphorus Sulfur. 2015. V. 190. P. 251–260. <https://doi.org/10.1080/10426507.2014.919293>
30. Gawrońska-Grzywacz M., Popiołek Ł., Natarska-Chomiczka D., Piątkowska-Chmiel I., Izdebska M., Herbet M., Wujec M. // Oncology Rep. 2019. V. 41. P. 693–701. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6800>
31. Popiołek Ł., Biernasiuk A. // J. Enzym. Inhib. Med. Chem. 2016. V. 31. P. 62–69. <https://doi.org/10.3109/14756366.2016.1170012>
32. Popiołek Ł., Biernasiuk A. // Chem. Biol. Drug Des. 2016. V. 88. P. 873–883. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12820>
33. Муковоз П.П., Козьминых В.О. // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. 2013. № 2. С. 88–101.
34. Тарадейко Т.И., Галашева С.Н., Кутькина Д.Н., Шенникова О.Б., Иозеп А.А. // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2018. № 2. С. 86–90.
35. Губаева Р.А., Шабалина Ю.В., Халиуллин Ф.А. // Башкирский химический журнал. 2011. Т. 18. С. 109–110.
36. Мясоедова Ю.В., Беляева Э.Р., Гарифуллина Л.Р., Просвирнина Д.А., Ишмуратов Г.Ю. // Журн. общ. химии. 2022. Т. 51. С. 96–101. <https://doi.org/10.31857/S0514749222010104>
37. Кутаев Ю.П., Бузыкин Б.И. // Гидразоны. Москва: Наука, 1974. 416 с.
38. Verma G., Marella A., Shaquiquzzaman M., Akhtar M., Ali M.R., Alam M.M. // J. Pharm. BioAllied Sci. 2014. V. 6. P. 69–80. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.129170>
39. Колено Д.И. // Наука и современность. Химические науки. 2012. № 17. С. 241–244.
40. Zhao Z.X., Cheng L.P., Pang W. // Tetrahedron Lett. 2018. V. 59. P. 2079–2081. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.04.047>
41. Jordão A.K., Sathler P.C., Ferreira V.F., Campos V.R., de Souza M.C., Castro H.C., Lannes A., Lourenco A., Rodrigues C.R., Bello M.L., Lourenco M.C., Carvalho G.S., Almeida M.C., Cunha A.C. // Bioorg. Med. Chem. 2011. V. 19. P. 5605–5611. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.07.035>
42. Bedia K.K., Elçin O., Seda U., Fatma K., Nathaly S., Sevim R., Dimoglo A.S. // Eur. J. Med. Chem. 2006. № 41. P. 1253–1261. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.06.009>
43. Camus J.C., Pryor M.J., Médigue C., Cole S.T. // Microbiology. 2002. V. 148. P. 2967–2973. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-10-2967>
44. Казунин М.С., Приймченко Б.А. // Актуальные проблемы медицины. 2013. Т. 25. № 24. С. 226–231.
45. Hernández P., Rojas R., Gilman R.H., Sauvain M., Lima L.M., Barreiro E.J., González M., Cerecetto H. // Eur. J. Med. Chem. 2013. V. 59. P. 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.10.047>
46. Vergara F.M., Lima C.H., Henriques M., Candéa A.L., Lourenço M.C., Ferreira M. de L., Kaiser C.R., de Souza M.V. // Eur. J. Med. Chem. 2009. V. 44. P. 4954–4959. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.08.009>
47. Rivers E.C., Mancera R.L. // Drug Discov. Today. 2008. V. 13. P. 1090–1098. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.09.004>
48. Barry P.J., O'Connor T.M. // Curr. Med. Chem. 2007. V. 14. P. 2000–2008. <https://doi.org/10.2174/092986707781368496>
49. Boogaard J., Kibiki G.S., Kisanga E.R., Boeree M.J., Aarnoutse R.E. // Antimicrob. Agents Chemother.

2009. V. 53. P. 849–862.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00749-08>
50. Ludwig B.S., Correia D.G., Kühn F.E. // *Coord. Chem. Rev.* 2019. V. 396. P. 22–48.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.06.004>
51. Hillard E., Vessières A., Thouin L., Jaouen G., Amatore C. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2006. V. 45. P. 285–290.
<https://doi.org/10.1002/anie.200502925>
52. Payen O., Top S., Vessières A., Brulé E., Plamont M.A., McGlinchey M.J., Müller-Bunz H., Jaouen G. // *J. Med. Chem.* 2008. V. 51. P. 1791–1799.
<https://doi.org/10.1021/jm701264d>
53. Dubar F., Anquetin G., Pradines B., Khalife J., Biot C. // *J. Med. Chem.* 2009. V. 52. P. 7954–7957.
<https://doi.org/10.1021/jm901357n>
54. Biot C., Daher W., Chavain N. // *J. Med. Chem.* 2006. V. 49. P. 2845–2849.
<https://doi.org/10.1021/jm0601856>
55. Blackie M.A., Beagley P., Croft S.L., Kendrick H., Moss J.R., Chibale K. // *Bioorg. Med. Chem.* 2007. V. 20. P. 6510–6516.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.07.012>
56. Biot C., François N., Maciejewski L., Brocard J., Poulain D. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2000. V. 10. P. 839–841.
[https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(00\)00120-7](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(00)00120-7)
57. Baramee A., Coppin A., Mortuaire M., Pelinski L., Tomavo S., Brocard J. // *Bioorg. Med. Chem.* 2006. V. 14. P. 1294–1302.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.09.054>
58. Higgins P.J., Gellert A.M. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009. V. 19. P. 1614–1617.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.02.023>
59. Magueue G.M., Jakhlal J., Ladyman M., Vallin A., Ralambomanana D.A., Bousquet T., Maugein J., Lebibi J., Péliniski L. // *Eur. J. Med. Chem.* 2011. V. 46. P. 31–38.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.10.004>
60. Катаев В.Е., Милицина О.И., Стробыкина И.Ю., Ковыляева Г.И., Мусин Р.З., Федорова О.В., Русинов Г.Л., Зуева М.Н., Мордовской Г.Г., Толстиков А.Г. // *Хим.-фарм. журнал.* 2006. Т. 40. № 9. С. 12–27.
61. Андреева О.В., Шарипова Р.Р., Стробыкина И.Ю., Лодочникова О.А., Добрынин А.Б., Бабаев В.М., Честнова Р.В., Миронов В.Ф., Катаев В.Е. // *Журн. общ. химии.* 2011. Т. 81. № 8. С. 1298–1305.
62. Lin H., Doebelin C., Patouret R., Garcia-Ordonez R., Chang M., Dharmarajan V., Bayona C., Cameron M., Griffin P., Kamenecka T. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2018. V. 28. P. 1313–1319.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.03.019>
63. Kumar P., Narasimhan B., Sharma D., Judge V., Narang R. // *Eur. J. Med. Chem.* 2009. V. 44. P. 1853–1863.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.10.034>
64. Власова Н.А., Курбатов Е.Р., Коркодинова Л.М., Одегова Т.Ф., Визгунова О.Л. // *Вестн. Воронеж. гос. ун-та. Серия: Химия. Биология. Фармация.* 2013. № 2. С. 27–30.
65. Шматкова Н.В., Сейфуллина И.И., Зинченко О.Ю., Линенко И.С. // *Вісник Одеського національного університету. Хімія.* 2016. Т. 21. № 1. С. 36–49.
66. He J.B., Feng L.L., Li J., Tao R.J., Ren Y.L., Wan J., He H.W. // *Bioorg. Med. Chem.* 2014. V. 22. P. 89–94.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.11.051>
67. He H., Xia H., Xia Q., Ren Y., He H. // *Bioorg. Med. Chem.* 2017. V. 25. P. 5652–5661.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.08.038>
68. Morjan R.Y., Mkhadmeh A.M., Beadham I., Elmanama A.A., Mattar M.R., Raftery J., Pritchard R.G., Awadallah A.M., Gardiner J.M. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014. V. 24. P. 5796–5800.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.10.029>
69. Sarshira E.M., Hamada N.M., Moghazi Y.M., Abdelrahman M.M. // *J. Heterocycl. Chem.* 2016. V. 53. P. 1970–1982.
<https://doi.org/10.1002/JHET.2516>
70. Plech T., Paneth A., Kaproni B., Kosikowska U., Malm A., Strzelczyk A., Stączek P. // *Chem. Biol. Drug Des.* 2015. V. 85. P. 315–325.
<https://doi.org/10.1111/cbdd.12392>
71. El-Mahdy K., El-Kazak A., Abdel-Megid M., Seada M., Farouk O. // *Acta Chim. Slov.* 2016. V. 63. P. 18–25.
<https://doi.org/10.17344/acsi.2015.1555>
72. Alam M.S., Liu L., Lee Y.E., Lee D.U. // *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 2011. V. 59. P. 568–573.
<https://doi.org/10.1248/cpb.59.568>
73. Zhao Z.X., Cheng L.P., Li M., Pang W., Wu F.H. // *Eur. J. Med. Chem.* 2019. V. 173. P. 305–313.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.04.006>
74. Jin Y., Tan Z., He M., Tian B., Tang S., Hewlett I., Yang M. // *Bioorg. Med. Chem.* 2010. V. 18. P. 2135–2140.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.02.003>
75. Tian B., He M., Tang S., Hewlett I., Tan Z., Li J., Jin Y., Yang M. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009. V. 19. P. 2162–2167.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.02.116>
76. Che Z.P., Tian Y., Liu S.M., Chen G.Q. // *Brazil. J. Pharm. Sci.* 2018. V. 54. P. e17543.
<https://doi.org/10.1590/s2175-97902018000417543>
77. Vicini P., Incerti M., La Colla P., Loddo R. // *Eur. J. Med. Chem.* 2009. V. 44. P. 1801–1807.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.05.030>
78. Ammal P.R., Prasad A.R., Joseph A. // *Heliyon.* 2020. V. 6. P. e05144.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05144>
79. McNulty J., Babu Dokuburra C., D'Aiuto L., Demers M., McClain L., Piazza P., Williamson K., Zheng W., Nimgaonkar V.L. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2020. V. 30. P. 127559.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127559>
80. Карасёва Г.А. // *Медицинские новости.* 2012. № 8. С. 697–702.
81. da Silva Y.K., Augusto C.V., de Castro Barbosa M.L., de Albuquerque Melo G.M., de Queiroz A.C., de Lima Matos Freire Dias T., Júnior W.B., Barreiro E.J., Lima L.M., Alexandre-Moreira M.S. // *Bioorg. Med. Chem.* 2010. V. 18. P. 5007–5015.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.06.002>
82. Hernández P., Cabrera M., Lavaggi M.L., Celano L., Tiscornia I., Rodrigues da Costa T., Thomson L., Bollati-Fogolin M., Miranda A.L., Lima L.M., Barreiro E.J., González M., Cerecetto H. // *Bioorg. Med. Chem.*

2012. V. 20. P. 2158–2171.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.01.034>
83. *Meira C.S., Dos Santos Filho J.M., Sousa C.C., Anjos P.S., Cerqueira J.V., Dias Neto H.A., da Silveira R.G., Russo H.M., Wolfender J.L., Queiroz E.F., Moreira D.R.M., Soares M.B.P.* // *Bioorg. Med. Chem.* 2018. V. 26. P. 1971–1985.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.02.047>
84. *Назаров М.А., Жикина Л.А., Толмачева И.А., Гришко В.В.* // *Башкирский хим. журн.* 2017. Т. 24. № 4. С. 28–32.
85. *Moraes A.D.T.O., Miranda M.D.S., Jacob Í.T.T., Amorim C.A.D.C., Moura R.O., Silva S.Â.S.D., Soares M.B.P., Almeida S.M.V., Souza T.R.C.L., Oliveira J.F., Silva T.G.D., Melo C.M.L., Moreira D.R.M., Lima M.D.C.A.* // *Bioorg. Med. Chem.* 2018. V. 26. P. 5388–5396.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.07.024>
86. *Zhang B., Zhao Y.F., Zhai X., Fan W.J., Ren J.L., Wu C.F., Gong P.* // *Chem. Pharm. Bull.* 2012. V. 60. P. 1046–1054.
<https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2012.06.009>
87. *Demurtas M., Baldisserotto A., Lampronti I., Moi D., Balboni G., Pacifico S., Vertuani S., Manfredini S., Onnis V.* // *Bioorg. Chem.* 2019. V. 85. P. 568–576.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.02.007>
88. *Yu X., Shi L., Ke S.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2015. V. 25. P. 5772–5776.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.10.069>
89. *Li Y., Yan W., Yang J., Yang Z., Hu M., Bai P., Tang M., Chen L.* // *Eur. J. Med. Chem.* 2018. V. 152. P. 516–526.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.05.003>
90. *Sun K., Peng J.D., Suo F.Z., Zhang T., Fu Y.D., Zheng Y.C., Liu H.M.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2017. V. 27. P. 5036–5039.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.10.003>
91. *Солдатенков А.Т., Колядина Н.М., Шендрик И.В.* // *Основы органической химии лекарственных веществ.* Москва: Химия, 2001.
92. *Машковский М.Д.* // *Лекарственные средства.* Медицина: Москва, 1978. Т. 2.
93. *Кашаев А.Г., Зимичев А.В., Миронов М.С.* // *Башкирский хим. журн.* 2009. Т. 16. № 3. С. 65–66.
94. *Cui Z., Li Y., Ling Y., Huang J., Cui J., Wang R., Yang X.* // *Eur. J. Med. Chem.* 2010. V. 45. P. 5576–5584.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.09.007>
95. *Congiu C., Onnis V.* // *Bioorg. Med. Chem.* 2013. V. 21. P. 6592–6599.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.08.026>
96. *Aktar M., Sengupta D., Chowdhury A.* // *Interdiscip. Toxicol.* 2009. V. 2. P. 1–12.
<https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
97. *Tantawy A.H., Farag S.M., Hegazy L., Jiang H., Wang M.Q.* // *Bioorg. Chem.* 2020. V. 94. P. 1034–1064.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103464>
98. *Wu J., Song B.A., Hu D.Y., Yue M., Yang S.* // *Pest. Manag. Sci.* 2012. P. 801–810.
<https://doi.org/10.1002/ps.2329>
99. *Huang J., Lv M., Thapa S., Xu H.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2018. V. 28. P. 1753–1757.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.04.029>
100. *Yang C., Shao Y., Zhi X., Huan Q., Yu X., Yao X., Xu H.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013. V. 23. P. 4806–4812.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.06.099>
101. *Qua H., Yu X., Zhi X., Lv M., Xu H.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013. V. 23. P. 5552–5557.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.08.053>
102. *Wang Y., Yu X., Zhi X., Xiao X., Yang C., Xu H.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014. V. 24. P. 2621–2624.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.04.074>
103. *Aggarwal N., Kumar R., Srivastva C., Dureja P., Khurana J.M.* // *J. Agric. Food Chem.* 2010. V. 58. P. 3056–3061.
<https://doi.org/10.1021/jf904144e>
104. *Tabanca N., Ali A., Bernier U.R., Khan I.A., Kocyigit-Kaymakcioglu B., Oruc-Emre E.E., Unsalan S., Rol-las S.* // *Pest. Manag. Sci.* 2013. V. 69. P. 703–708.
<https://doi.org/10.1002/ps.3424>
105. *Wang X., Ren Z., Wang M., Chen M., Lu A., Si W., Yang C.* // *Chem. Centr. J.* 2018. V. 83. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1186/s13065-018-0452-z>
106. *Chen Q., Zhang J.-W., Chen L.-L., Yang J., Yang X.-L., Ling Y., Yang Q.* // *Chin. Chem. Lett.* 2017. V. 28. P. 1232–1237.
<https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2017.03.030>
107. *Русаклова М.Ю., Галкин Б.Н., Филиппова Т.О., Вострова Л.Н., Гренадёрва М.В.* // *Микробиология и технология.* 2009. № 6. С. 69–74.
108. *Zhang Y., Chen W., Yang C., Fan Q., Wu W., Jiang X.* // *J. Controll. Release.* 2016. V. 237. P. 115–124.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.07.011>
109. *Sonawane S.J., Kalhapure R.S., Govender T.* // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2017. V. 99. P. 45–65.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.12.011>
110. *Thota S., Rodrigues D.A., Pinheiro P.S.M., Lima L.M., Fraga C.A.M., Barreiro E.J.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2018. V. 28. P. 2797–2806.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.07.015>
111. *Wang X.L., Zhang Y.B., Tang J.F., Yang Y.S., Chen R.Q., Zhang F., Zhu H.L.* // *Eur. J. Med. Chem.* 2012. V. 57. P. 373–382.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.09.009>
112. *Xia L., Xia Y.F., Huang L.R., Xiao X., Lou H.Y., Liu T.J., Pan W.D., Luo H.* // *Eur. J. Med. Chem.* 2015. V. 97. P. 83–93.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.042>
113. *Jacomini A.P., Silva M.J.V., Silva R.G.M., Gonçalves D.S., Volpato H., Basso E.A., Paula F.R., Nakamura C.V., Sarragiotto M.H., Rosa F.A.* // *Eur. J. Med. Chem.* 2016. V. 124. P. 340–349.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.048>
114. *Dos Santos Filho J.M., de Queiroz E., Silva D.M.A., Macedo T.S.* // *Bioorg. Med. Chem.* 2016. V. 24. P. 5693–5701.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.09.013>
115. *Duarte S.S., de Moura R.O., da Silva P.M.* // *Exp. Parasitol.* 2018. V. 192. P. 25–35.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.07.004>

Synthesis and Biological Activity of *N*-Acyhydrazones

E. R. Belyaeva*[#], Yu. V. Myasoedova*, N. M. Ishmuratova*, and G. Yu. Ishmuratov*

[#]Phone: +7 (937) 860-02-64; e-mail: ern_lbrn@bk.ru

*Ufa Institute of Chemistry, Special Structural Subdivision of Ufa Federal Research Center Russian Academy of Sciences, prosp. Oktyabrya 71, Ufa, 450054 Russia

The synthesis of hybrid molecules containing fragments of natural compounds and pharmacophore groups makes it possible to develop a wide range of dangerous biological diseases. Acylhydrazone fragments are present in many biologically active molecules and give them certain types of pharmacological activity: antibacterial, antituberculosis, antifungal, antitumor, anti-inflammatory, anticonvulsant, antiviral and antiprotozoal. The review considers examples of the synthesis of *N*-acyhydrazones, which have a structure based on natural and synthetic compounds, provides data on their pharmacological properties: anti-tuberculosis activity (against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv), antimicrobial and bactericidal activity, antiviral (influenza viruses, herpes simplex type 1, Epstein–Barr, human immunodeficiency virus) and anti-inflammatory (including analgesic) activity, antitumor activity (against cancer cells of the lungs, breast, stomach, liver, colon, etc.), as well as pesticide activity (fungicides, larvicides, insecticides, growth regulators).

Keywords: acylhydrazones, synthesis, biological activity



ПЕТЛЕВАЯ ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ: ОТ ТЕОРИИ К ПРАКТИКЕ

© 2022 г. Ф. В. Ширшиков*, #, Ю. А. Беспятых*

*ФГБУ “Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины” ФМБА России,
Россия, 119435 Москва, ул. Малая Пироговская, 1А

Поступила в редакцию 18.05.2022 г.

После доработки 01.06.2022 г.

Принята к публикации 17.06.2022 г.

Вопросы повышения точности видовой идентификации патогенов и сокращения продолжительности анализа и по сей день остаются актуальными для современной молекулярной диагностики. В лабораторной и клинической практике для обнаружения патогенов наиболее востребованы методы амплификации нуклеиновых кислот, “золотым стандартом” среди которых считается полимеразная цепная реакция (ПЦР). Тем не менее в ряде случаев альтернативой классической ПЦР-диагностике выступает группа методов изотермической амплификации. За более чем 30-летнюю историю развития способов синтеза ДНК при постоянной температуре появление метода петлевой изотермической амплификации (LAMP) сделало возможным развитие новых направлений в области мобильной диагностики бактериальных и вирусных инфекций. В настоящем обзоре рассмотрены ключевые характеристики данного метода и особенности практической работы с ним. Впервые обсуждается пространственное строение ампликонов реакции LAMP с одноцепочечными петлевыми структурами, благодаря которым становится возможным отжиг праймеров при изотермических условиях. Проанализированы последние достижения по модификации метода LAMP, позволяющие рассматривать его в качестве уникальной платформы для разработки способов молекулярной диагностики нового поколения.

Ключевые слова: петлевая изотермическая амплификация, LAMP, дизайн праймеров, ампликон

DOI: 10.31857/S0132342322060227

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	677
ПРИНЦИП МЕТОДА LAMP.....	678
ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ ПРАЙМЕРЫ.....	680
ФЕРМЕНТЫ ДЛЯ МЕТОДА LAMP.....	682
ИНЖЕНЕРИЯ НОВЫХ ФЕРМЕНТОВ.....	683
ОПТИМИЗАЦИЯ АМПЛИФИКАЦИИ.....	684
СПОСОБЫ ДЕТЕКЦИИ.....	686
КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ.....	687
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	688
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	689

ВВЕДЕНИЕ

Методы амплификации нуклеиновых кислот нашли широкое применение в различных областях молекулярной биологии, стали незаменимым фундаментом для генной инженерии и ценным источником информации о причинах инфекционных и наследственных заболеваний. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) по-прежнему крайне востребован при решении широкого спектра научно-исследовательских задач. Несмотря на важную роль этого метода в области здравоохранения, при создании способов мобильной диагностики привлекательной альтернативой ПЦР становится группа разнообразных методов, основанных на изотермической амплификации [1, 2].

При изотермической амплификации, в отличие от ПЦР, нет необходимости в температурных циклах для денатурации нуклеиновой кислоты, отжига и элонгации олигонуклеотидных праймеров, поскольку все эти этапы протекают последовательно и без разделения каждого процесса во времени. Возможность осуществления амплификации при изотермических условиях в значительной степени зависит от структуры и количества

Сокращения: *Bst* LF – большой фрагмент ДНК-полимераза I из *Geobacillus stearothermophilus*; LAMP – петлевая изотермическая амплификация; *Taq*-полимераза – ДНК-полимераза I из *Thermus aquaticus*.

Автор для связи: (тел.: +7 (906) 114-70-00; эл. почта: shrshkv@ya.ru).

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров набора DAT [20], разработанные с помощью программ MorphoCatcher и PrimerExplorer

Праймер	Нуклеотидная последовательность, 5'→3'
FIP	TCTTTTCCCAACGTCCGGCGTCGTATCGCAGAAGAGG
BIP	CACCGAGGACGCTGATTACCTTCTCATCTTCCGCTTAC
F3	CGTCGTAAGGTTCGAGGAA
B3	CCTCCACCTGACGATCA
LF	ATTTTCTTCTGCCATCTGG
LB	ACGTAACCACCTTCTCATCAC

праймеров, использования в реакционной смеси особых ферментов и других вспомогательных белков, а также от тщательного подбора остальных компонентов реакции [3]. Следует отметить, что принцип некоторых вариантов изотермической амплификации, не без существенных модификаций, был заимствован из различных механизмов репликации вирусных геномов. Так, исторически первым методом изотермической амплификации стал метод 3SR (от англ. self-sustained sequence replication), появившийся благодаря исследованиям по моделированию ретровирусной репликации в условиях *in vitro* [4]. Амплификация по принципу “катящегося кольца” (от англ. rolling circle amplification, RCA) [5] основана на механизме репликации вирионов и некоторых вирусов, обладающих кольцевым геномом [6–8]. Петлевая изотермическая амплификация (от англ. loop-mediated isothermal amplification, LAMP) имеет много структурных гомологий с механизмом репликации генома поксвирусов [9, 10]. В этой связи совершенно очевидна важность фундаментальных исследований прокариотических и вирусных ферментов репликации, поскольку обнаружение новых термостабильных, точных и процессивных обратных транскриптаз и ДНК-полимераз способно вывести технологию LAMP на совершенно иной уровень практического применения, как это произошло когда-то в области ПЦР с открытием ДНК-полимеразы I из *Thermus aquaticus*, или Taq-полимеразы [11].

Метод LAMP оказался наиболее популярным способом изотермической амплификации по целому ряду причин: в силу малого количества компонентов реакционной смеси, их доступности для рутинной практики, а также благодаря высокой специфичности реакции, которая обеспечивается 4–6 праймерами [12, 13]. Простота реакции амплификации позволила осуществить проведение LAMP в максимально ограниченных условиях на борту Международной космической станции [14]. Несмотря на то что у технологии LAMP пока остаются недостатки, связанные с

применяемыми на сегодняшний день ферментами, метод обладает некоторыми преимуществами перед ПЦР, особенно ценными для клинической практики. Технология LAMP нашла множество применений в “полевой” диагностике, когда необходимо проводить амплификацию вне лабораторных условий [15–19].

В настоящем обзоре рассмотрены возможности метода LAMP и некоторые его особенности, которые необходимо учитывать при разработке новых тест-систем. Многие упомянутые в обзоре методики апробированы авторами при разработке тест-систем на основе LAMP, а соответствующие теоретические и практические аспекты метода проиллюстрированы на примере конкретного набора праймеров (табл. 1) [20]. Впервые демонстрируются результаты молекулярного моделирования пространственного строения гантелеобразных стартовых структур, образующихся в ходе реакции LAMP. Детально описаны процедуры подбора генов-мишеней и дизайна праймеров, отмечена важность такого этапа, как предсказание нежелательных вторичных структур в нуклеотидных последовательностях мишени и ампликона. Рассмотрены основные этапы оптимизации состава реакционной смеси и условий проведения амплификации, приведены основные характеристики ферментов, используемых в методе LAMP, описаны способы детекции положительного сигнала амплификации и увеличения специфичности реакции.

ПРИНЦИП МЕТОДА LAMP

Метод LAMP был разработан и запатентован группой японских исследователей из компании Eiken Chemical в 1998 г. [21]. Одной из главных целей создания нового метода амплификации было повышение специфичности детекции нуклеотидных полиморфизмов по сравнению с возможностями ПЦР. В настоящее время патент на технологию LAMP утратил свою охранную силу, чем

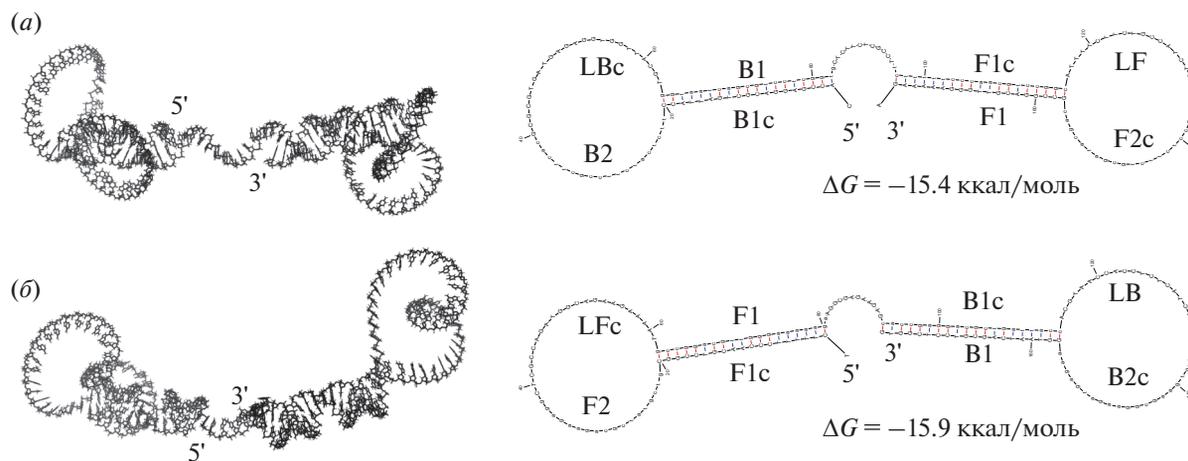


Рис. 1. Молекулярные модели пространственного строения стартовых структур, образующихся в реакции LAMP на основе набора праймеров DAT (табл. 1). Моделирование структуры ДНК проводили с помощью программ mFold и RNAComposer при температуре 65°C, концентрации ионов натрия – 50 мМ, ионов магния – 8 мМ. Приведены третичная (слева) и вторичная (справа) структуры ампликонов, имеющих комплементарные нуклеотидные последовательности. На вторичной структуре ампликонов показаны все сайты отжига для внутренних и петлевых праймеров, а также их комплементарные участки. Длина нуклеотидной последовательности составляет 176 нт, GC-состав: 55%. (а) – Стартовая структура F, получившая название благодаря наличию сайта отжига (F2c) для внутреннего праймера FIP; (б) – стартовая структура B с сайтом отжига (B2c) для внутреннего праймера VIP.

отчасти и объясняется повышенный интерес к данному способу амплификации.

Механизм реакции LAMP со множеством промежуточных вторичных структур ДНК обеспечивается необычной структурой праймеров и напоминает японское искусство оригами [9]. Для амплификации методом LAMP необходимо найти в гене-мишени шесть сайтов отжига для двух пар праймеров, которые при средней длине одного сайта отжига в 20 нт покрывают ~120 п.н. гена-мишени. Это минимум в 3 раза увеличивает потенциальную аналитическую специфичность метода LAMP, если сравнить его с ПЦР на основе прямого и обратного праймеров.

Метод LAMP основан на особой структуре внутренних праймеров (от англ. forward inner primer, FIP и backward inner primer, VIP), участвующих в формировании двух терминальных инвертированных повторов в нуклеотидной последовательности ампликонов. Вторая пара внешних праймеров (F3 и B3) участвует только на первых стадиях амплификации, поэтому их концентрация существенно ниже, чем у внутренних праймеров [10]. Благодаря последовательному отжигу внутренних и внешних праймеров, ампликон на начальных стадиях реакции LAMP формирует два типа гантелеобразных стартовых структур (рис. 1), имеющих по две одноцепочечные петли и одному сайту отжига для комплементарного внутреннего праймера. С целью ускорения амплификации разработчики метода предложили использовать третью пару петлевых праймеров (от англ. loop forward, LF и loop backward, LB),

сайты отжига которых тоже расположены в петлевых участках стартовых структур между сайтами F1/B1 и F2/B2 [22]. Следует, однако, учитывать, что вероятность обнаружения сайтов отжига петлевых праймеров напрямую зависит от длины соответствующих петель стартовых структур. Для некоторых наборов “коровых” праймеров (так называют совокупность внутренних и внешних праймеров [23]) можно сконструировать только один петлевой праймер, а для других ни одного. Именно по этой причине петлевыми праймерами удаётся дополнить не каждую тест-систему.

Процесс амплификации на основе метода LAMP происходит в изотермических условиях (60–65°C) и обычно занимает не более 15–30 мин, а при высокой концентрации целевой нуклеиновой кислоты выход реакции на плато возможен за 5–7 мин. Вместо термической денатурации молекулы ДНК в реакции LAMP используется цепь-вытесняющая активность большого фрагмента *Bst*-ДНК-полимеразы из *Geobacillus stearothermophilus* (*Bst* LF), при этом непрерывный во времени отжиг внутренних и петлевых праймеров обусловлен одноцепочечным состоянием соответствующих сайтов отжига и их постоянной стерической доступностью для праймеров. При температуре 65°C, оптимальной для фермента *Bst* LF, двойная спираль ДНК становится локально денатурированной благодаря эффекту “дыхания” цепей [24, 25], облегчающему процесс отжига праймеров на начальных стадиях. Цепь-вытесняющая активность *Bst* LF позволяет высвободить ранее синтезированную цепочку ДНК, которая гибридизуется сама на себя с помощью комплементар-

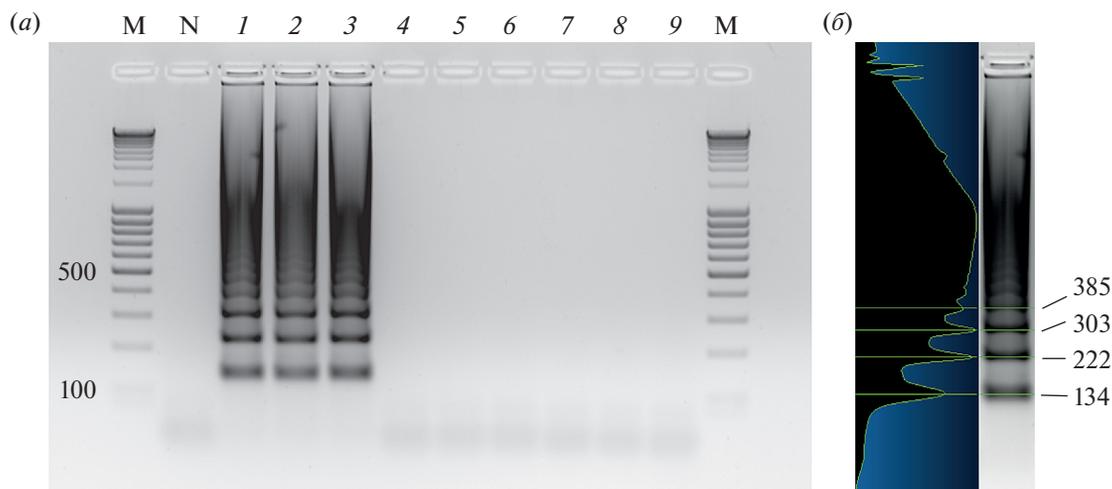


Рис. 2. Визуализация продуктов реакции LAMP на основе праймеров DAT с помощью агарозного гель-электролиза [20]. (а) – Характерная “лесенка” продуктов реакции амплификации с периодичностью молекулярных масс (п.н.). М – маркер молекулярных масс ДНК (MassRuler DNA Ladder Mix, ThermoFisher Scientific, Литва); N – отрицательный контроль без добавления ДНК-матрицы; 1–3 – реакция на матрице геномной ДНК разных штаммов бактерий *Dickeya solani*; 4–9 – реакции с добавлением в качестве матрицы геномной ДНК представителей *Pectobacterium* spp., встречающихся на картофеле вместе с *D. solani*; (б) – профиль локализации полос ДНК и рассчитанные с помощью программы Vision-Capt (Vilber Lourmat, Франция) молекулярные массы продуктов амплификации (п.н.).

ных участков и образует новую точку инициации синтеза ДНК. Образующиеся стартовые структуры после отжига соответствующего внутреннего праймера могут многократно служить матрицей для синтеза комплементарной версии самих себя без необходимости в исходной нуклеиновой кислоте, добавляемой к реакционной смеси. Следовательно, метод LAMP представляет собой цепную биохимическую реакцию, количество ампликонов в которой увеличивается экспоненциально.

Быстрое накопление ДНК-продуктов в методе LAMP обеспечивается в основном нуклеотидными последовательностями внутренних и петлевых праймеров. При визуализации в агарозном геле совокупность ампликонов разной длины формирует характерную картину в виде регулярной “лесенки”, плавно переходящей в “шмер” высокомолекулярных продуктов амплификации (рис. 2). В ходе реакции LAMP на 25 мкл реакционной смеси образуется до 10 мкг ДНК, что примерно на два порядка превосходит суммарный выход ПЦР [26]. Поэтому при работе с содержимым пробирок после реакции LAMP следует помнить о возможной контаминации лаборатории и реагентов.

Интересная особенность реакции LAMP заключается в необязательности включения в состав ампликона нуклеотидной последовательности, фланкированной праймерами. Если в ПЦР прямой и обратный праймеры всегда фланкируют участок выбранного для амплификации гена, то в случае LAMP между сайтами F1 и B1 может не оставаться ни одного нуклеотида. При такой конфигурации внутренних праймеров фрагмен-

ты исходного гена-мишени сохраняются только в сайтах отжига петлевых праймеров (участки между F1 и F2, а также между B1 и B2). В этой связи следует подчеркнуть, что метод LAMP малоприменим для геномной инженерии и в значительной степени адаптирован для диагностики.

Поскольку в составе ампликонов разной длины многократно присутствует одна и та же нуклеотидная последовательность [27, 28], то в качестве характеристики специфичности реакции можно использовать анализ кривых плавления, отслеживая однажды измеренную и воспроизводимую для конкретного набора праймеров температуру плавления ($T_{пл}$) получаемого продукта амплификации. Наличие в ампликоне хотя бы одного сайта рестрикции вне последовательностей праймеров позволяет получить в агарозном геле всего одну полосу с характерной молекулярной массой [9] и тем самым дает возможность оценить специфичность реакции. Любые отклонения в количестве пиков плавления продуктов реакции LAMP, в получаемом значении $T_{пл}$, в регулярности “лесенки” ампликонов в агарозном геле и количестве полос после обработки амплификата рестриктазами свидетельствуют о наличии в реакционной смеси фоновой неспецифической амплификации, причины которой будут рассмотрены далее.

ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ ПРАЙМЕРЫ

В методах амплификации определяющим фактором высокой специфичности и чувствительно-

сти детекции является дизайн олигонуклеотидных праймеров. Метод LAMP, основанный на синхронной работе 4–6 праймеров, требует особого внимания к их последовательностям. Если рассматривать LAMP как мультиплексную реакцию из нескольких пар праймеров, то становится очевидным влияние на эффективность реакции различных термодинамических характеристик праймеров, таких как стабильность гибридизации растущих 3'-концов и предрасположенность праймеров к димеризации. В условиях постоянной ферментативной активности *Bst* LF димеризация 3'-концов праймеров способствует их элонгации и, следовательно, появлению в праймерах новой нуклеотидной последовательности. Элонгированные праймеры могут непредсказуемо влиять на эффективность и специфичность реакции. Поэтому при обнаружении признаков неспецифической фоновой амплификации в некоторых случаях помогает сдвиг сайтов отжига проблемных праймеров на несколько нуклеотидов для сокращения или устранения комплементарности в предполагаемых димерах [29]. Экспериментально показана применимость такого подхода для сокращения фоновой амплификации, однако при оценке потенциальных димеров следует помнить о существовании комплементарности не только между парами А·Т и G·C, которые обычно предсказываются *in silico*, но и о термодинамическом вкладе в гибридизацию праймеров неканонических пар нуклеотидов [30].

Стандартная конфигурация праймеров для реакции LAMP, состоящая из коровых и петлевых праймеров, со временем была пересмотрена, и появились новые типы праймеров:

1) “стволовые” праймеры (от англ. stem forward, StF и stem backward, StB), сайты отжига которых локализованы в промежутке между сайтами F1 и B1 [31]. Данный тип праймеров, как и в случае с петлевыми праймерами, сильно зависит от длины нуклеотидной последовательности, фланкируемой сайтами F1 и B1;

2) “роевые” (от англ. swarm) праймеры F1S/B1S, которые отжигаются на сайты F1c/B1c [32]. Отметим, что идентичные сайты отжига были использованы позднее другими авторами для праймеров под названиями FC/RC [33]. В данной работе было показано, что сокращение расстояния между сайтами отжига F2/B2 и F1/B1 позволяет значительно снизить неспецифичную фоновую амплификацию и повысить аналитическую чувствительность. Преимущество “роевых” праймеров заключается в том, что их сайты отжига не требуется искать отдельно, т.к. они совпадают с сайтами отжига внутренних праймеров.

Как мы видим, модификация архитектуры праймеров и физического расстояния между их сайтами отжига являются дополнительными факторами в оптимизации специфичности или чув-

ствительности метода. При этом каждая дополнительная пара праймеров увеличивает мультиплексность реакции и требует предварительной проверки *in silico* на совместимость с другими олигонуклеотидами для исключения возможных димеров.

Эволюция метода LAMP в отношении состава праймеров, по всей видимости, происходит не только по пути создания новых типов праймеров. В недавней работе авторам удалось провести амплификацию только на основе внутренних праймеров, не добавляя внешние праймеры, при этом в остальном состав реакционной смеси остался неизменным [34].

Выбранная мишень и ампликон, находясь на некоторых стадиях реакции в одноцепочечном состоянии, не должны содержать нежелательных вторичных структур в сайтах отжига праймеров, снижающих эффективность амплификации. Основной вклад в образование вторичных структур вносит неравномерное распределение GC-состава и, следовательно, локальное повышение $T_{пл}$ в таких участках ДНК. Предсказание вторичной и третичной структур одноцепочечных нуклеиновых кислот (как РНК, так и ДНК) можно проводить с приближением к оптимальным для *Bst* LF значениям температуры и концентрациям ионов магния с помощью веб-сервисов mFold (<http://www.unafold.org>) [35] и RNAComposer (<http://rnacomposer.ibch.poznan.pl>) [36]. Таким образом, следует тщательно проверять каждый потенциальный набор праймеров и его физико-химические свойства с помощью методов биоинформатики.

Трудности в дизайне и совместимости разных наборов праймеров являются, пожалуй, самым главным недостатком метода LAMP, усложняющий процесс разработки мультиплексных тест-систем [37–40]. Учитывая эти особенности, следует отметить, что на сегодняшний день оптимальным вариантом для LAMP-диагностики является тест-система, состоящая из отрицательного контроля без матрицы, положительного контроля на основе плазмидной ДНК или армированной РНК в составе фаговой частицы и, наконец, оптимизированной реакционной смеси для исследуемого образца.

Многие критерии скрининга мишеней в геноме и подбора праймеров для LAMP удалось формализовать на языках программирования, что привело к созданию новых высокоэффективных инструментов для решения различных задач молекулярной диагностики. Для упрощения процедуры дизайн LAMP-праймеров создано несколько удобных веб-сервисов, позволяющих проводить предварительный анализ потенциальных генов-мишеней, а затем использовать полученную информацию при конструировании

праймеров с необходимыми параметрами. Среди таких сервисов получили особую популярность PrimerExplorer (<http://primerexplorer.jp/e>) [10] японской компании Eiken Chemical, а также LAMP Primer Design Tool (<https://lamp.neb.com>) [13] американской компании New England Biolabs (NEB). Эти программы позволяют получить кандидатные наборы праймеров по интересующей нуклеотидной последовательности, имеют опции сортировки праймеров по GC-составу и другим физико-химическим параметрам (например, по термодинамической стабильности 3'-концов или риску димеризации). Несмотря на сходство этих веб-сервисов, PrimerExplorer обладает некоторыми преимуществами. Например, предоставляет ряд уникальных возможностей для дизайна праймеров с различной степенью специфичности к гомологичным нуклеотидным последовательностям. Сервис позволяет вручную выбрать те нуклеотиды, которые при расположении на концах праймеров повысят их специфичность в отношении конкретного таксона. Если же такие нуклеотидные позиции окажутся в середине последовательности праймера, это приведет к повышению толерантности тест-системы, т.е. отжиг праймеров будет происходить с большей эффективностью, несмотря на различия в нуклеотидных последовательностях близкородственных генов-мишеней.

В научной литературе часто встречаются методики дизайна праймеров, когда после выбора гена-мишени анализируются гомологичные гены во всех штаммах целевого патогена, а далее проводится множественное выравнивание с целью определения консервативных областей без полиморфизмов [41, 42]. При таком подходе, однако, некоторые участки множественного выравнивания, идентифицируемые как консервативные, на самом деле могут и не содержать видоспецифичных нуклеотидов. Таким образом, в процессе дизайна праймеров необходимо включать в множественное выравнивание последовательности близкородственных ортологичных генов, чтобы дополнить консервативные участки праймеров только видоспецифичными нуклеотидами, которых нет в генах-ортологах.

Для устранения необходимости картировать множественное выравнивание вручную нами была разработана программа [43] и онлайн-сервис MorphoCatcher (<http://morphocatcher.ru>) [44]. Данный сервис позволяет извлечь из множественного выравнивания информацию о локализации таксон-специфичных нуклеотидов и выбрать наиболее полиморфный в сравнении с ортологами участок гена-мишени. Производительность сервиса ограничена только алгоритмами множественного выравнивания, поэтому он полезен на этапе скрининга как отдельных генов

ортологов, так и при анализе множественного выравнивания полных вирусных геномов.

В последнее время намечается тенденция совмещения инструментов для дизайна и скрининга праймеров с международными базами геномных данных вирусов человека в рамках глобальной инициативы GISAID (<https://www.gisaid.org>) [45], что привело к появлению высокопроизводительных аналитических сервисов, таких как COVID-19 CG (<https://covidcg.org>) [46] и Primer Monitor Tool (<https://primer-monitor.neb.com>) [47]. Со временем алгоритмы дизайна праймеров для LAMP будут становиться более удобными для пользователей, учитывать множество термодинамических параметров олигонуклеотидов, их вторичную и третичную структуру, а также осуществлять поиск подходящих для диагностики мишеней на основе актуальных данных со всего мира.

ФЕРМЕНТЫ ДЛЯ МЕТОДА LAMP

Исторически первым и наиболее часто используемым ферментом в технологии LAMP стал большой фрагмент ДНК-полимеразы I из термофильной бактерии *Geobacillus stearothermophilus* (ранее вид относили к роду *Bacillus* [48, 49], что теперь отражено в названии фермента). Фермент *Bst* LF обладает 5'→3' полимеразной, цепь-вытесняющей и ревертазной активностью, но не имеет 5'→3' экзонуклеазной активности [50, 51]. Со временем были разработаны гомологи *Bst* LF с точечными изменениями аминокислотной последовательности, повысившими процессивность, термостабильность и ревертазную активность фермента при температуре >65°C [13, 52].

Использование технологии олигонуклеотидных аптамеров [53] позволяет обратимо ингибировать проявление полимеразной активности *Bst*-полимеразы при комнатной температуре, что повышает специфичность реакций на основе фермента *Bst* 2.0 WarmStart (NEB, США) [13, 23]. Таким образом, в настоящее время существуют гомологи *Bst*-полимеразы, совместимые с форматом амплификации по принципу “горячего” старта, широко используемым в современных приложениях ПЦР. Стоит отметить, что если *Taq*-полимераза обратимо инактивируется с помощью TP7-антитела [54], диссоциирующего при первой стадии денатурации ДНК, то применяемые для ингибирования *Bst*-полимеразы специфические олигонуклеотидные аптамеры диссоциируют от фермента при температуре >45°C [13].

Дальнейшие исследования показали, что ДНК-полимеразы из других прокариот и вирусов также применимы в методе LAMP. Примерами могут служить термостабильная ДНК-полимераза OmniAmp с ревертазной активностью из бактериофага PyroPhage 3173 горячих источников Йелло-

устонского национального парка [55, 56], а также большой фрагмент ДНК-полимеразы I из почвенной бактерии *Ureibacillus thermosphaericus* [57].

При использовании в качестве матрицы молекул РНК, как и в случае с методом ПЦР, необходимо включать в протокол амплификации стадию обратной транскрипции и добавлять в реакционную смесь один из следующих ферментов:

1) ревертазу из миелобластоз-ассоциированного вируса-сателлита (от англ. myeloblastosis-associated virus, MAV), происхождение которой часто ошибочно приписывают вирусу миелобластоза птиц (от англ. avian myeloblastosis virus, AMV) [58];

2) ревертазу вируса лейкемии мышей Молони (от англ. Moloney murine leukemia virus, MMLV) [59];

3) ревертазу с "горячим" стартом WarmStart RTx (NEB, США), которая может работать при 65°C [13].

Альтернативным вариантом для тест-систем на РНК-мишень может быть использование ДНК-полимеразы *Bst* 3.0 (NEB, США), обладающей выраженной ревертазной активностью [13].

При использовании ревертаз в методе LAMP важно помнить об их различиях в процессивности, стабильности и температурном диапазоне активности, который не всегда пересекается с температурным оптимумом *Bst*-полимеразы [59]. Таким образом, при совмещении ревертаз AMV/MAV и MMLV с методом LAMP возникает необходимость в двух температурных режимах, отводимых на обратную транскрипцию и собственно амплификацию, что делает саму концепцию изотермического теста несколько противоречивой, поскольку в данном случае его проведение потребует программируемого термостада или термоциклера. В этой связи оправдано использование ревертаз, способных осуществлять РНК-зависимый синтез ДНК в температурном оптимуме используемой ДНК-полимеразы [13, 60].

В некоторых задачах диагностики, когда допустима идентификация патогена с низким таксономическим разрешением [47], оправдан подход, направленный на снижение специфичности тест-системы к нуклеотидным полиморфизмам в гене-мишени. Повысить толерантность праймеров к незначительным отличиям в нуклеотидной последовательности удалось сначала для ПЦР [61], а через некоторое время этот способ был адаптирован для LAMP [62]. Методика предполагает использование в реакционной смеси двух полимераз: классической *Bst*-полимеразы и ДНК-полимеразы с 3'→5' экзонуклеазной активностью. Второй фермент выполняет при этом функцию удаления из последовательности праймеров всех некомплементарных матрице нуклеотидов. Такая модификация метода LAMP уже нашла применение при создании тест-систем для диагностики

вируса лихорадки денге [62] и коронавируса SARS-CoV-2 [63].

Среди других ферментов, успешно адаптированных для метода LAMP, следует отметить хеликазу UvrD [64, 65], способную снизить вероятность фоновой амплификации, а также урацил-ДНК-гликозилазу [66], применяемую в технологии ПЦР для предотвращения контаминации продуктами амплификации.

ИНЖЕНЕРИЯ НОВЫХ ФЕРМЕНТОВ

Эра поиска новых ферментов дикого типа для решения актуальных задач биотехнологии постепенно уходит в прошлое. На первое место выходят современные методы инженерной энзимологии и способы предсказания третичной структуры белков, позволяющие с помощью единичных модификаций аминокислотной последовательности добиться изменения их активности [67–69]. Применение подобных подходов помогло создать термостабильные гомологи *Bst* LF, переносящие нагрев до 90°C в течение 2 мин, что превосходит по этому критерию существующие коммерческие ферменты (табл. 2) [70–72]. Стабильность третичной структуры гомологов *Bst* LF может быть полезна как для экспресс-методов прямой амплификации с термическим лизисом мембран патогенов [73], так и при создании сухих реакционных смесей по протоколам лиофилизации или вакуумной сушки [74, 75]. Кроме того, рациональный дизайн *Taq*-полимеразы открыл для этого фермента новую сферу применения в изотермической амплификации (табл. 2). Таким образом, методы направленной эволюции [81, 82] становятся необходимыми инструментами при адаптации известных и новых ферментов под широкий спектр узкоспециализированных задач молекулярной диагностики.

Интересно, что поиск ДНК-полимераз с цепывытесняющей активностью оказывается возможным не только в геномах обитателей геотермальных источников, но и среди арктических микроорганизмов. В качестве примера может служить ДНК-полимераза из морской психрофильной бактерии *Psychrobacillus* sp. (PB-полимераза) с оптимумом активности при 25–37°C, которой необходима всего одна модификация (табл. 2) для совместимости с методом LAMP [57]. Тем не менее в своей нативной форме низкотемпературная PB-полимераза может стать основой для тест-систем, использующих в качестве источника постоянной температуры тепло человеческого тела. Прототипы таких тест-систем на основе метода RPA (от англ. recombinase polymerase amplification) были разработаны для диагностики фитопатогенных вирусов [83]. Поиск других ДНК-полимераз с низкотемпературным оптимумом активности может привести к созданию методов амплифика-

Таблица 2. Модификации аминокислотной последовательности известных ДНК-полимераз, повышающие их применимость в методе LAMP

Фермент	Модификация	Наблюдаемый эффект	Ссылки
PV	D422A	Повышение термостабильности при 65°C	[57]
<i>Bst</i> LF	T493N A552G	Повышение термостабильности и возможность повышения температуры реакции до 73°C	[71]
<i>Taq</i>	G46D	Снижение 5'→3' экзонуклеазной активности	[76–78]
	K738F A743F	Появление цепь-вытесняющей активности и возможность применения в реакции LAMP	
	D732N	Увеличение процессивности и скорости амплификации, появление цепь-вытесняющей и ревертазной активности	[79]
	D119A D119N	Снижение 5'→3' экзонуклеазной активности	
	E507K	Ускорение полимеразной активности и повышение толерантности фермента к цельной крови	[80]

ции, не требующих нагревательных приборов, что может быть востребовано при организации мобильных пунктов диагностики.

Таким образом, идеальная ДНК-полимераза для амплификации LAMP, по всей видимости, должна объединять в себе сразу несколько свойств: сильно выраженную цепь-вытесняющую активность, высокую скорость синтеза ДНК и процессивность фермента, наличие активности обратной транскриптазы, отсутствие экзонуклеазной активности, а также устойчивость фермента к различным ингибиторам амплификации.

ОПТИМИЗАЦИЯ АМПЛИФИКАЦИИ

При создании и оптимизации тест-систем на основе LAMP важным этапом является скрининг праймеров, не подверженных фоновой амплификации и ложноположительному срабатыванию при отсутствии в реакционной смеси ДНК-матрицы. При этом влияние конкретного фактора или компонента реакционной смеси необходимо контролировать не только по скорости появления сигнала амплификации, но и по его специфичности. В наиболее быстром сигнале амплификации может остаться незамеченным вклад фоновой амплификации, который при использовании интеркалирующих красителей может быть выявлен только при анализе кривых плавления финального амплификата.

Оптимизация амплификации LAMP минимально включает в себя определение температурного режима проведения реакции (рис. 3а) и необходимой концентрации ионов магния (рис. 3б), а также подбор концентраций всех пар праймеров, которые планируется включить в состав реакционной смеси (рис. 4). Использование в качестве дополнительных компонентов реакционной

смеси различных энхансеров амплификации, обычно применяемых для оптимизации ПЦР, допустимо и при работе с методом LAMP. Для каждого нового компонента реакционной смеси необходимо продемонстрировать его положительное влияние на эффективность амплификации. Например, добавляя в состав буфера гуанидин гидрохлорид, можно значительно ускорить реакцию LAMP и увеличить чувствительность праймеров для детекции РНК или ДНК [84]. Примером негативного влияния на скорость реакции LAMP может служить бетаин, который, снижая температуру плавления пар G·C [85], ингибирует неспецифическую и специфическую амплификацию, что подтверждается некоторыми авторами и нашими наблюдениями (рис. 5) [23, 86].

При разработке многокомпонентных реакционных смесей, требующих нахождения сбалансированного сочетания всех реагентов, существует способ значительно сократить количество необходимых экспериментов по поиску оптимальных значений факторов, влияющих на эффективность амплификации. Для этого следует выполнять дизайн экспериментов с помощью метода построения ортогональных матриц, принцип которого был исходно предложен японским инженером Гэньити Тагути для оптимизации производственных процессов и контроля качества продукции [87, 88]. В применении к методам амплификации ортогональная матрица Тагути будет содержать информацию о минимальном количестве комбинаций различных факторов, позволяющем малым числом экспериментальных проверок наиболее широко оценить ландшафт оптимальных значений каждого интересующего фактора, измеряя отношение сигнал/шум.

Дизайн экспериментов на основе классической факториальной матрицы при наличии пяти

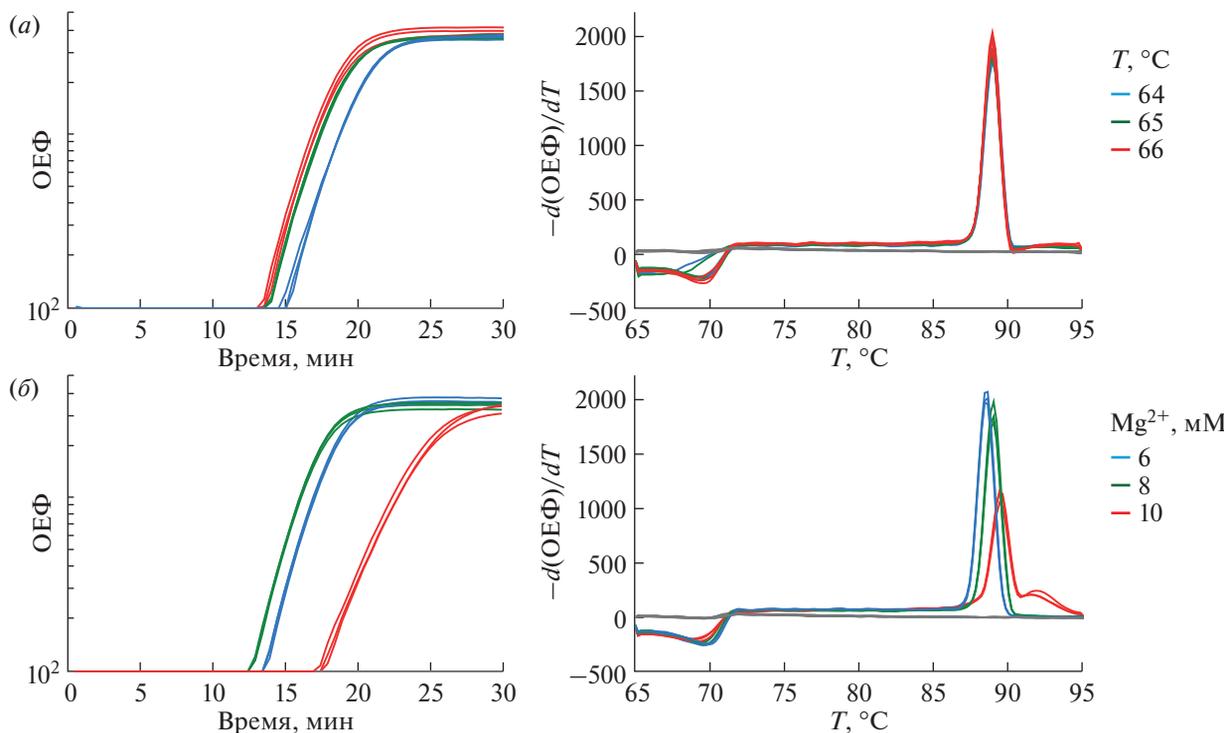


Рис. 3. Влияние температуры (а) и концентрации ионов магния (б) на скорость (слева) и специфичность (справа) реакции LAMP на основе набора праймеров DAT. ОЕФ – относительные единицы флуоресценции. Каждый фактор оптимизации тестировали в трех технических повторах ($n = 3$). Кривые амплификации даны в логарифмическом масштабе. Для измерения сигналов флуоресценции использовали термоциклер CFX96 Touch (Bio-Rad, США) и интеркалирующий краситель EvaGreen (Biotium, США). Кривые плавления финального ампликата только в случае повышенной температуры (66 °C) и концентрации ионов магния (10 мМ) позволяют заметить изменение специфичности амплификации по появлению минорных пиков или смещению основных пиков плавления. Сигналы отрицательных контролей без добавления ДНК-матрицы показаны серым цветом.

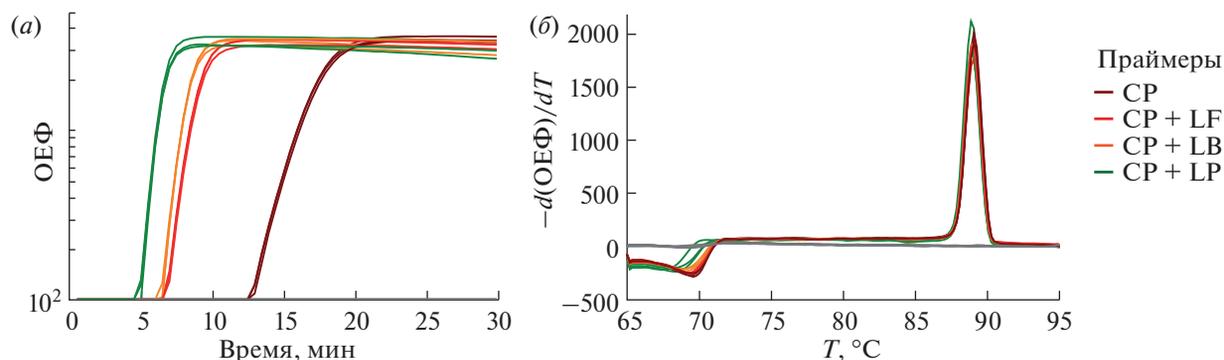


Рис. 4. Влияние петлевых праймеров на скорость и специфичность реакции LAMP. CP – коровые праймеры (F1P, V1P, F3 и V3); LF – прямой петлевой праймер; LB – обратный петлевой праймер; LP – прямой и обратный петлевые праймеры. (а) – Кривые амплификации в логарифмическом масштабе. Каждый петлевой праймер в концентрации 0.8 мМ способен ускорить амплификацию, поэтому при добавлении двух праймеров наблюдается выраженный синергетический эффект на скорость реакции; (б) – кривые плавления финального ампликата с идентичной $T_{пл}$, свидетельствующей о сохранении уровня специфичности при увеличении скорости реакции.

факторов оптимизации (например, температура и четыре компонента реакционной смеси) в трех различных переменных значениях предписывает экспериментально проверить 243 (3^5) комби-

нации. Метод Тагути позволяет сократить количество необходимых экспериментов до 27. Создаваемая на основе дисперсионного анализа экспериментальных данных математическая мо-

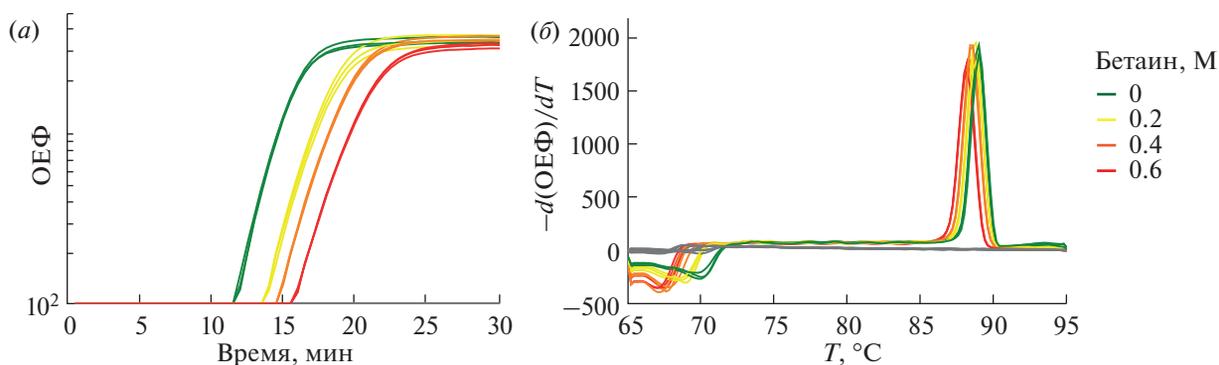


Рис. 5. Влияние бетаина на скорость, а также на специфичность и температуру плавления амплификата в реакции LAMP. (а) – Кривые амплификации в логарифмическом масштабе. При увеличении концентрации бетаина наблюдается ингибирование реакции; (б) – кривые плавления финального амплификата. Наблюдается постепенное снижение $T_{\text{пл}}$ амплификата при увеличении концентрации бетаина в реакционной смеси.

дель позволяет определить оптимальные значения факторов, а также вычислить процентный вклад каждого фактора в эффективность амплификации [89]. Несмотря на очевидные преимущества этого подхода в области разработки тест-систем, метод Тагути используется незаслуженно редко.

СПОСОБЫ ДЕТЕКЦИИ

Метод LAMP оказался совместим с используемыми ранее в ПЦР способами детекции, такими как агарозный гель-электрофорез и детекция амплификации в режиме реального времени с интеркалирующими красителями [9]. С целью выявления подходящих интеркалирующих красителей (например, некоторые красители семейств SYTO, EvaGreen и др.) была проведена серия сравнительных исследований их ингибирующего действия на реакцию LAMP [90, 91]. Позднее для детекции LAMP была предложена методика, основанная на мечении внутренних и петлевых праймеров для последующей визуализации амплификата с помощью бумажных тест-полосок [92, 93]. Благодаря особенностям прохождения реакции, для LAMP были разработаны принципиально новые способы визуальной детекции, которые на сегодняшний день недоступны в технологии ПЦР. Рассмотрим эти способы детекции более подробно.

Первым качественным признаком положительной реакции, обнаруженным и характерным для реакции LAMP, стало образование на дне пробирок белого нерастворимого осадка пирофосфата магния. Динамику повышения мутности реакционной смеси с протекающей амплификацией было предложено оценивать на основе турбидиметрии с помощью специально созданных для этого портативных приборов-термостатов [26]. Таким образом, дополнительным признаком прохождения амплификации оказалось снижение

концентрации свободных ионов магния в реакционной смеси.

Визуализация сигнала реакции LAMP по магнию основана на применении веществ-индикаторов двухвалентных ионов металлов, которые при изменении концентрации свободных ионов способны менять цвет реакционной смеси в видимом или ультрафиолетовом свете [94, 95]. Исторически первым таким металлоиндикатором стал кальцеин [10], механизм действия которого требует добавления в реакционную смесь ионов марганца. Немного позднее стали применять краситель гидроксинафтоловый синий (рис. 6а), широко используемый для мобильной диагностики и не требующий дополнительных модификаций состава реакционной смеси [96]. В последнее время, особенно при детекции LAMP в микрофлюидных чипах, набирает популярность индикатор эриохромовый черный Т [74, 97]. Другой металлоиндикатор, известный под названием кислотный хром синий К, был также успешно апробирован для детекции LAMP [98].

Альтернативный способ детекции LAMP основан на использовании различных pH-чувствительных красителей, меняющих цвет при подкислении реакционной смеси в процессе синтеза ДНК. К этой группе индикаторов можно отнести феноловый красный, крезоловый красный, нейтральный красный, а также метакрезол фиолетовый [99]. Недавно было показано применение в детекции LAMP ксиленолового оранжевого [100] и некоторых производных флуоресцеина [101].

При использовании описанных выше красителей-индикаторов мы имеем дело с непрямой детекцией амплификации, поскольку в механизме их работы важную роль играют побочные продукты реакции LAMP: пирофосфат магния и ионы водорода. Поэтому присутствие в образце различных интерферирующих веществ (например, двухвалентных ионов металлов) или неподходящий

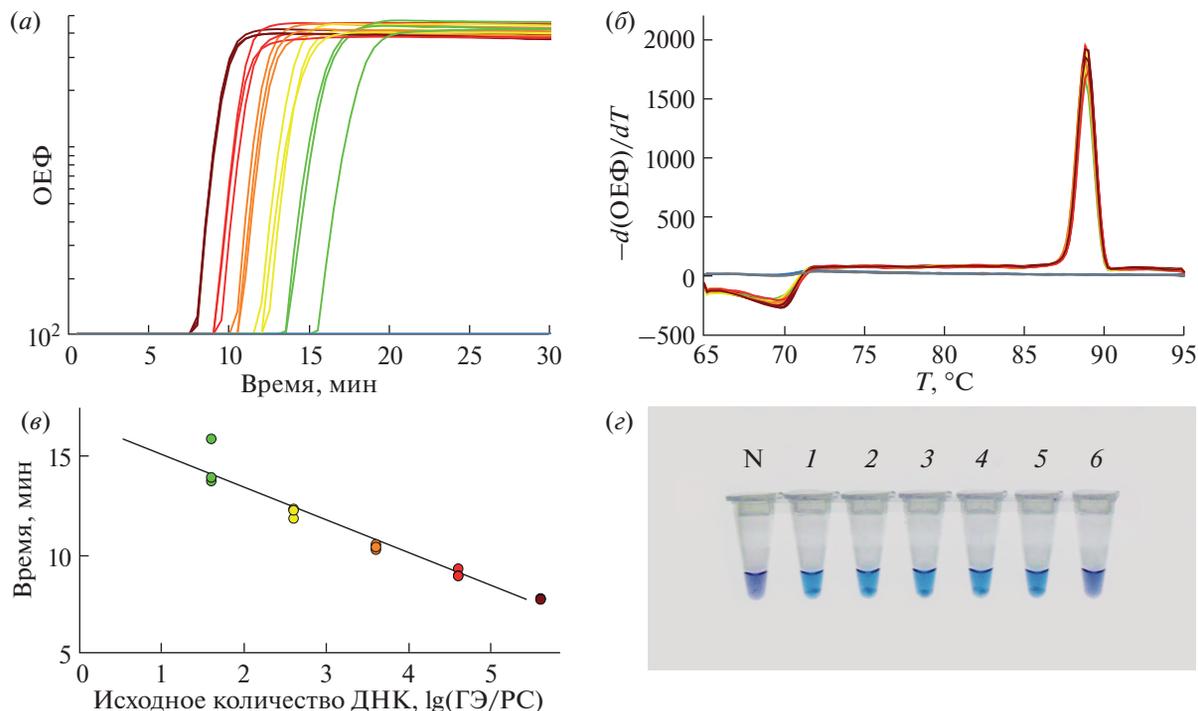


Рис. 6. Аналитическая чувствительность набора праймеров DAT в диапазоне концентраций $4 \times 10^0 - 4 \times 10^5$ копий геномной ДНК *D. solani* в ходе реакции LAMP. (a) – Кривые амплификации в логарифмическом масштабе; (б) – кривые плавления финального амплификата; (в) – стандартная кривая с визуализацией линейного динамического диапазона и предела детекции. Эффективность амплификации составила 99,4%, $R^2 = 0.948$; (г) – детекция LAMP с помощью гидроксинафтола синего. ГЭ – геном-эквивалент; РС – реакционная смесь; N – отрицательный контроль без добавления ДНК-матрицы; 1–6 – реакции с добавлением геномной ДНК в порядке падения концентрации. На дне пробирок с положительными реакциями (1–5) виден осадок пирофосфата магния. Предел детекции (40 ГЭ/РС) на основе гидроксинафтола синего совпадает с таковым, полученным в формате детекции в режиме реального времени.

уровень pH образца может привести к изменению окраски реакционной смеси LAMP до начала амплификации. Так, даже атмосферный углекислый газ может оказать негативное влияние на срок хранения реагентов на основе фенолового красного, подкисляя слабобуферную реакционную смесь [102].

К индикаторам, которые меняют свою окраску в ответ на повышение концентрации амплифицируемой ДНК, относят берберин [103], кристаллический фиолетовый [104], малахитовый зеленый [105], а также метиловый зеленый [106].

Подводя итог, отметим, что использование любых видов визуальной детекции в клинической диагностике требует максимально объективной оценки изменения цвета, основанной на спектрофотометрическом анализе [84, 102].

Актуальной задачей по-прежнему является совершенствование способов прямой детекции LAMP посредством особой структуры праймеров, меченных флуорофором и гасителем флуоресценции [12]. Отсутствие у *Bst* LF 5'→3' экзонуклеазной активности затрудняет использование в методе LAMP линейных разрушаемых

TaqMan-проб, а также проб с инвертированным концевым повтором, или “молекулярных маяков” [107, 108], для детекции накопления ДНК в режиме реального времени. Технология TaqMan работает в LAMP с некоторой долей фоновой амплификации в отрицательных контролях без матрицы [109], а “молекулярные маяки” характеризуются крайне низкой специфичностью [110]. Поэтому наиболее оптимальным решением проблемы прямой детекции представляется мечение флуорофором внутренних праймеров [37].

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Преимущество количественного анализа нуклеиновых кислот на основе ПЦР состоит в том, что удвоение количества ампликонов в оптимизированных условиях реакции, при которых эффективность амплификации составляет ~100%, строго связано со стадиями термоциклирования и происходит в каждом новом цикле [111]. В реакции LAMP кинетические параметры отжига праймеров и элонгации ДНК могут сильно варьировать, поскольку они определяются термодинамическими свойствами праймеров и амплифици-

руемого участка гена-мишени. Таким образом, высокая эффективность реакции LAMP способствует снижению разрешающей способности тест-системы на образцах со слабыми отличиями в концентрации целевой нуклеиновой кислоты [112]. Парадоксально, но метод LAMP может быть одновременно охарактеризован как весьма чувствительный метод с низким значением предела детекции, а с другой стороны, он имеет слабую разрешающую способность при попытке оценить количество копий мишени в образцах с менее чем 10-кратной разницей в концентрации исходной нуклеиновой кислоты. Во многом это связано с тем, что на прохождение всего линейного динамического диапазона реакции LAMP требуется лишь несколько минут (рис. 6в) [112]. И если значения пороговых циклов ПЦР можно с достаточно высокой точностью пересчитать в количество копий гена-мишени, то в случае с пороговыми значениями времени LAMP мы можем гарантированно различать только 10-кратную разницу концентраций искомой нуклеиновой кислоты. В этой связи вопрос применимости метода LAMP для количественной диагностики в режиме реального времени представляется довольно спорным, несмотря на предложенные математические модели кинетики амплификации [27, 113]. Означает ли это, что метод LAMP абсолютно неприменим для количественной диагностики?

Для понимания ответа на этот вопрос следует рассмотреть технологию LAMP в свете метода цифровой ПЦР, как наиболее совершенного способа количественного анализа нуклеиновых кислот [114, 115]. Суть цифровой ПЦР состоит в том, что стандартная реакционная смесь разделяется на тысячи индивидуальных микрореакций, в каждой из которых может содержаться единичное количество генов-мишеней. Обнаружение мишени в таком случае происходит на пределе аналитической чувствительности, поскольку множество индивидуальных микрореакций устраняет возможные различия концентраций гена-мишени в каждой из них. Следовательно, это позволяет использовать для детекции нуклеиновой кислоты любой чувствительный метод амплификации, среди которых следует рассматривать и метод LAMP [116].

Таким образом, метод LAMP может составить конкуренцию ПЦР именно в формате цифровой амплификации. Во-первых, для реакции LAMP достаточно простейшего резистивного нагревательного элемента, поэтому из стоимости устройства для цифровой LAMP можно смело вычитать затраты на разработку точного и высокоскоростного термоциклера. Во-вторых, высокий выход реакции LAMP в сочетании с яркими интеркалирующими красителями способен обеспечить более высокую интенсивность флуоресценции индивидуальных микрореакций с положительным сигналом, что позволит более точно отличать их от микрореакций с отрицательным сигналом.

Пожалуй, не останется значимых преимуществ у цифровой LAMP только на этапах разработки и производства чипов, необходимых для генерации капель реакционной смеси в масле [117] или внутри отдельных микрореакторов [74].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гибкость методов изотермической амплификации с возможностью тонкой настройки каждого компонента реакции является одной из движущих характеристик, способствовавших появлению огромного количества модификаций метода LAMP. На сегодняшний день многие из них претендуют на роль “золотого стандарта” для мобильной диагностики [118, 119]. Неприхотливость изотермической амплификации к источнику температуры и совместимость с сухим форматом реакционной смеси открывает перед методом LAMP широкие перспективы. Существует множество различных портативных платформ, созданных в том числе благодаря усилиям российских научных групп, для проведения реакции LAMP:

1) мобильные термостаты для пробирок 0.2 мл с детекцией сигнала амплификации в режиме реального времени [13, 65, 120, 121];

2) микрофлюидные лаборатории “на чипе”, имеющие отсеки для выделения нуклеиновых кислот, проведения LAMP и детекции амплификации с помощью бумажной тест-полоски [122];

3) одноразовые чипы со множеством микрореакционных камер и специальные картриджи для реакционной смеси LAMP, позволяющие анализировать результаты амплификации с помощью смартфона [74, 97, 123].

В настоящее время обнаружение однонуклеотидных полиморфизмов так и не стало главным преимуществом LAMP, как планировалось разработчиками метода [21]. Тем не менее весьма оригинальный способ аллель-специфичной детекции был предложен на основе LAMP и двух олигонуклеотидных зондов, каждый из которых представляет собой половину стартовой структуры [124]. Отжиг таких зондов на однонуклеотидном полиморфизме приводит к их лигированию и формированию полноценной стартовой структуры, которая запускает реакцию LAMP только при наличии в гене-мишени искомой нуклеотидной замены. Возможно, развитие именно этого способа амплификации поможет в адаптации метода LAMP к исследованиям в области генетических заболеваний.

Особенности строения стартовых структур и архитектура праймеров LAMP послужили важной отправной точкой в создании других способов изотермической амплификации [33, 125]. Некоторые результаты представляются весьма перспективными для внедрения в метод LAMP с целью повышения его чувствительности к нуклеотидным заменам. В частности, особый инте-

рес представляет ДНК-связывающий белок MutS из *T. aquaticus*, ставший основой для детекции нуклеотидных полиморфизмов в одном из асимметричных методов изотермической амплификации [126]. Совершенствование алгоритмов дизайна праймеров и рациональное включение в их последовательность модифицированных нуклеотидов, таких как LNA и PNA [127, 128], может повысить стабильность праймеров при хранении и привести к появлению более специфичных методик аллель-специфичной LAMP.

Пандемия коронавирусной инфекции COVID-19 послужила важным стимулом для развития метода LAMP, вдохновив исследователей на совершенствование экспресс-методов пробоподготовки [129, 130], разработку методов диагностики без выделения и очистки нуклеиновых кислот [131, 132], оптимизацию альтернативных ДНК-полимераз и ревертаз [60], создание новых способов детекции на основе различных нуклеаз CRISPR-Cas [133–136]. Именно в последние годы началось широкомасштабное тестирование технологии LAMP в клинической практике [19, 102, 137].

Все эти исследования могут способствовать постепенному внедрению метода LAMP в систему здравоохранения как недорогого, специфичного и быстрого способа проведения скринингового обследования больших групп населения [138]. Впереди перед ним множество испытаний на пути в сферу молекулярной диагностики, возникающих по причине повсеместного внедрения ПЦР в диагностических лабораториях и доминирующего положения ПЦР в нормативно-правовых документах, регулирующих эту область в медицине и сельском хозяйстве. Можно рассчитывать, что именно экономический фактор сыграет важную роль в интенсивности мер по внедрению технологии LAMP во многих странах мира.

Таким образом, метод LAMP стал во многом революционным решением в области мобильной молекулярной диагностики, создав целую плеяду новых способов детекции амплификацию нуклеиновых кислот. В перспективе технология LAMP имеет все шансы стать полноценной альтернативой ПЦР в области молекулярной диагностики патогенов, а новые модификации проведения LAMP обязательно помогут найти этому интересному способу амплификации свою уникальную сферу применения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны К.А. Мирошникову, А.Н. Игнатову и А.М. Чуенко за предоставление коллекции штаммов фитопатогенных бактерий и оборудования исследовательского центра “ФитоИнженерия”. Работа посвящается памяти академика Ю.А. Овчинникова.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-75-10144).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Esbin M.N., Whitney O.N., Chong S., Maurer A., Darzacq X., Tjian R.* // RNA. 2020. V. 26. P. 771–783. <https://doi.org/10.1261/rna.076232.120>
2. *Chaouch M.* // Rev. Med. Virol. 2021. V. 31. P. e2215. <https://doi.org/10.1002/rmv.2215>
3. *Islam M.M., Koirla D.* // Anal. Chim. Acta. 2021. P. 339338. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339338>
4. *Guatelli J.C., Whitfield K.M., Kwok D.Y., Barringer K.J., Richman D.D., Gingeras T.R.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 1874–1878. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.5.1874>
5. *Mohsen M.G., Kool E.T.* // Acc. Chem. Res. 2016. V. 49. P. 2540–2550. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00417>
6. *Kusumoto-Matsuo R., Kanda T., Kukimoto I.* // Genes Cells. 2011. V. 16. P. 23–33. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2010.01458.x>
7. *Flores R., Serra P., Minoia S., Di Serio F., Navarro B.* // Front. Microbiol. 2012. V. 3. P. 217. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00217>
8. *Wawrzyniak P., Płucienniczak G., Bartosik D.* // Front. Microbiol. 2017. V. 8. P. 2353. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02353>
9. *Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T.* // Nucleic Acids Res. 2000. V. 28. P. e63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
10. *Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T.* // Nat. Protoc. 2008. V. 3. P. 877–882. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57>
11. *Green M.R., Sambrook J.* // Cold Spring Harb. Protoc. 2019. V. 2019. P. 436–456. <https://doi.org/10.1101/pdb.top095109>
12. *Becherer L., Borst N., Bakheit M., Frischmann S., Zengerle R., von Stetten F.* // Anal. Methods. 2020. V. 12. P. 717–746. <https://doi.org/10.1039/C9AY02246E>
13. *Moore K.J.M., Cahill J., Aidelberg G., Aronoff R., Bektaş A., Bezdan D., Butler D.J., Chittur S.V., Codyre M., Federici F., Tanner N.A., Tighe S.W., True R., Ware S.B., Wyllie A.L., Afshin E.E., Bendesky A., Chang C.B., Della Rosa R., 2nd, Elhaik E., Erickson D., Goldsborough A.S., Grills G., Hadasch K., Hayden A., Her S.Y., Karl J.A., Kim C.H., Kriegel A.J., Kunstman T., Landau Z., Land K., Langhorst B.W., Lindner A.B., Mayer B.E., McLaughlin L.A., McLaughlin M.T., Molloy J., Mozsary C., Nadler J.L., D’Silva M., Ng D.,*

- O'Connor D.H., Ongerth J.E., Osuolale O., Pinharanda A., Plenker D., Ranjan R., Rosbash M., Rotem A., Segarra J., Schürer S., Sherrill-Mix S., Solo-Gabriele H., To S., Vogt M.C., Yu A.D., Mason C.E., *The gLAMP Consortium* // *J. Biomol. Tech.* 2021. V. 32. P. 228–275. <https://doi.org/10.7171/jbt.21-3203-017>
14. Rubinfiel J., Atabay K.D., Nichols N.M., Tanner N.A., Pezza J.A., Gray M.M., Wagner B.M., Poppin J.N., Aken J.T., Gleason E.J., Foley K.D., Copeland D.S., Kraves S., Alvarez Saavedra E. // *FASEB Bioadv.* 2020. V. 2. P. 160–165. <https://doi.org/10.1096/fba.2019-00088>
 15. Tomlinson J. // *Methods Mol. Biol.* 2013. V. 938. P. 291–300. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-089-2_25
 16. Suea-Ngam A., Bezinge L., Mateescu B., Howes P.D., DeMello A.J., Richards D.A. // *ACS Sens.* 2020. V. 5. P. 2701–2723. <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c01488>
 17. Yadav S., Sharma N.N., Akhtar J. // *Analyst.* 2021. V. 146. P. 3422–3439. <https://doi.org/10.1039/d1an00214g>
 18. Liu W., Yue F., Lee L.P. // *Acc. Chem. Res.* 2021. V. 54. P. 4107–4119. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00385>
 19. Mozsary C., McCloskey D., Babler K.M., Boza J., Butler D., Currall B., Williams S., Wiley A., Afshin E.E., Grills G.S., Sharkey M.E., Premrurit P., Solo-Gabriele H., Cardentey Y., Erickson D., Mason C.E. // *J. Biomol. Tech.* 2021. V. 32. P. 221–227. <https://doi.org/10.7171/jbt.21-3203-019>
 20. Мирошников К.А., Ширшиков Ф.В. // Патент RU 2642313 C1, 2018.
 21. Notomi T., Hase T. // Patent US 6410278 B1, 2002.
 22. Nagamine K., Hase T., Notomi T. // *Mol. Cell. Probes.* 2002. V. 16. P. 223–229. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>
 23. Tanner N.A., Evans T.C. // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2014. V. 105. P. 15.14.1–15.14.14. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1514s105>
 24. von Hippel P.H., Johnson N.P., Marcus A.H. // *Bio-polymers.* 2013. V. 99. P. 923–954. <https://doi.org/10.1002/bip.22347>
 25. Beyerle E.R., Dinpajoo M., Ji H., von Hippel P.H., Marcus A.H., Guenza M.G. // *Nucleic Acids Res.* 2021. V. 49. P. 1872–1885. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab015>
 26. Mori Y., Nagamine K., Tomita N., Notomi T. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. V. 289. P. 150–154. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5921>
 27. Schneider L., Blakely H., Tripathi A. // *Electrophoresis.* 2019. V. 40. P. 2706–2717. <https://doi.org/10.1002/elps.201900167>
 28. Kaur N., Thota N., Toley B.J. // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2020. V. 18. P. 2336–2346. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.08.020>
 29. Meagher R.J., Priye A., Light Y.K., Huang C., Wang E. // *Analyst.* 2018. V. 143. P. 1924–1933. <https://doi.org/10.1039/c7an01897e>
 30. SantaLucia J., Hicks D. // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2004. V. 33. P. 415–440. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.141800>
 31. Gandelman O., Jackson R., Kiddle G., Tisi L. // *Int. J. Mol. Sci.* 2011. V. 12. P. 9108–9124. <https://doi.org/10.3390/ijms12129108>
 32. Martineau R.L., Murray S.A., Ci S., Gao W., Chao S.-H., Meldrum D.R. // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. P. 625–632. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02578>
 33. Ding X., Xu Z., Yin K., Sfeir M., Liu C. // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. P. 12852–12858. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02582>
 34. Mao R., Wang T., Zhao Y., Wu X., Zhang S., Cai T. // *Talanta.* 2022. V. 240. P. 123217. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123217>
 35. Zuker M. // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31. P. 3406–3415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>
 36. Popena M., Szachniuk M., Antczak M., Purzycka K.J., Lukasiak P., Bartol N., Blazewicz J., Adamiak R.W. // *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40. P. e112. <https://doi.org/10.1093/nar/gks339>
 37. Tanner N.A., Zhang Y., Evans T.C. // *Biotechniques.* 2012. V. 53. P. 81–89. <https://doi.org/10.2144/0000113902>
 38. Ball C.S., Light Y.K., Koh C.-Y., Wheeler S.S., Coffey L.L., Meagher R.J. // *Anal. Chem.* 2016. V. 88. P. 3562–3568. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04054>
 39. Mayboroda O., Katakis I., O'Sullivan C.K. // *Anal. Biochem.* 2018. V. 545. P. 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.01.005>
 40. Zhang Y., Tanner N.A. // *PLoS One.* 2022. V. 17. P. e0254324. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254324>
 41. Yan W. // *Methods Mol. Biol.* 2015. V. 1275. P. 91–101. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_6
 42. Skuza L. // *Methods Mol. Biol.* 2022. V. 2392. P. 83–91. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1799-1_6
 43. Ширшиков Ф.В., Пеков Ю.А., Карпец П.Ю., Мирошников К.А. // Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ RU 2018616252, 2018.
 44. Shirshikov F.V., Pekov Y.A., Miroshnikov K.A. // *PeerJ.* 2019. V. 7. P. e6801. <https://doi.org/10.7717/peerj.6801>
 45. Elbe S., Buckland-Merrett G. // *Glob. Chall.* 2017. V. 1. P. 33–46. <https://doi.org/10.1002/gch2.1018>
 46. Chen A.T., Altschuler K., Zhan S.H., Chan Y.A., Deverman B.E. // *eLife.* 2021. V. 10. P. e63409. <https://doi.org/10.7554/elife.63409>
 47. Tamana E., Zhang Y., Tanner N.A. // *PLoS One.* 2022. V. 17. P. e0259610. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259610>
 48. Nazina T.N., Tourova T.P., Poltarau A.B., Novikova E.V., Grigoryan A.A., Ivanova A.E., Lysenko A.M., Petrunyaka V.V., Osipov G.A., Belyaev S.S., Ivanov M.V. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001. V. 51. P. 433–446. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-2-433>
 49. Coorevits A., Dinsdale A.E., Halket G., Lebbe L., De Vos P., Van Landschoot A., Logan N.A. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012. V. 62. P. 1470–1485. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.030346-0>
 50. Oscorbin I.P., Boyarskikh U.A., Filipenko M.L. // *Mol. Biotechnol.* 2015. V. 57. P. 947–959. <https://doi.org/10.1007/s12033-015-9886-x>
 51. Jackson L.N., Chim N., Shi C., Chaput J.C. // *Nucleic Acids Res.* 2019. V. 47. P. 6973–6983. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz513>
 52. Oscorbin I.P., Belousova E.A., Boyarskikh U.A., Zakabunin A.I., Khrapov E.A., Filipenko M.L. // *Nucleic*

- Acids Res. 2017. V. 45. P. 9595–9610.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx645>
53. Xiao X., Li H., Zhao L., Zhang Y., Liu Z. // *Biomed. Pharmacother.* 2021. V. 143. P. 112232.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112232>
54. Murali R., Sharkey D.J., Daiss J.L., Murthy H.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 12562–12567.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12562>
55. Moser M.J., DiFrancesco R.A., Gowda K., Klingele A.J., Sugar D.R., Stocki S., Mead D.A., Schoenfeld T.W. // *PLoS One.* 2012. V. 7. P. e38371.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038371>
56. Chander Y., Koelbl J., Puckett J., Moser M.J., Klingele A.J., Liles M.R., Carrias A., Mead D.A., Schoenfeld T.W. // *Front. Microbiol.* 2014. V. 5. P. 395.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00395>
57. Piotrowski Y., Gurung M.K., Larsen A.N. // *BMC Mol. cell Biol.* 2019. V. 20. P. 31.
<https://doi.org/10.1186/s12860-019-0216-1>
58. Perbal B. // *Retrovirology.* 2008. V. 5. P. 49.
<https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-49>
59. Rittié L., Perbal B. // *J. Cell Commun. Signal.* 2008. V. 2. P. 25–45.
<https://doi.org/10.1007/s12079-008-0026-2>
60. Alekseenko A., Barrett D., Pareja-Sanchez Y., Howard R.J., Strandback E., Ampah-Korsah H., Rovšnik U., Zuniga-Veliz S., Klenov A., Malloo J., Ye S., Liu X., Reinius B., Elsässer S.J., Nyman T., Sandh G., Yin X., Pelechano V. // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. P. 1820.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-80352-8>
61. Li Y., Wan Z., Hu Y., Zhou Y., Chen Q., Zhang C. // *Biotechniques.* 2019. V. 66. P. 225–230.
<https://doi.org/10.2144/btn-2018-0184>
62. Zhou Y., Wan Z., Yang S., Li Y., Li M., Wang B., Hu Y., Xia X., Jin X., Yu N., Zhang C. // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 1056.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01056>
63. Lu R., Wu X., Wan Z., Li Y., Zuo L., Qin J., Jin X., Zhang C. // *Virol. Sin.* 2020. V. 35. P. 344–347.
<https://doi.org/10.1007/s12250-020-00218-1>
64. Bokelmann L., Nickel O., Maricic T., Pääbo S., Meyer M., Borte S., Riesenberger S. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. P. 1467.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-21627-0>
65. Natoli M.E., Kundrod K.A., Chang M.M., Smith C.A., Paul S., Coole J.B., Butlin N.G., Tanner N.A., Baker E., Schmeler K.M., Richards-Kortum R. // *J. Biomol. Tech.* 2021. V. 32. P. 180–185.
<https://doi.org/10.7171/jbt.21-3203-013>
66. Hsieh K., Mage P.L., Csordas A.T., Eisenstein M., Soh H.T. // *Chem. Commun. (Camb).* 2014. V. 50. P. 3747–3749.
<https://doi.org/10.1039/c4cc00540f>
67. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Židek A., Potapenko A., Bridgland A., Meyer C., Kohl S.A.A., Ballard A.J., Cowie A., Romera-Paredes B., Nikolov S., Jain R., Adler J., Back T., Petersen S., Reiman D., Clancy E., Zielinski M., Steinegger M., Pacholska M., Berghammer T., Bodenstein S., Silver D., Vinyals O., Senior A.W., Kavukcuoglu K., Kohli P., Hassabis D. // *Nature.* 2021. V. 596. P. 583–589.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
68. Coulther T.A., Stern H.R., Beuning P.J. // *Trends Biotechnol.* 2019. V. 37. P. 1091–1103.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.03.011>
69. Nikoomezar A., Chim N., Yik E.J., Chaput J.C. // *Q. Rev. Biophys.* 2020. V. 53. P. e8.
<https://doi.org/10.1017/s0033583520000050>
70. Milligan J.N., Shroff R., Garry D.J., Ellington A.D. // *Biochemistry.* 2018. V. 57. P. 4607–4619.
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00200>
71. Paik I., Ngo P.H.T., Shroff R., Diaz D.J., Maranhao A.C., Walker D.J.F., Bhadra S., Ellington A.D. // *Biochemistry.* 2021.
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00451>
72. Paik I., Bhadra S., Ellington A.D. // *ACS Synth. Biol.* 2022. V. 11. P. 1488–1496.
<https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00559>
73. Hu L.X., Yang Z.H., Zhang D., Zhao D.M., Zhu J.H. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2016. V. 63. P. 289–296.
<https://doi.org/10.1111/lam.12618>
74. Rodriguez-Manzano J., Karymov M.A., Begolo S., Selck D.A., Zhukov D. V., Jue E., Ismagilov R.F. // *ACS Nano.* 2016. V. 10. P. 3102–3113.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.5b07338>
75. Garcia-Bernalt Diego J., Fernández-Soto P., Crego-Vicente B., Alonso-Castrillejo S., Febrer-Sendra B., Gómez-Sánchez A., Vicente B., López-Abán J., Muro A. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 14744.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-51342-2>
76. Ignatov K., Kramarov V. // *Patent US 9896671 B2,* 2018.
77. Ignatov K.B., Barsova E.V., Fradkov A.F., Blagodatskikh K.A., Kramarova T.V., Kramarov V.M. // *Biotechniques.* 2014. V. 57. P. 81–87.
<https://doi.org/10.2144/000114198>
78. Varlamov D.A., Blagodatskikh K.A., Smirnova E.V., Kramarov V.M., Ignatov K.B. // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020. V. 8. P. 604793.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.604793>
79. Barnes W.M., Zhang Z., Kermekchiev M.B. // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020. V. 8. P. 553474.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.553474>
80. Arezi B., McKinney N., Hansen C., Cayouette M., Fox J., Chen K., Lapira J., Hamilton S., Hogrefe H. // *Front. Microbiol.* 2014. V. 5. P. 408.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00408>
81. Ouaray Z., Singh I., Georgiadis M.M., Richards N.G.J. // *Protein Sci.* 2020. V. 29. P. 455–468.
<https://doi.org/10.1002/pro.3762>
82. Ouaray Z., Benner S.A., Georgiadis M.M., Richards N.G.J. // *J. Biol. Chem.* 2020. V. 295. P. 17046–17059.
<https://doi.org/10.1074/jbc.rev120.013745>
83. Verosloff M., Chappell J., Perry K.L., Thompson J.R., Lucks J.B. // *ACS Synth. Biol.* 2019. V. 8. P. 902–905.
<https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00526>
84. Zhang Y., Ren G., Buss J., Barry A.J., Patton G.C., Tanner N.A. // *Biotechniques.* 2020. V. 69. P. 178–185.
<https://doi.org/10.2144/btn-2020-0078>
85. Vasudevamurthy M.K., Lever M., George P.M., Morrison K.R. // *Biopolymers.* 2009. V. 91. P. 85–94.
<https://doi.org/10.1002/bip.21085>
86. Ma C., Wang Y., Zhang P., Shi C. // *Anal. Biochem.* 2017. V. 530. P. 1–4.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.04.017>
87. Cobb B.D., Clarkson J.M. // *Nucleic Acids Res.* 1994. V. 22. P. 3801–3805.
<https://doi.org/10.1093/nar/22.18.3801>

88. *Thanakiatkrai P., Welch L.* // *Int. J. Legal Med.* 2012. V. 126. P. 161–165.
<https://doi.org/10.1007/s00414-011-0558-5>
89. *Morero M., Ramirez M.R., Oyhenart J.* // *Vet. Parasitol.* 2021. V. 295. P. 109462.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109462>
90. *Oscorbin I.P., Belousova E.A., Zakabunin A.I., Boyarskikh U.A., Filipenko M.L.* // *Biotechniques.* 2016. V. 61. P. 20–25.
<https://doi.org/10.2144/000114432>
91. *Quyen T.L., Ngo T.A., Bang D.D., Madsen M., Wolff A.* // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 2234.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02234>
92. *Phillips E.A., Moehling T.J., Bhadra S., Ellington A.D., Linnes J.C.* // *Anal. Chem.* 2018. V. 90. P. 6580–6586.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00269>
93. *Li J., Macdonald J., von Stetten F.* // *Analyst.* 2019. V. 144. P. 31–67.
<https://doi.org/10.1039/c8an01621f>
94. *Scott A.T., Layne T.R., O'Connell K.C., Tanner N.A., Landers J.P.* // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. P. 13343–13353.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02666>
95. *Varona M., Anderson J.L.* // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. P. 6991–6995.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01762>
96. *Goto M., Honda E., Ogura A., Nomoto A., Hanaki K.-I.* // *Biotechniques.* 2009. V. 46. P. 167–172.
<https://doi.org/10.2144/000113072>
97. *Nguyen H.Q., Nguyen V.D., Van Nguyen H., Seo T.S.* // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. P. 15123.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-72095-3>
98. *Wang X., Fu Z., Chen X., Peng C., Xu X., Wei W., Li F., Xu J.* // *Anal. Bioanal. Chem.* 2017. V. 409. P. 881–889.
<https://doi.org/10.1007/s00216-016-0084-x>
99. *Tanner N.A., Zhang Y., Evans T.C.* // *Biotechniques.* 2015. V. 58. P. 59–68.
<https://doi.org/10.2144/000114253>
100. *Jaroenram W., Cecere P., Pompa P.P.* // *J. Microbiol. Methods.* 2019. V. 156. P. 9–14.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.11.020>
101. *Brown T.A., Schaefer K.S., Tsang A., Yi H.A., Grimm J.B., Lemire A.L., Jradi F.M., Kim C., McGowan K., Ritola K., Armstrong D.T., Mostafa H.H., Korff W., Vale R.D., Lavis L.D.* // *J. Biomol. Tech.* 2021. V. 32. P. 121–133.
<https://doi.org/10.7171/jbt.21-3203-007>
102. *Dao Thi V.L., Herbst K., Boerner K., Meurer M., Kremer L.P., Kirmmaier D., Freistaedter A., Papagiannidis D., Galmozzi C., Stanifer M.L., Boulant S., Klein S., Chlanda P., Khalid D., Barreto Miranda I., Schnitzler P., Kräusslich H.G., Knop M., Anders S.* // *Sci. Transl. Med.* 2020. V. 12. P. eabc7075.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc7075>
103. *Fischbach J., Xander N.C., Frohme M., Glöckler J.F.* // *Biotechniques.* 2015. V. 58. P. 189–194.
<https://doi.org/10.2144/000114275>
104. *Miyamoto S., Sano S., Takahashi K., Jikihara T.* // *Anal. Biochem.* 2015. V. 473. P. 28–33.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.12.016>
105. *Lucchi N.W., Ljolje D., Silva-Flannery L., Udhayakumar V.* // *PLoS One.* 2016. V. 11. P. e0151437.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151437>
106. *Thapa J., Maharjan B., Malla M., Fukushima Y., Poudel A., Pandey B.D., Hyashida K., Gordon S.V., Nakajima C., Suzuki Y.* // *Tuberculosis (Edinb).* 2019. V. 117. P. 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.tube.2019.05.004>
107. *Liu W., Huang S., Liu N., Dong D., Yang Z., Tang Y., Ma W., He X., Ao D., Xu Y., Zou D., Huang L.* // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 40125.
<https://doi.org/10.1038/srep40125>
108. *Sherrill-Mix S., Hwang Y., Roche A.M., Glascock A., Weiss S.R., Li Y., Haddad L., Deraska P., Monahan C., Kromer A., Graham-Wooten J., Taylor L.J., Abella B.S., Ganguly A., Collman R.G., Van Duyn G.D., Bushman F.D.* // *Genome Biol.* 2021. V. 22. P. 169.
<https://doi.org/10.1186/s13059-021-02387-y>
109. *Liang R., Liang L., Ren X., Jia Y., Han K., Zhao J., Song C., Cui S.* // *Arch. Virol.* 2021. V. 166. P. 1599–1605.
<https://doi.org/10.1007/s00705-021-04963-w>
110. *Hardinge P., Murray J.A.H.* // *BMC Biotechnol.* 2019. V. 19. P. 55.
<https://doi.org/10.1186/s12896-019-0549-z>
111. *Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T.* // *Clin. Chem.* 2009. V. 55. P. 611–622.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
112. *Schoepp N.G., Schlappi T.S., Curtis M.S., Butkovich S.S., Miller S., Humphries R.M., Ismagilov R.F.* // *Sci. Transl. Med.* 2017. V. 9. P. eaal3693.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aal3693>
113. *Subramanian S., Gomez R.D.* // *PLoS One.* 2014. V. 9. P. e100596.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100596>
114. *Huggett J.F., Foy C.A., Benes V., Emslie K., Garson J.A., Haynes R., Hellemans J., Kubista M., Mueller R.D., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T., Bustin S.A.* // *Clin. Chem.* 2013. V. 59. P. 892–902.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.206375>
115. *Salipante S.J., Jerome K.R.* // *Clin. Chem.* 2020. V. 66. P. 117–123.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2019.304048>
116. *Khorosheva E.M., Karymov M.A., Selck D.A., Ismagilov R.F.* // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. P. e10.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv877>
117. *Schuler F., Siber C., Hin S., Wadle S., Paust N., Zengerle R., von Stetten F.* // *Anal. Methods.* 2016. V. 8. P. 2750–2755.
<https://doi.org/10.1039/C6AY00600K>
118. *Wong Y.-P., Othman S., Lau Y.-L., Radu S., Chee H.-Y.* // *J. Appl. Microbiol.* 2018. V. 124. P. 626–643.
<https://doi.org/10.1111/jam.13647>
119. *Land K.J., Boeras D.I., Chen X.-S., Ramsay A.R., Peeling R.W.* // *Nat. Microbiol.* 2019. V. 4. P. 46–54.
<https://doi.org/10.1038/s41564-018-0295-3>
120. *Coole J., Kortum A., Tang Y., Vohra I., Maker Y., Kundrod K., Natoli M., Richards-Kortum R.* // *J. Vis. Exp.* 2021. V. 168. P. 1–14.
<https://doi.org/10.3791/62148>
121. *Мезин А.В., Наумов С.А., Прусаков К.А., Назаренко К.А., Алдаров К.Г., Бажутов М.Н., Наумов А.Ю., Ильина Е.Н., Говорун В.М., Басманов Д.В.* // Патент RU 210215 U1, 2022.
122. *Phillips E.A., Moehling T.J., Ejendal K.F.K., Hoilett O.S., Byers K.M., Basing L.A., Jankowski L.A., Bennett J.B., Lin L.-K., Stanciu L.A., Linnes J.C.* // *Lab Chip.* 2019. V. 19. P. 3375–3386.
<https://doi.org/10.1039/c9lc00506d>
123. *Priye A., Bird S.W., Light Y.K., Ball C.S., Negrete O.A., Meagher R.J.* // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 44778.
<https://doi.org/10.1038/srep44778>

124. Fu Y., Duan X., Huang J., Huang L., Zhang L., Cheng W., Ding S., Min X. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 5955. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42542-x>
125. Ding X., Wang G., Mu Y. // *Anal. Chim. Acta.* 2019. V. 1081. P. 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.07.055>
126. Mitani Y., Lezhava A., Kawai Y., Kikuchi T., Oguchi-Katayama A., Kogo Y., Itoh M., Miyagi T., Takakura H., Hoshi K., Kato C., Arakawa T., Shibata K., Fukui K., Masui R., Kuramitsu S., Kiyotani K., Chalk A., Tsunekawa K., Murakami M., Kamataki T., Oka T., Shimada H., Cizdziel P.E., Hayashizaki Y. // *Nat. Methods.* 2007. V. 4. P. 257–262. <https://doi.org/10.1038/nmeth1007>
127. Itonaga M., Matsuzaki I., Warigaya K., Tamura T., Shimizu Y., Fujimoto M., Kojima F., Ichinose M., Murata S.-I. // *PLoS One.* 2016. V. 11. P. e0151654. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151654>
128. Cao G., Kong J., Xing Z., Tang Y., Zhang X., Xu X., Kang Z., Fang X., Guan M. // *Anal. Chim. Acta.* 2018. V. 1024. P. 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.022>
129. Paul R., Ostermann E., Wei Q. // *Biosens. Bioelectron.* 2020. V. 169. P. 112592. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112592>
130. Mason M.G., Botella J.R. // *Nat. Protoc.* 2020. V. 15. P. 3663–3677. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0392-7>
131. Nagura-Ikeda M., Imai K., Tabata S., Miyoshi K., Murahara N., Mizuno T., Horiuchi M., Kato K., Imoto Y., Iwata M., Mimura S., Ito T., Tamura K., Kato Y. // *J. Clin. Microbiol.* 2020. V. 58. P. e01438-20. <https://doi.org/10.1128/jcm.01438-20>
132. Fakheran O., Dehghannejad M., Khademi A. // *Infect. Dis. Poverty.* 2020. V. 9. P. 100. <https://doi.org/10.1186/s40249-020-00728-w>
133. Kellner M.J., Koob J.G., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Zhang F. // *Nat. Protoc.* 2019. V. 14. P. 2986–3012. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0210-2>
134. Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Lee J.W., Essletzbichler P., Dy A.J., Joung J., Verdine V., Donghia N., Daringer N.M., Freije C.A., Myhrvold C., Bhattacharyya R.P., Livny J., Regev A., Koonin E.V., Hung D.T., Sabeti P.C., Collins J.J., Zhang F. // *Science.* 2017. V. 356. P. 438–442. <https://doi.org/10.1126/science.aam9321>
135. Li S.-Y., Cheng Q.-X., Wang J.-M., Li X.-Y., Zhang Z.-L., Gao S., Cao R.-B., Zhao G.-P., Wang J. // *Cell Discov.* 2018. V. 4. P. 20. <https://doi.org/10.1038/s41421-018-0028-z>
136. Chen J.S., Ma E., Harrington L.B., Da Costa M., Tian X., Palefsky J.M., Doudna J.A. // *Science.* 2018. V. 360. P. 436–439. <https://doi.org/10.1126/science.aar6245>
137. Butler D., Mozsary C., Meydan C., Foux J., Rosiene J., Shaiber A., Danko D., Afshinnekoo E., MacKay M., Sedlazeck F.J., Ivanov N.A., Sierra M., Pohle D., Zietz M., Gisladdottir U., Ramlall V., Sholle E.T., Schenck E.J., Westover C.D., Hassan C., Ryon K., Young B., Bhattacharya C., Ng D.L., Granados A.C., Santos Y.A., Servellita V., Federman S., Ruggiero P., Functammasan A., Chin C.S., Pearson N.M., Langhorst B.W., Tanner N.A., Kim Y., Reeves J.W., Hether T.D., Warren S.E., Bailey M., Gawrys J., Meleshko D., Xu D., Couto-Rodriguez M., Nagy-Szakal D., Barrows J., Wells H., O'Hara N.B., Rosenfeld J.A., Chen Y., Steel P.A.D., Shemesh A.J., Xiang J., Thierry-Mieg J., Thierry-Mieg D., Ifner A., Bezdán D., Sanchez E., Campion T.R., Jr., Siple J., Cong L., Craney A., Velu P., Melnick A.M., Shapira S., Hajirasouliha I., Borczuk A., Ifner T., Salvatore M., Loda M., Westblade L.F., Cushing M., Wu S., Levy S., Chiu C., Schwartz R.E., Tatonetti N., Rennert H., Imielinski M., Mason C.E. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. P. 1660. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21361-7>
138. Vandenberg O., Martiny D., Rochas O., van Belkum A., Kozlakidis Z. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2021. V. 19. P. 171–183. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00461-z>

Loop-Mediated Isothermal Amplification: From Theory to Practice

F. V. Shirshikov*, # and J. A. Bespyatykh*

#Phone: +7 (906) 114-70-00; e-mail: shrshkv@ya.ru

*Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, ul. Malaya Pirogovskaya 1A, Moscow, 119435 Russia

Increasing the accuracy of pathogen identification and reducing the duration of analysis remain relevant for modern molecular diagnostics up to this day. In laboratory and clinical practice, methods of nucleic acid amplification are most in demand for the detection of pathogens, among which polymerase chain reaction (PCR) is considered the “gold standard”. Nevertheless, in some cases, a group of isothermal amplification methods acts as an alternative to PCR diagnostics. For more than thirty years of the development of isothermal DNA synthesis, the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) allows to try new directions of in-field diagnostics of bacterial and viral infections. This review examines the key characteristics of the LAMP method and corresponding features in practice. We clarify the structure of LAMP amplicons with single-stranded loops, which have the annealing sites for primers under isothermal conditions. The latest achievements in the modification of the LAMP method are analyzed, which make it possible to consider it as a unique platform for creating a next-generation diagnostic assays.

Keywords: loop-mediated isothermal amplification, LAMP, primer design, amplicon



УДК 544.527.2:547.382.3:577.161.19:577.344

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФТОРФЕНИЛЬНОГО АНАЛОГА РЕТИНАЛЯ С ПРОТЕОРОДОПСИНОМ ИЗ *Exiguobacterium sibiricum*

© 2022 г. Н. Е. Беликов*, Л. Е. Петровская**, Е. А. Крюкова**,
Д. А. Долгих**, ***, Е. П. Лукашев***, А. Ю. Лукин****, О. В. Демина*,
С. Д. Варфоломеев*, В. В. Чупин*****, А. А. Ходонов*,#

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

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

***ФГБОУ ВО “Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова”, биологический факультет, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

****ФГБОУ ВО МИРЕА – Российский технологический университет, Россия, 119571 Москва, просп. Вернадского, 78

*****ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт, Россия, 141701 Долгопрудный, Институтский пер., 9

Поступила в редакцию 12.04.2022 г.

После доработки 07.05.2022 г.

Принята к публикации 31.05.2022 г.

Разработан альтернативный вариант метода синтеза аналога природного ретиналя, у которого триметилциклогексеновое кольцо молекулы замещено на *n*-фторфенильный фрагмент. Показано, что предложенная нами схема синтеза целевого соединения с использованием C_5 -фосфоната с терминальной нитрильной группой в условиях реакции Хорнера–Эммонса более эффективна и дает более высокий суммарный выход целевого продукта, чем вариант синтеза, описанный нами ранее. Разработана процедура получения аналога микробного протеородопсина ESRh из *Exiguobacterium sibiricum* с модифицированным хромофором. Установлено, что, как и в случае бактериородопсина из *Halobacterium salinarum*, замена триметилциклогексенового кольца в природном хромофоре на *n*-фторфенильный фрагмент не блокирует возможность образования из протеородопсина ESRh искусственного пигмента F-Phe-ESRh, сохраняющего цикл фотохимических реакций. Обнаружены определенные различия в свойствах нативного рекомбинантного ESRh и его аналога F-Phe-ESRh, включающие сдвиг максимума поглощения в коротковолновую область, образование интермедиата М при более низких значениях рН, наличие “долгоживущего М” и общее замедление фотоцикла. Также была продемонстрирована пониженная стабильность полученного аналога протеородопсина F-Phe-ESRh к продолжительному воздействию видимого света.

Ключевые слова: ESRh микробный протеородопсин из *Exiguobacterium sibiricum*, аналоги ретиналя, олефинирование по Хорнеру–Эммонсу

DOI: 10.31857/S0132342322060070

ВВЕДЕНИЕ

Ретиналь-содержащие белки играют ключевую роль в ряде важнейших биологических процессов: зрении, светозависимом транспорте протонов и других ионов (хлора, натрия), фототаксисе. Ретиналь-содержащие белки подразделяются на несколько семейств, основные из которых — зрительные пигменты палочек и колбочек высших животных и микробные родопсины. Более

1000 представителей этих хромопротеинов были найдены во всех биологических царствах — от высших животных до архей, грибов, водорослей, зубактерий и вирусов [1–3].

Молекулы ретиналь-содержащих белков имеют следующие общие особенности: 1) они представляют собой мембранные белки, состоящие из семи α -спиральных трансмембранных тяжей (7ТМ), соединенных между собой петлями; 2) в качестве хромофорной группы они содержат определенный изомер альдегида витамина А — ретиналя (*all-E*- в пигментах микроорганизмов и *11Z*- в зрительных пигментах), который соединен с белком через протонированную альдиминную связь с ϵ -аминогруппой остатка Lys; 3) их общая функция связана с преобразованием энергии све-

Сокращения: BRh — бактериородопсин; ESRh — микробный родопсин *Exiguobacterium sibiricum*; F-Phe-ESRh — искусственный родопсин ESRh, у которого природный ретиналь заменен на фторфенильный аналог; DIBAH — диизобутилалюмогидрид; DDM — *n*-додецил- β -D-мальтопиранозид.

Автор для связи (тел.: +7 (495) 939-71-48; эл. почта: khodonov@gmail.com).

тового кванта в различные химические или физиологические ответы [1–6].

В 2022 г. исполнилось 17 лет с начала “эры оптогенетики” (нейробиофотоники), цель которой состоит в использовании генетически кодируемых фоточувствительных белков для регуляции активности клеток человека и животных. Для реализации этого перспективного направления исследований необходимо создание технологий получения фотопереключаемых компонентов для оптогенетики с заданными и/или прогнозируемыми спектрально-кинетическими параметрами на основе новых модифицированных микробных родопсинов и других фоточувствительных белков [5, 6].

Направленные изменения фотохимических свойств ретиналь-содержащих белков могут быть достигнуты путем использования следующих подходов: 1) замещением одного или нескольких аминокислотных остатков в определенных положениях молекулы белка методами сайт-специфичного мутагенеза; 2) замещением остатка природного ретиналя на его различные аналоги; 3) сочетанием вышеперечисленных методов.

Один из возможных вариантов исследования взаимосвязи структура–функция в ретиналь-содержащих белках заключается в замене природного хромофора на его аналоги и всестороннее изучение свойств новых гибридных продуктов [7–14]. Аналоги нативного хромофора уже дали ценную структурную, спектроскопическую и функциональную информацию о структуре основного состояния хромофора в микробных родопсинах до того, как стали доступны 3D-структуры этих молекул с высоким разрешением, и продолжают широко использоваться для определения структуры промежуточных продуктов их фотоциклов. Процедура направленной модификации хромофора позволяет варьировать в широких пределах как положение максимума поглощения основного состояния пигмента, так и другие важные фотохимические параметры.

Таким образом, замена природного ретиналя на его аналоги – один из наиболее перспективных подходов к изучению особенностей участка связывания хромофора у различных семейств микробных родопсинов. Успешное применение данного метода было продемонстрировано для хорошо изученного светозависимого протонного насоса бактериородопсина (BRh) из экстремально галофильного микроорганизма *Halobacterium salinarum*, на котором в течение последних 40 лет был апробирован широкий арсенал современных методов исследования для определения взаимосвязи структура–функция. Искусственные аналоги BRh были получены с целым рядом модификаций молекулы его хромофора [7, 8].

Объект настоящего исследования – протеорродопсин (ESRh) – это новый представитель рети-

наль-содержащих белков из психротрофного микроорганизма *Exiguobacterium sibiricum*, ген которого был выделен из образцов почвы вечной мерзлоты возрастом 3 млн лет [15]. Протеорродопсин (ESRh) по своей структуре представляет собой мембранный белок, функционирующий как светозависимый протонный насос. Пространственная 3D-структура ESRh с разрешением 2.3 Å (PDB: 4HYJ) была впервые исследована группой ученых под руководством В. Горделия (Институт структурной биологии, Гренобль, МФТИ). Установлено, что ESRh обладает структурой, типичной для семейства ретиналь-содержащих белков, включая наличие семи α -спиральных сегментов и молекулы ретиналя в *all-E*-конфигурации, ковалентно связанной с остатком K225 посредством протонированной альдиминной связи [16].

К особенностям строения протеорродопсина ESRh относятся: 1) наличие нестандартного донора протонов для основания Шиффа – остатка K96 – и его расположение в гидрофобной полости ближе к поверхности белка; 2) нарушение α -спиральной структуры в средней части спирали F; 3) наличие водородной связи между остатками H57 и D85; 4) наличие ряда специфических особенностей фотоцикла ESRh, включая освобождение протона на поздних стадиях фотоцикла, ускоренное образование M-подобного интермедиата и сдвиг его рК в щелочную область pH; 5) отсутствие спектральных различий в формах ESRh, адаптированных к свету и темноте.

Большое число работ было посвящено изучению механизма функционирования ESRh и его мутантных вариантов [15–22], однако исследования, связанные с заменой хромофорной группы, ранее не проводились и являются пионерскими.

Существование ряда отличий в механизмах фотоцикла и протонного транспорта ESRh от других ретиналь-содержащих белков делает интересным и актуальным сравнительное изучение влияния типа модификации их хромофорных групп на спектральные параметры этих белков и на их функционирование [8, 22].

Для исследования влияния природы хромофорной группы ESRh на его функционирование и структуру в настоящей статье нами представлены: 1) альтернативный метод синтеза фторфенильного аналога ретиналя (II); 2) результаты изучения процесса взаимодействия аналога ретиналя (II) с апобелком ESR-опсином из *E. sibiricum*; 3) фотохимические характеристики полученного искусственно-го пигмента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез фторфенильного аналога ретиналя (II). В данной работе для модификации ESRh нами был выбран фторфенильный аналог ретиналя

(II), поскольку ранее он был успешно использован для получения фторфенильного аналога BRh из *H. salinarum* [23]. Кроме того, присутствие атома фтора в *n*-фторфенильном фрагменте открывает возможность использования метода ЯМР-спектроскопии на ядрах ^{19}F для изучения структуры этого белка. Проведенное в работе Драчева с соавт. [24] исследование цикла фотореакций фторфенильного аналога BRh показало, что хотя этот искусственный пигмент и сохранил эффективность фотоцикла на уровне $\sim 50\%$ от эффективности цикла природного BRh, но у него

была на несколько порядков замедлена обратная реакция свето-темновой адаптации.

В указанных работах [22, 23] *all-E*- и *13Z*-изомеры фторфенильного аналога ретиноида (II) были синтезированы при помощи 4-стадийной процедуры наращивания полиеновой цепи ретиноида с использованием в качестве ключевой стадии реакции олефинирования по Виттигу карбонильного C_{10} -предшественника (IV) с илидом, генерированным из 4-фторбензилтрифенилфосфоний-бромидом (III), с суммарным выходом 41% (схема 1).

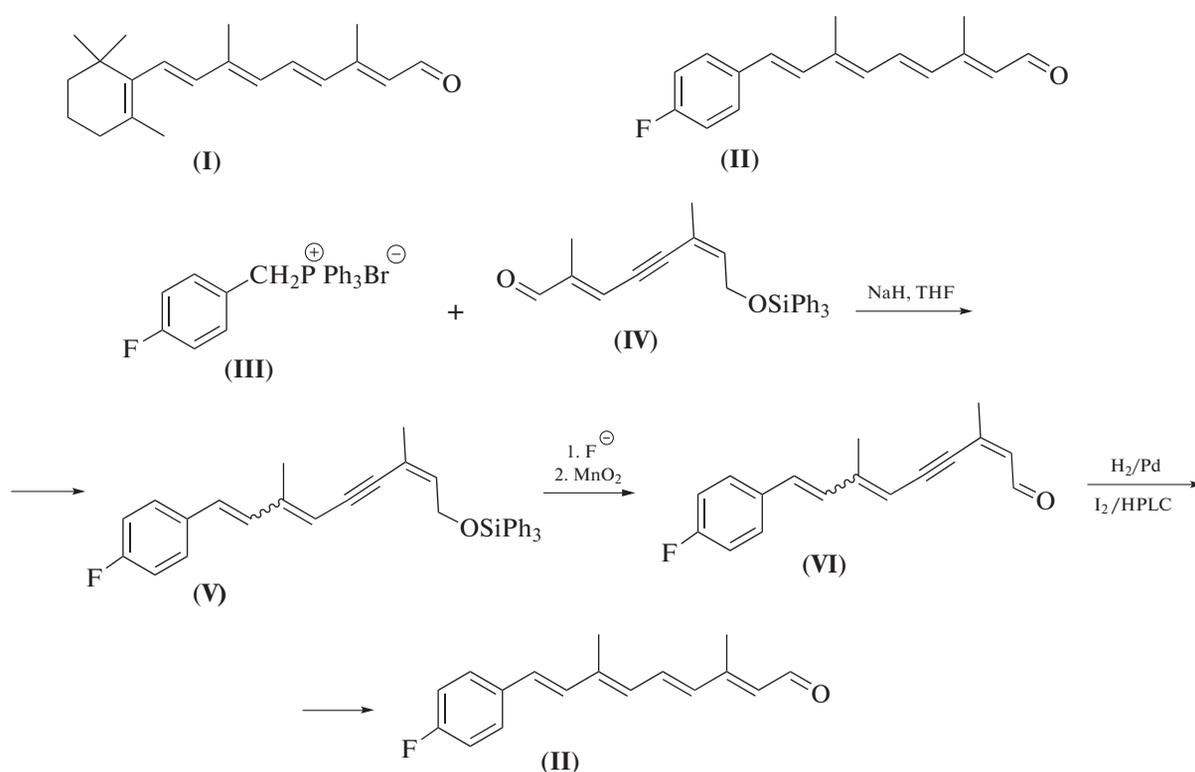


Схема 1. Синтез целевого ретиноида (II) при помощи реакции олефинирования карбонильных соединений по Виттигу.

В настоящей работе нами был предложен и исследован альтернативный классический вариант наращивания полиеновой цепи ретиноида оле-

финированием исходного альдегида (XIV) анионом C_5 -фосфоната (XIIIa, b) в условиях реакции Хорнера–Эммонса (схемы 2, 3) [7, 25–29].

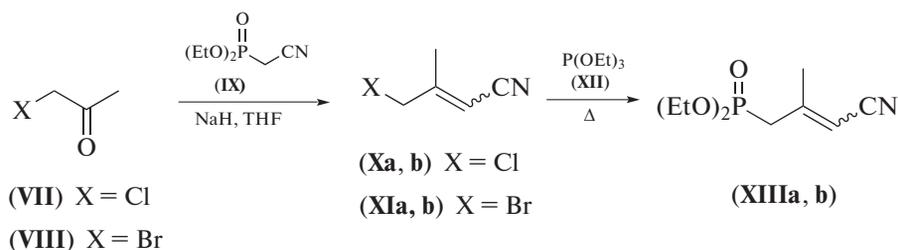


Схема 2. Синтез C_5 -фосфоната (XIIIa, b) с терминальной нитрильной группой.

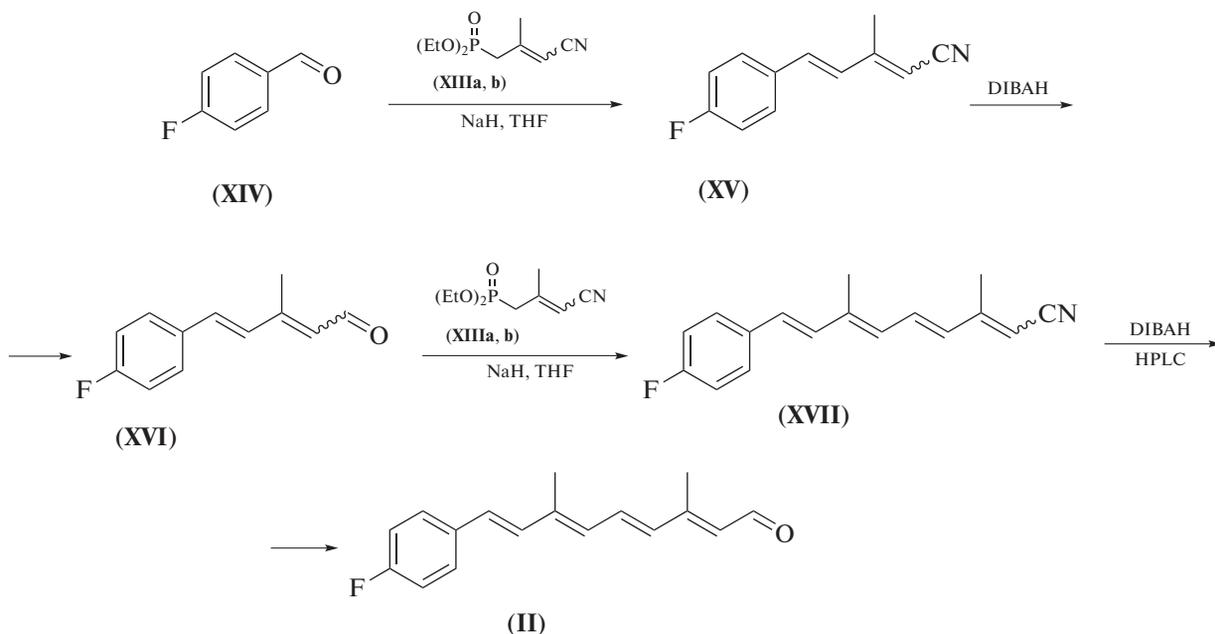


Схема 3. Синтез целевого ретиноида (II) при помощи реакции олефинирования карбонильных соединений по Хорнеру–Эммонсу.

Сравнение двух синтетических подходов к получению целевого ретиноида (II). Для решения задачи создания системы сопряженных двойных связи в полиеновой цепи молекулы ретиноида (II) ранее [22, 23] и в рамках настоящего исследования в качестве ключевых реакций были использованы два варианта реакции олефинирования карбонильных соединений: 1) реакция олефинирования по Виттигу (схема 1); 2) реакция олефинирования по Хорнеру–Эммонсу (схема 3).

Ниже представлена критическая оценка преимуществ и недостатков двух синтетических подходов к получению целевого ретиноида (II), изображенных на схемах 1 и 3.

Схема 1 (ключевая стадия – реакция олефинирования по Виттигу):

- 1) выход – высокий;
- 2) стереоселективность вновь образованной двойной связи – низкая, образуется смесь *E*- и *Z*-изомеров (1 : 1);
- 3) трудноотделяемый побочный продукт – трифенилфосфиноксид;
- 4) необходимость применения препаративной ВЭЖХ – да;
- 5) проблема потери регио- и стереоселективности процедуры полувосстановления тройной связи потребовала дополнительных исследований;
- 6) требуется дополнительная стадия – изомеризация 13*Z*-изомера под действием иода.

Схема 3 (ключевая стадия – реакция олефинирования по Хорнеру–Эммонсу):

- 1) выход – высокий;

- 2) стереоселективность вновь образованной двойной связи – высокая (98% *E*-изомера);

- 3) необходимость применения препаративной ВЭЖХ – да;

- 4) необходимость разработки и поиска оптимальной процедуры синтеза C_5 -фосфоната (XIIIa, b).

Таким образом, для схем синтеза 1 и 3 характерно наличие высокого выхода желаемого продукта, а также использование препаративной ВЭЖХ для получения индивидуальных соединений. Преимуществами схемы 3 являются высокая стереоселективность вновь образованной двойной связи (98%), а также разработка и оптимизация только одной синтетической процедуры, тогда как для схемы 1 существенными недостатками являются низкая стереоселективность вновь образованной двойной связи (*E*-/*Z*- 1 : 1), наличие трудноотделимого побочного продукта – трифенилфосфиноксида и разработка с последующей оптимизацией двух синтетических процедур.

Синтез C_5 -фосфоната (XIIIa, b) с терминальной нитрильной группой. Синтез исходного C_2 -фосфоната (IX) проводили конденсацией коммерчески доступного хлорацетонитрила с триэтилфосфитом (XII) по Арбузову. Выход соединения (IX) после перегонки составил 87%.

Для осуществления синтеза C_5 -фосфоната (XIIIa, b) были исследованы два пути, показанные на схеме 2. В качестве галогенкетона использовали коммерчески доступный хлорацетон (VII)

или бромацетон (VIII), синтезированный в одну стадию бромированием ацетона (выход 50%).

Конденсация кетона (VII) с C_2 -фосфонатом (IX) в условиях реакции Хорнера–Эммонса дает изомерную смесь галогенонитрила (Xa, b) с общим выходом 52%. Конденсация кетона (VIII) с C_2 -фосфонатом (IX) в тех же условиях приводит к образованию изомерной смеси галогенопроизводного (XIa, b) с общим выходом 30%. Низкий выход реакции по второму варианту, через бромкетон (VIII), объясняется его низкой стабильностью, поэтому выгоднее использовать хлорацетон (VII). Кроме того, бромосодержащий нитрил (XIa, b) обладает меньшей термостабильностью, чем соответствующий хлорозамещенный нитрил (Xa, b). Полученные галогенонитрилы (Xa, b) и (XIa, b) вводили в дальнейшие превращения без дополнительной очистки. Конденсация соединения (Xa, b) с триэтилфосфитом (XII) по Арбузову дает после перегонки изомерную смесь C_5 -фосфоната (XIIIa, b) с выходом 81%. Соотношение изомеров (XIIIa, b) (*E*-/*Z*- 60 : 40) было получено из данных 1H -ЯМР-спектра путем сравнения интегральной интенсивности сигналов метильных групп при δ 1.94 и 2.04 м.д. для *Z*- (XIIIb) и *E*- (XIIIa) изомеров соответственно. Однородность изомерной смеси (XIIIa, b) оценивали по данным ^{31}P -ЯМР-спектроскопии. ^{31}P -ЯМР-спектр содержит два сигнала, относящиеся к ядрам пентакоординированного фосфора при δ 23.8 и 23.0 м.д. в слабом поле (относительно внешнего стандарта – 85% H_3PO_4) для *E*- (XIIIa) и *Z*- (XIIIb) изомеров соответственно.

К сожалению, C_5 -синтон (XIIIa, b) не удалось получить, исходя из бромонитрила (XIa, b), из-за склонности последнего к полимеризации в условиях проведения реакции Арбузова.

Таким образом, нами было показано, что наиболее эффективный вариант синтеза C_5 -фосфоната (XIIIa, b) – путь в две стадии из коммерчески доступного хлорацетона (III). Параметры 1H - и ^{13}C -ЯМР-спектров для *E*- и *Z*-изомеров фосфоната (XIIIa, b) приведены в разделе “Эксперим. часть”.

Ключевые стадии синтеза фторфенильного аналога ретиналя (II) представлены на схеме 3. На первой стадии нами было осуществлено олефинирование по Хорнеру–Эммонсу исходного 4-фторбензальдегида (XIV) анионом C_5 -фосфонатного синтона с нитрильной терминальной полярной группой (XIIIa, b). В качестве основания при генерировании аниона C_5 -фосфоната использовали NaH в THF, при этом было показано, что в результате реакции Хорнера–Эммонса вновь образующаяся связь $C=C$ в продукте (XV) имела *E*-конфигурацию, что подтверждалось значениями констант спин-спинового взаимодействия (16.2 Гц). Затем следовала стадия восста-

новления нитрильной функции ДИВАН при температуре от -70 до $-80^\circ C$.

Повторение указанной последовательности операций – олефинирования альдегида (XVI) по Хорнеру–Эммонсу и последующего восстановления нитрильной функции у соединения (XVII) – приводила к получению целевого ретиноида (II) с общим выходом 47% на исходный альдегид (XIV). Индивидуальный *all-E*-изомер ретиноида (II) был выделен с чистотой 98–99% при помощи препаративной ВЭЖХ. Структура *all-E*-изомера соединения (II) была подтверждена набором физико-химических методов анализа (УФ-, 1H -ЯМР-спектроскопией и масс-спектрометрией). В 1H -ЯМР-спектре при наличии сигналов протонов, отвечающих *n*-замещенному ароматическому фрагменту (δ 7.03 и 7.42 м.д.), также были зарегистрированы полный набор дублетов протонов полиеновой цепи (δ 6.05–7.15 м.д.), сигнал протона альдегидной группы (дублет при δ 10.1 м.д. (J 8.2 Гц)) и два сигнала протонов двух метильных групп (при δ 2.10 и 2.35 м.д.), что строго подтверждало структуру целевого альдегида (II).

Масс-спектр содержал молекулярный ион ($[M^+]$ 256.1), соответствующий рассчитанному значению.

Таким образом, было показано, что схема синтеза *all-E*-изомера ретиноида (II) (схема 3) с использованием C_5 -фосфоната (XIIIa, b) с терминальной нитрильной группой более эффективна, чем вариант синтеза, использованный нами ранее [22, 23] (схема 1).

Протеородопсин (ESRh) и его аналог F-Phe-ESRh. Для получения препаратов рекомбинантного ESRh была использована сконструированная ранее система экспрессии в клетках *Escherichia coli*, обеспечивающая встраивание белка во внутреннюю мембрану бактерий [15]. Выделение целевого белка ESRh или его производного F-Phe-ESRh осуществляли после добавления природного хромофора *all-E*-ретиноля (I) или его фторфенильного аналога (II) к мембранной фракции клеток бактерий в мицеллах неионного детергента *n*-додецилмальтозида (DDM), обеспечивающего сохранение нативной конформации и функциональных свойств препаратов. Для очистки белка, содержащего *C*-концевую гексагистидиновую последовательность, был использован метод металл-аффинной хроматографии на никель-содержащей смоле (Ni-Sepharose FastFlow).

Электронные спектры поглощения препаратов (ESRh и его аналога F-Phe-ESRh). Образцы рекомбинантного ESRh и его аналога F-Phe-ESRh были получены двумя альтернативными путями: 1) добавлением к препарату апобелка ESRh, солиобилизованного в буфере А (0.2% DDM, 50 мМ NaH_2PO_4 , 200 мМ NaCl), pH 8.0, $20^\circ C$, 1.5 кратного молярного избытка *all-E*-ретиноля (I)

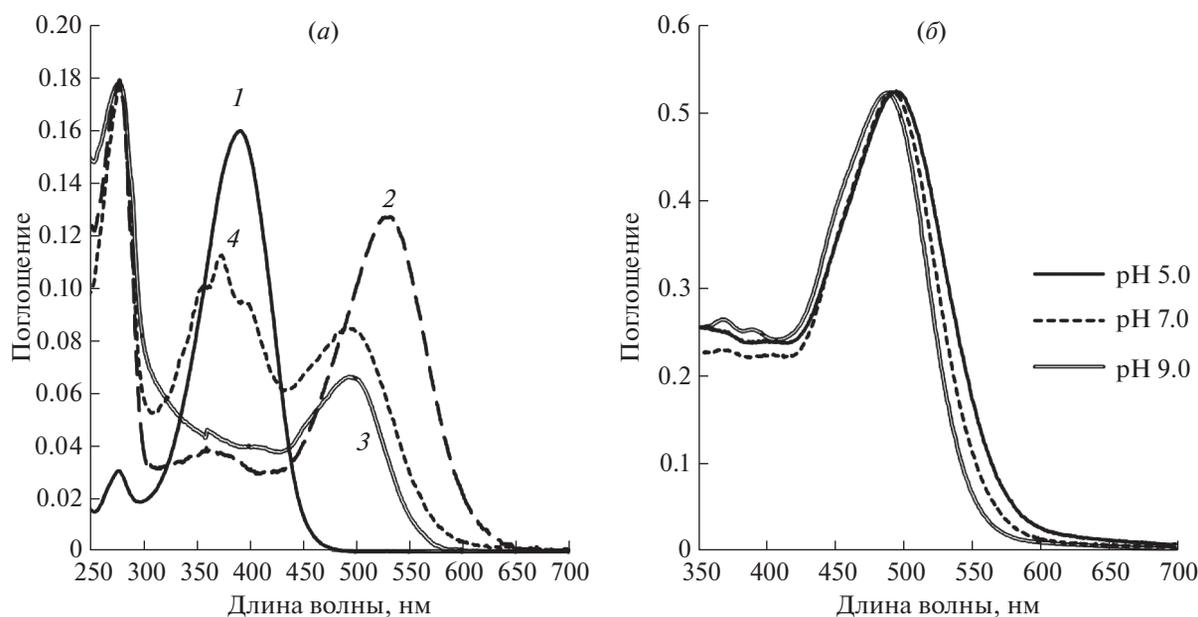


Рис. 1. (а) – Электронные спектры поглощения образцов: 1 – фторфенильного аналога ретиналя (II) в этаноле; 2 – препарата рекомбинантного ESRh в мицеллах DDM (буфер А, pH 8.0); 3 – препарата F-Phe-ESRh, полученного в условиях 0.8 экв. фторфенильного аналога ретиналя (II) в мицеллах DDM (буфер А, pH 8.0); 4 – препарата F-Phe-ESRh, полученного в условиях 1.5 экв. избытка фторфенильного аналога ретиналя (II) в мицеллах DDM (буфер А, pH 8.0); (б) – электронные спектры поглощения образца препарата F-Phe-ESRh, полученного в условиях 0.8 экв. фторфенильного аналога ретиналя (II) в мицеллах DDM (буфер А) при различных значениях pH (pH 5.0–9.0).

или его аналога (II) в виде раствора в этаноле (не более 0.01% по объему, чтобы минимизировать побочные процессы: денатурацию и агрегацию) или 2) добавлением 1.5-кратного молярного избытка *all-E*-ретиналя (I) или его аналога (II) в виде раствора в этаноле в среду культивирования *E. coli* BL21(DE3)pLysS, с последующим выделением препаратов (ESRh) и его аналога с помощью солиubilизации в буфере А, pH 8.0, и металл-хелатной хроматографии. В дальнейшем при проведении спектральных исследований нами при получении препаратов (ESRh и его аналога) было изменено соотношение белка и производного ретинаида до 1 : 0.8 (рис. 1а, кривые 3 и 4).

Спектры поглощения полученных препаратов ESRh и его аналога F-Phe-ESRh были исследованы при помощи стационарной и импульсной спектроскопии в диапазоне 250–700 нм. Анализ процесса образования искусственных пигментов на основе ESRh и F-Phe-ESRh показал, что различия в кинетике встраивания *all-E*-изомера ретиналя и его фторфенильного аналога в ESRh-опсин, солиubilизированный в мицеллах DDM, практически отсутствуют ($\tau \leq 2$ мин). В то же время при встраивании *all-E*-изомера ретиналя и его фторфенильного аналога в препарат апомембран, содержащих бактериоопсин *H. salinarum*, кинетика этих процессов существенно различается ($\tau \sim 30$ мин и ~ 6 ч соответственно) [8, 22].

Эти различия, вероятно, можно объяснить структурными отличиями ближайшего окружения участка связывания хромофора ESRh и BRh [3]. На небольшом расстоянии от основания Шиффа в молекуле ESRh находится остаток H57, определяющий свойства первичного акцептора [3, 17] и отсутствующий в молекуле BRh. Кроме того, боковая цепь остатка R82, в отличие от BRh, ориентирована противоположным образом и не оказывает существенного влияния на свойства белка. Для установления точных причин наблюдаемых эффектов необходимо проведение дальнейших исследований, в том числе с мутантными формами ESRh.

При pH 7.0 спектр поглощения полученного препарата F-Phe-ESRh демонстрирует максимум при 496 нм, что на 36 нм короче, чем у рекомбинантного ESRh (532 нм) [15–20]. При изменении до pH 9.0 он сдвигается в коротковолновую область до 490 нм (рис. 1б). Сравнение спектров поглощения F-Phe-ESRh ($\lambda_{\max} = 496$ нм) со спектрами F-Phe-BRh ($\lambda_{\max}^{\text{DA}} = 524$ нм и $\lambda_{\max}^{\text{LA}} = 510$ нм) показало, что для белковой матрицы ESRh максимум спектра поглощения сдвинут в коротковолновую область на 28 нм [8, 24]. Аналогичные сдвиги максимума поглощения в коротковолновую область были обнаружены у большинства ароматических производных BRh и ряда BRh с модифицированным триметилциклогексеновым кольцом хромофора [8, 30].

“Опсиновый сдвиг” рассчитывали по формуле:

$$\text{Опсиновый сдвиг} = 1/\lambda(\text{SBH}^+) - 1/\lambda(\text{pigment}).$$

“Опсиновый сдвиг” для образцов F-Phe-ESRh и F-Phe-BRh составил 1963 и 3040 см^{-1} соответственно [8].

λ_{max} модельного хлоргидрата альдимида аналога ретиналя (II) с *n*-бутиламином (SBH^+) в метаноле равна 452 нм.

У препаратов F-Phe-ESRh и ESRh также наблюдается отсутствие различий в спектрах образцов, адаптированных к свету и темноте — явление свето-темновой адаптации, которое характерно для природного BRh из *H. salinarum* и большинства его аналогов [8, 30].

Срок хранения препаратов F-Phe-ESRh при 4°C был не менее 6 месяцев без заметного изменения своих характеристик.

Особенности фотоцикла аналога протеородопсина F-Phe-ESRh. Фотоцикл аналога F-Phe-ESRh исследовали методом импульсной лазерной спектроскопии (флэш-фотолиза). Были получены кинетические кривые изменений поглощения F-Phe-ESRh на четырех характерных длинах волн в суспензии мицелл DDM при pH 7.0 и 9.0 (рис. 2а, 2б).

В ответ на вспышку света при pH 7.0 детектируется быстрое ($\tau = 50\text{--}70$ мкс) образование “короткоживущей” формы М-интермедиата, соответствующей депротонированному основанию Шиффа, с максимумом поглощения 390 нм (рис. 2а). Это

отличает фотоцикл F-Phe-ESRh от дикого типа ESRh, содержащего *all-E*-ретинаяль, в котором при pH 7.0 в мицеллах DDM образование М-интермедиата практически не детектируется [15–21]. Таким образом, можно утверждать, что pK_a образования М-интермедиата в производном F-Phe-ESRh сдвинут в кислую область pH по сравнению с ESRh дикого типа. Кроме того, наблюдается формирование более “долгоживущей” М-формы ($\tau = 34 \pm 7$ мс) во второй фракции пигмента (~40%).

В результате распада “короткоживущей” М-формы интермедиата с $\tau = 7.7$ мс происходит репротонирование основания Шиффа, часть пигмента образует состояние, аналогичное N/O-интермедиату фотоцикла BRh, с максимумом поглощения 550 нм. Другая часть, предположительно, не образует длинноволновую форму, а принимает участие в обратимой реакции репротонирования основания Шиффа со стороны акцептора протонов D85. Как следствие, присутствие существенной доли “долгоживущей” формы М-интермедиата наблюдается в F-Phe-ESRh вплоть до конца фотоцикла, общая продолжительность которого значительно замедлена и составляет ~27 с. При pH 9.0 наблюдается еще более значительное замедление фотоцикла (до ~100 с), без заметного накопления N/O-интермедиата (рис. 2б).

Стабильность и доступность альдиминной связи у F-Phe-ESRh к действию различных условий и реагентов. Для определения строения продуктов взаимодействия серии арилполиеновых альдегидов с апомембранами, содержащими бактериооп-

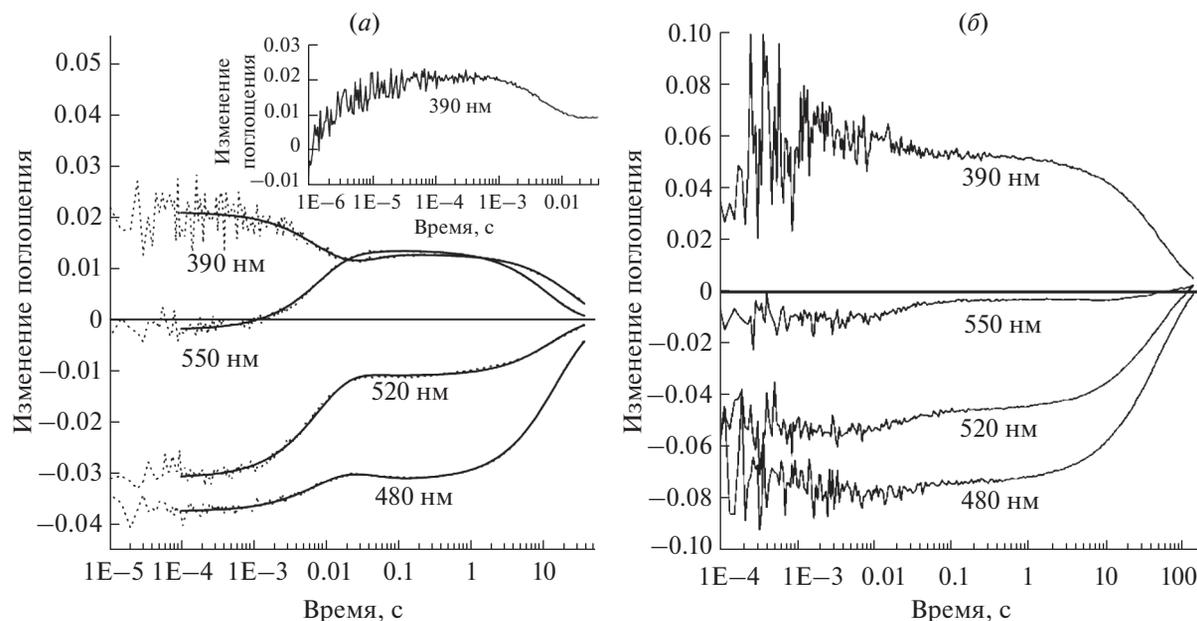


Рис. 2. Особенности фотоцикла рекомбинантного F-Phe-ESRh. Представлена кинетика светоиндуцированных изменений поглощения белка в мицеллах DDM при pH 7.0 (а) и 9.0 (б) на характерных длинах волн. Врезка на панели (а) — изменения поглощения при 390 нм, вызванные образованием М-интермедиата.

син из *H. salinarum*, А.М. Шкробом с соавт. был разработан целый набор химических тестов в комбинации со спектроскопическими методами в ставшей классикой работе [31].

Для оценки доступности протонированной альдиминной связи к действию различных стимулов и систем реагентов был проведен следующий ряд экспериментов: 1) засветка образцов F-Phe-ESRh видимым светом галогеновой лампы ThorLabs OSL1-EC, светофильтр ЖС-12 ($\lambda \geq 400$ нм) в течение 2–10 мин; 2) воздействие на образец F-Phe-ESRh раствора 50 мкМ NaBH_4 , pH 9.0, в темноте и на свету; 3) реакция замещения образца F-Phe-ESRh раствором *all-E*-ретиная в этаноле (5 мМ) в темноте и на свету; 4) воздействие на образец F-Phe-ESRh раствора NH_2OH (50 мМ) в темноте и на свету.

В результате проведенных исследований было обнаружено, что при продолжительном освещении образца F-Phe-ESRh видимым светом галогеновой лампы его протонированная альдиминная связь подвергалась частичному гидролизу с появлением продукта распада, спектрально идентичного образцу фторфенилретиная (II) в водном буфере А. При выдерживании “засвеченного видимым светом образца F-Phe-ESRh” в темноте более 2–3 ч наблюдалась частичная реконструкция пигмента с увеличением оптической плотности полосы поглощения F-Phe-ESRh (496 нм).

Спектр поглощения продукта распада демонстрировал тонкую структуру: основная полоса 374 нм, и два плеча 355 нм (пл.) и 398 нм (пл.) (рис. 3а, кривые 2, 3). Дополнительным доказательством строения продукта распада была его трансформация в соответствующий спирт действием раствора 50 мкМ NaBH_4 , pH 9.0, в темноте. Спектр поглощения восстановленного продукта распада в буфере А был весьма близок к спектру реперного образца фторфенилретинола (основная полоса 343 нм, два плеча 328 и 361 нм), который был получен обработкой NaBH_4 фторфенилретиная (II) в водном этаноле. Было проведено контрольное восстановление образца F-Phe-ESRh NaBH_4 в темноте, которое показало, что протонированная альдиминная связь в образце F-Phe-ESRh достаточно стабильна к действию раствора NaBH_4 в темноте ($\tau_{1/2} \approx 10$ мин). После освещения “образца после NaBH_4 ” в течение 2 мин полоса пигмента почти полностью исчезала.

В то же время препарат рекомбинантного ESRh в мицеллах DDM (буфер А, pH 8.0) оказался устойчивым к воздействию освещения видимым светом [15–21].

Реакция замещения аналога хромофора F-Phe-ESRh раствором *all-E*-ретиная в темноте протекала очень медленно ($\tau_{1/2} > 18$ ч). Этот факт говорит о том, что в белке отсутствуют свободные сайты посадки хромофора на ϵ -аминогруппу остатка лизина

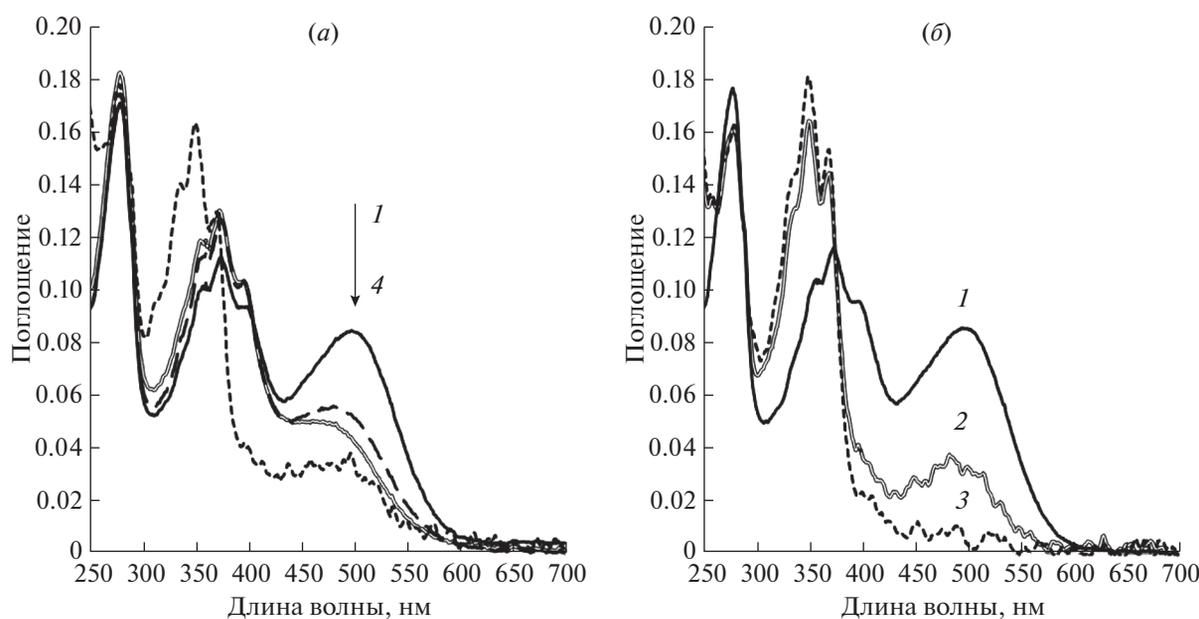


Рис. 3. Спектры поглощения F-Phe-ESRh. (а): 1 – Исходный образец, полученный в условиях 1.5 экв. избытка фторфенильного аналога ретиная (II); 2 – он же после 2 мин освещения видимым светом с длиной волны >450 нм (фильтр ЖС-12); 3 – он же после 12 мин освещения видимым светом с длиной волны >450 нм (фильтр ЖС-12); 4 – засвеченный в течение 15 мин образец после добавления раствора NaBH_4 (50 мкМ NaBH_4 , pH 9.0); (б): 1 – исходный образец, полученный в условиях 1.5 экв. избытка фторфенильного аналога ретиная (II); 2 – “темновой” исходный образец через 15 мин после добавления раствора NaBH_4 (50 мкМ NaBH_4 , pH 9.0); 3 – образец через 15 мин после добавления раствора NaBH_4 , после 2 мин освещения видимым светом с длиной волны >450 нм (фильтр ЖС-12).

K225 или другие возможные остатки лизина, способные к формированию протонированной альдиминной связи.

Также образец F-Phe-ESRh был достаточно стабилен в темноте в реакции замещения гидроксиламином ($\tau_{1/2} > 3$ ч).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Тонкослойную хроматографию осуществляли на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия) в системе растворителей: (А) гексан/эфир (1 : 1). Пятна веществ детектировали выдерживанием пластинки в парах иода. Препаративную флэш-хроматографию проводили на силикагеле Kieselgel 60 (Merck, Германия). Растворители очищали и высушивали: диэтиловый эфир и тетрагидрофуран – перегонкой над алюмогидридом лития; метанол абсолютизировали с использованием магниевой стружки.

Препаративную ВЭЖХ-хроматографию проводили на ВЭЖХ-хроматографе SmartLine 1000 (Knauer, Германия) в изократическом режиме, колонка Knauer Eurospher 100-10 Si, 20 × 250 мм, элюент гексан/диэтиловый эфир 7 : 1 по объему, УФ-детектор К-2500 с детекцией при 370 нм, скорость потока 5 мл/мин.

В работе использовали хлороацетонитрил (Fluka, Швейцария), триэтилфосфит (Fluka, Швейцария), хлороацетон, 4-фторбензальдегид (Merck, Германия), а также реагенты и растворители марок “х.ч.” и “ч.д.а.” отечественного производства.

Все операции с реагентами, чувствительными к влаге и кислороду, проводили в тщательно высушенной аппаратуре в атмосфере сухого аргона. Упаривание растворов осуществляли на роторном испарителе при температуре не выше 35°C и давлении 12 мм рт. ст.

Все спектральные исследования проводили при 20°C. ЯМР-спектры растворов в дейтерохлороформе регистрировали на спектрометре Avance III 500 (Bruker, Германия) со следующими рабочими частотами: ¹H-ЯМР-спектры – 500 МГц, ¹³C-ЯМР-спектры – 126 МГц, ³¹P-ЯМР-спектры – 203 МГц. Химические сдвиги приведены в миллионных долях (м.д.) относительно внутреннего стандарта: тетраметилсилана (δ 0.00) или дейтерохлороформа (δ (¹H-ЯМР) – 7.25 м.д. и (¹³C-ЯМР) – 77.2 м.д.), для ³¹P-ЯМР-спектров – относительно внешнего стандарта (85%-ного раствора ортофосфорной кислоты в D₂O). Величины констант спин-спинового взаимодействия измерены в герцах (Гц).

При описании ЯМР-спектров полиенового альдегида (II) принята нумерация атомов, соответствующая нумерации атомов полиеновой цепи природного ретиналя (I).

При описании спектров приняты следующие сокращения: с – синглет, д – дублет, т – триплет, кв – квартет, м – мультиплет.

Масс-спектры получали на спектрометре Finnigan 4021 (США) при прямом вводе образца и ионизации электронным ударом (ЭИ 70 эВ).

Измерения спектральных и фотохимических характеристик растворов соединений и пигментов проводили в кварцевых кюветах толщиной 10 мм на спектрофотометре UV-2140PC (Shimadzu, Япония) и на специальном стенде, созданном на основе комплекта модульного оптоволоконного спектрофотометрического оборудования (Ocean Optics, США). Для облучения растворов образцов видимым светом ($\lambda \geq 400$ нм) использовали галогеновую лампу OSL1-EC (ThorLabs, США, 25 Вт) в комбинации со светофильтром ЖС-12.

Фотореакции образцов ESRh и F-Phe-ESRh исследовали методом флэш-фотолиза на импульсном однолучевом дифференциальном спектрофотометре с двойной монохроматизацией измеряющего света [17, 19, 20]. В качестве источника светового возбуждения использовали Nd-YAG-лазер LS 2131M (LOTIS ТП, Беларусь, 532 нм, 8 нс, 5 мДж). С целью улучшения соотношения сигнал/шум проводили накопление и усреднение 100 одиночных сигналов с помощью аналогоцифрового преобразователя Octopus CS 8327 (GaGe Applied Technologies, США).

Для получения полной кинетической картины фотоцикла F-Phe-ESRh проводили измерения при четырех длинах волн, характерных для преращений различных интермедиатов: 390, 480, 520 и 550 нм. Набор кинетических кривых в логарифмической шкале времени анализировали с помощью программы Mathematica (Wolfram Research, США) методом глобального фитирования с подбором 4–5 характерных экспоненциальных составляющих.

Смесь E- и Z-изомеров 3-метил-4-хлоро-2-бутенонитрила (Ха, б). В четырехгорлый реактор объемом 250 мл, снабженный капельной воронкой, помещали в атмосфере аргона 3.8 г (0.13 моль) 80%-ной суспензии NaN в минеральном масле и промывали абсолютным гексаном (2 раза по 5 мл). Затем добавляли при перемешивании в токе аргона 30 мл свежеперегнанного ТНФ. Реакционную смесь охлаждали до 0°C и при интенсивном перемешивании постепенно добавляли по каплям 15 мл (9.9 ммоль) C₂-фосфоната (IX), перемешивали при той же температуре в течение 30 мин до полного растворения NaN. К полученному раствору при перемешивании добавляли по каплям 8.6 мл (0.11 моль) хлороацетона (VII) и выдерживали реакционную смесь при 20°C в течение 1.5 ч. По окончании реакции добавляли 30 мл H₂O, 20 мл диэтилового эфира и доводили 0.1 н. раствором HCl до pH 6.0. Экстрагировали Et₂O

(3 раза по 100 мл). Эфирные фракции объединяли, промывали водой до pH 7.0 и сушили над Na_2SO_4 . Сушитель отфильтровывали, растворитель удаляли, а оставшуюся реакционную массу перегоняли в вакууме (0.1 мм рт. ст.). Получили 5.94 г (52%) галогенонитрила (**Xa**, **b**) в виде желто-коричневой маслянистой жидкости, смесь изомеров (*E*-/*Z*- 75 : 25), т. кип. 45–60°C (0.1 мм рт. ст.). ^1H -ЯМР-спектр (δ , м.д.): *E*-изомер (**Xa**): 2.12 (3H, д, J 0.5, 3- CH_3), 4.05 (2H, с, $-\text{CH}_2\text{Cl}$), 5.49 (1H, дд, J 3.0/1.5, 2- CH); *Z*-изомер (**Xb**): 2.03 (3H, д, J 1.5, 3- CH_3), 4.24 (2H, с, $-\text{CH}_2\text{Cl}$), 5.27 (1H, дд, J 3.0/1.5, 2- CH).

Смесь *E*- и *Z*-изомеров диэтил(2-метил-3-циано-2-пропенил)фосфоната (**XIIIa**, **b**). В трехгорлый реактор объемом 250 мл, снабженный высокоэффективным обратным холодильником и насадкой для перегонки с термометром и холодильником Либиха, помещали в атмосфере аргона 11.55 г (0.1 моль) изомерной смеси хлоронитрила (**Xa**, **b**) и 16.84 г (0.1 моль) свежеперегнанного $(\text{EtO})_3\text{P}$ (**XII**). Далее при интенсивном перемешивании реакционную смесь постепенно нагревали до 150°C, следя за тем, чтобы не было бурного вспенивания. Окончание реакции контролировали по окончании выделения этилхлорида. Остаток перегоняли в вакууме (0.1 мм рт. ст.). Получили 17.58 г (81%) целевого C_5 -фосфоната (**XIIIa**, **b**) в виде изомерной смеси (*E*-/*Z*- 60 : 40), т. кип. 78–98°C (0.1 мм рт. ст.). ^1H -ЯМР-спектр (δ , м.д.): *E*-изомер (**XIIIa**): 1.14 (6H, т, J 7.0, $(-\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.04 (3H, дд, J 3.4/1.3, $-\text{CH}_3$), 2.55 (2H, д, J 23.5, $-\text{CH}_2$), 3.95 (4H, кв, J 7.0, $(-\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 5.12 (1H, м, $=\text{CH}$); *Z*-изомер (**XIIIb**): 1.15 (6H, т, J 7.0, $(-\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 1.94 (3H, дд, J 3.8/1.7, $-\text{CH}_3$), 2.81 (2H, д, J 24.0, $-\text{CH}_2$), 3.96 (4H, кв, J 7.0, $(-\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 5.12 (1H, м, $=\text{CH}$). ^{13}C -ЯМР-спектр (δ , м.д.): *E*-изомер (**XIIIa**): 16.2 (с, $(-\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 22.0 (с, $-\text{CCH}_3$), 36.8 (д, J 81.4, $-\text{CH}_2$), 62.3 (с, $(-\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 116.1 (с, $-\text{CCH}_3$), 155.6 (д, J 11.1, $-\text{CN}$); *Z*-изомер (**XIIIb**): 16.1 (с, $(-\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 23.9 (с, $-\text{CCH}_3$), 34.1 (д, J 81.4, $-\text{CH}_2$), 62.2 (с, $(-\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 115.9 (с, $-\text{CCH}_3$), 155.2 (д, J 11.1, $-\text{CN}$). ^{31}P -ЯМР-спектр (δ , м.д.): *E*-изомер: 23.84; *Z*-изомер: 23.01.

Стандартные методики олефинирования по Хорнеру–Эммонсу карбонильных предшественников (**XIV**) и (**XVI**) с C_5 -фосфонатом (**XIIIa**, **b**) и последующего восстановления нитрильной группы ДИВАН в промежуточных нитрилах (**XV**) и (**XVII**). В трехгорлый реактор объемом 100 мл помещали в атмосфере аргона 0.06 г 80%-ной суспензии NaN в минеральном масле и промывали абсолютным гексаном (3 раза по 3 мл). Затем при интенсивном перемешивании и 0°C прибавляли 10 мл абсолютного THF и 0.30 мл (1.56 ммоль) C_5 -фосфоната (**XIIIa**, **b**). Смесь перемешивали в течение 1 ч до полного растворения NaN и постепенно, при по-

мощи шприца, прибавляли раствор 1.3 ммоль альдегида ((**XIV**) или (**XVI**)) в 10 мл абсолютного THF. По окончании реакции прибавляли по каплям 5 мл H_2O , 10 мл Et_2O и нейтрализовали 0.1 н. раствором HCl до pH 6.0. Органический слой отделяли, остаток экстрагировали Et_2O (3 раза по 50 мл). Эфирные экстракты объединяли с органическим слоем, промывали водой до pH 7.0 и сушили над безводным Na_2SO_4 . Растворитель удаляли, остаток хроматографировали на колонке с 10 г силикагеля, элюируя гексаном и увеличивая полярность элюента добавлением Et_2O от 0 до 15%. Фракции, содержащие нитрил ((**XV**) или (**XVII**)), объединяли, растворитель удаляли, остаток сушили в вакууме 1 ч при 0.1 мм рт. ст., растворяли в 10 мл абсолютного толуола и помещали в трехгорлый реактор объемом 100 мл в атмосфере аргона. Реакционную смесь охлаждали до температуры в диапазоне от -70 до -80°C , затем постепенно, при помощи шприца прибавляли 1.5 экв. 20%-ного раствора ДИВАН в толуоле и оставляли до тех пор, пока температура реакции не достигала 20°C. Далее реакционную массу обрабатывали влажным силикагелем, перемешивали 30 мин, фильтровали через слой целита (1 см), промывая слой сорбента Et_2O (50 мл). Фильтрат упаривали досуха, остаток хроматографировали на колонке с 10 г силикагеля, элюируя вещество гексаном и увеличивая полярность элюента добавлением Et_2O от 0 до 10%. Фракции, содержащие смесь изомеров промежуточного или целевого альдегида ((**XVI**) или (**II**)), объединяли, растворитель удаляли, остаток сушили в вакууме 1 ч при давлении 0.1 мм рт. ст.

all-E-Изомер целевого альдегида (**II**) выделяли препаративной ВЭЖХ на хроматографе Smart-Line 1000 (Knauer, Германия) в изократическом режиме, колонка Knauer Eurospher 100-10 Si, 20 × 250 мм, элюент гексан/диэтиловый эфир 7 : 1 по объему, УФ-детектор К-2500 с детекцией при 370 нм, скорость потока 5 мл/мин.

Выход *all-E*-изомера целевого альдегида (**II**): (47% в расчете на исходный альдегид (**XIV**)). R_f 0.44 (А). ^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3 , δ , м.д.): 2.10 (3H, с, 9- CH_3), 2.35 (3H, д, J 1.5, 13- CH_3), 6.05 (1H, д, J 8.2, 14-Н), 6.36 (1H, д, J 11.5, 10-Н), 6.43 (1H, д, J 15.5, 12-Н), 6.68 (1H, д, J 16.2, 8-Н), 6.82 (1H, д, J 16.2, 7-Н), 7.03 (2H, дд, $J_{2(4)\text{H,F}}$ 8.5, J 8.5, 2,4-Н), 7.15 (1H, дд, J 15.5, J 11.5, 11-Н), 7.42 (2H, $J_{1(5)\text{H,F}}$ 5.5, J 8.5, 1,5-Н), 10.12 (1H, д, J 8.2, 15-Н). УФ-спектр (метанол, λ_{max} , нм, $[\epsilon, \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}]$): 387.5 [47700]. Масс-спектр (m/z) ($[M^+]$ 256.1).

Получение альдимины аналога ретиналя (**II**) с *n*-бутиламино. К раствору 3 мг альдегида (**II**) в 0.1 мл абсолютного метанола добавляли 0.1 мл *n*-бутиламина и 10 мг молекулярных сит 3 Å. Реакционную смесь выдерживали 24 ч при 0°C в

темноте и в атмосфере аргона. Сита отделяли, растворитель и избыток *n*-бутиламина удаляли при 20°C и давлении 0.1 мм рт. ст., остаток растворяли в 0.2 мл метанола и хранили при –10°C.

Спектральные характеристики: альдимин аналога ретиналя (II) с *n*-бутиламином (метанол, λ_{\max} , нм, [ε, М⁻¹ см⁻¹]: 369 [43500]; хлоргидрат альдимиана аналога ретиналя (II) с *n*-бутиламином (метанол, λ_{\max} , нм, [ε, М⁻¹ см⁻¹]: 452 [56000].

Получение препаратов рекомбинантного протеородопсина ESRh и его аналога F-Phe-ESRh. Для получения рекомбинантного ESRh с природным или модифицированным хромофором в препаративном количестве использовали штамм *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen Merck, Германия), трансформированный плазмидой pET-ESRh [15]. В среду LB с ампициллином (100 мкг/мл) объемом 200 мл засеяли ночную культуру штамма до $OD_{560} = 0.15$. Культуру инкубировали в при 37°C в качалке Innova (New Brunswick Scientific, США) при 250 об/мин до $OD_{560} = 0.8$, после чего добавляли раствор изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид до 0.2 мМ и одно из производных ретиналя до 6–7 мкМ, продолжали культивирование при 30°C в течение 24 ч. Для солюбилизации в препарат мембранной фракции добавляли раствор 10%-ного *n*-додецил-β-D-мальтопиранозид (DDM) до 1%, коктейль ингибитора протеаз (Sigma, США) до 0.3%. Суспензию инкубировали при комнатной температуре на качалке в течение 3 ч, после чего центрифугировали в течение 15 мин при 30000 g. Для выделения белка после солюбилизации проводили металл-аффинную хроматографию на Ni-Sepharose FastFlow (GE Healthcare, США), как описано в работе Petrovskaya et al. [15]. Рекомбинантный ESRh был получен с высокой степенью чистоты (не менее 90%) и выходом 10–15 мг/л.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен альтернативный вариант наращивания полиеновой цепи целевого ретиноида с двумя ключевыми стадиями: 1) реакция олефинирования по Хорнеру–Эммонсу исходного 4-фторбензальдегида анионом C₅-фосфоната; 2) последующее восстановление нитрильной функции в промежуточных нитрилах DIBAN до формильной группы при температуре от –70 до –80°C. Показано, что схема синтеза *all-E*-изомера ретиноида (II) с использованием C₅-фосфоната с терминальной нитрильной группой более эффективна и дает более высокий суммарный выход целевого ретиноида (II), чем вариант синтеза, описанный нами ранее [22, 23].

Установлено, что вариант модификации триметилциклогексенового кольца природного хромофора рекомбинантного протеородопсина ESRh путем замены его на *n*-фторфенильный фрагмент

приводит, как и в случае бактериоопсина из *H. salinarum*, к образованию искусственного пигмента F-Phe-ESRh, сохраняющего цикл фотохимических реакций. Обнаружены определенные различия в свойствах нативного рекомбинантного ESRh и его аналога F-Phe-ESRh, включающие сдвиг максимума поглощения в коротковолновую область, образование интермедиата М при более низких значениях рН, наличие “долгоживущего М” и общее замедление фотоцикла. Также продемонстрирована пониженная стабильность полученного аналога F-Phe-ESRh к продолжительному воздействию видимого света.

Полученные результаты подтверждают ранее описанные требования к структуре хромофора микробных родопсинов, включая наличие терминальной формильной группы, определенную длину полиеновой цепи и ее конфигурацию, а также отсутствие жестких пространственных ограничений района триметилциклогексенового кольца и наличие определенных препятствий в районе двойной связи C₁₃=C₁₄ [8–13, 23, 29, 30].

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-03-00139а).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kandori H. // *Biophys. Rev.* 2020. V. 12. P. 355–361. <https://doi.org/10.1007/s12551-020-00645-0>
2. Ernst O.P., Lodowski D.T., Elstner M., Hegemann P., Brown L.S., Kandori H. // *Chem. Rev.* 2014. V. 114. P. 126–163. <https://doi.org/10.1021/cr4003769>
3. Gushchin I., Gordeliy V. // *In Subcellular Biochemistry / Eds. Harris J.R., Boekema E.J.* 2018. V. 87. Ch. 2. P. 19–56. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_2
4. Oesterhelt D., Stoekenius W. // *Nature (New Biologist)*. 1971. V. 233. P. 149–151. <https://doi.org/10.1038/newbio233149a0>
5. Deisseroth K. // *Nat. Neurosci.* 2015. V. 18. P. 1213–1225. <https://doi.org/10.1038/nn.4091>

6. Говорунова Е.Г., Коппель Л.А. // Биохимия. 2016. Т. 1. С. 1172–1186. [Govorunova E.G., Koppel L.A. // Biochemistry (Moscow). 2016. V. 81. P. 928–940.] <https://doi.org/10.1134/S0006297916090029>
7. Dawson M.I., Okamura W.H. // Chemistry and Biology of Synthetic Retinoids. Boca Raton: CRC Press Inc., 1990. <https://doi.org/10.1201/9781351070638>
8. Khodonov A.A., Belikov N.E., Demina O.V. // Properties of Artificial Bacteriorhodopsin Analogs. Version 2, 2020. From 1975 to 2019. Moscow: IBCP/МИПТ, Russia. http://biochemphysics.ru/assets/upload/documents/docs/BRDT_v2.pdf
9. Мицнер Б.И., Ходонов А.А. // В кн. Светочувствительные биологические комплексы и оптическая регистрация информации / Ред. Иваницкий Г.Р. Пушино: АН СССР, 1985. С. 38–49.
10. Мицнер Б.И., Ходонов А.А., Звонкова Е.Н., Евстигнеева Р.П. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. С. 5–53.
11. Mitsner B.I., Khodonov A.A., Zvonkova E.N., Karpauchova E.N. // In Retinal Proteins / Ed. Ovchinnikov Yu.A. Utrecht: VNU Press, 1989. P. 561–569.
12. Ходонов А.А., Еремин С.В., Локшин Дж.Л., Швец В.И., Демина О.В., Хитрина Л.В., Каулен А.Д. // Биоорг. химия. 1996. Т. 22. С. 745–776.
13. Varachevsky V.A., Khodonov A.A., Belikov N.E., Laptev A.V., Lukin A.Yu., Demina O.V., Luyksaar S.I., Krayushkin M.M. // Dyes and Pigments. 2012. V. 92. P. 831–837. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2011.05.009>
14. Ходонов А.А., Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Беликов Н.Е., Фомин М.А., Демина О.В., Складнев Д.А., Тюрин С.А., Швец В.И. // Вестник МИТХТ. 2011. Т. 6. С. 15–36.
15. Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Chupin V.V., Sychev S.V., Lyukmanova E.N., Kryukova E.A., Ziganshin R.H., Spirina E.V., Rivkina E.M., Khatypov R.A. // FEBS Lett. 2010. V. 584. P. 4193–4196. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.09.005>
16. Gushchin I., Chervakov P., Kuzmichev P., Popov A.N., Round E., Borshchevskiy V., Ishchenko A., Petrovskaya L., Chupin V., Dolgikh D.A., Arseniev A.S., Kirpichnikov M., Gordeliy V. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. P. 12631–12636. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221629110>
17. Balashov S.P., Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Imasheva E.S., Dioumaev A.K., Wang J.M., Sychev S.V., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Lanyi J.K. // Biochemistry. 2012. V. 51. P. 5748–5762. <https://doi.org/10.1021/bi300409m>
18. Dioumaev A.K., Petrovskaya L.E., Wang J.M., Balashov S.P., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Lanyi J.K. // J. Phys. Chem. B. 2013. V. 117. P. 7235–7253. <https://doi.org/10.1021/jp402430w>
19. Петровская Л.Е., Балашов С.П., Лукашев Е.П., Имашева Е.С., Гуцин И.Ю., Дюмаев А.К., Рубин А.Б., Долгих Д.А., Горделий В.И., Лани Я.К., Кирпичников М.П. // Биохимия. 2015. Т. 80. С. 814–828. [Petrovskaya L.E., Balashov S.P., Lukashev E.P., Imasheva E.S., Gushchin I., Dioumaev A.K., Rubin A.B., Dolgikh D.A., Gordeliy V.I., Lani Y.K., Kirpichnikov M.P. // Biochemistry (Moscow). 2015. V. 80. P. 688–700.] <https://doi.org/10.1134/S000629791506005X>
20. Siletsky S.A., Mamedov M.D., Lukashev E.P., Balashov S.P., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Petrovskaya L.E. // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1857. P. 1741–1750. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.08.004>
21. Smitienko O.A., Feldman T.B., Petrovskaya L.E., Nekrasova O.V., Yakovleva M.A., Shelaev I.V., Gostev F.E., Cherepanov D.A., Kolchugina I.B., Dolgikh D.A., Nadochenko V.A., Kirpichnikov M.P., Ostrovsky M.A. // J. Phys. Chem. B. 2021. V. 125. P. 995–1008. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c07763>
22. Belikov N.E., Melnikova I.A., Demina O.V., Petrovskaya L.E., Kryukova E.A., Dolgikh D.A., Kuzmichev P.K., Chupin V.V., Lukin A.Yu., Shumsky A.N., Chizhov I., Levin P.P., Kirpichnikov M.P., Varfolomeev S.D., Khodonov A.A. // Mendeleev Commun. 2018. V. 28. P. 406–408. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2018.07.022>
23. Мицнер Б.И., Ходонов А.А., Звонкова Е.Н., Евстигнеева Р.П. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. С. 238–251.
24. Драчев Л.А., Зорина В.В., Мицнер Б.И., Хитрина Л.В., Ходонов А.А., Чекулаева Л.Н. // Биохимия. 1987. Т. 52. С. 1559–1569.
25. Walker B.J. // In Organophosphorus Reagents in Organic Synthesis / Ed. Cadogan J.I.G. London: Academic Press, 1979. Chapter 3. P. 155–206.
26. Courtin J.M.L., Verhagen L., Biesheuvel P.L., Lugtenburg J., van der Bend R.L., van Dam K. // Recl. Trav. Chim. Pays-Bas. 1987. V. 106. P. 112–119.
27. Ernst L., Hopf H., Krause N. // J. Org. Chem. 1987. V. 52. P. 398–405.
28. Groesbeek M., de Vries E.F.J., Berden J.A., Lugtenburg J. // Recl. Trav. Chim. Pays-Bas. 1993. V. 112. P. 303–308.
29. Миронова Е.В., Лукин А.Ю., Шевяков С.В., Алексеева С.Г., Швец В.И., Демина О.В., Ходонов А.А., Хитрина Л.В. // Биохимия. 2001. Т. 66. С. 1638–1648. [Mironova E.V., Lukin A.Y., Shevaykov S.V., Alexeeva S.G., Shvets V.I., Demina O.V., Khodonov A.A., Khitrina L.V. // Biochemistry (Moscow). 2001. V. 66. P. 1323–1333.] <https://doi.org/10.1023/A:1013147722255>
30. Ходонов А.А., Беликов Н.Е., Лукин А.Ю., Петровская Л.Е., Чупин В.В., Демина О.В. // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2020. Т. 5. С. 91–100.
31. Шкроб А.М., Родионов А.В., Овчинников Ю.А. // Биоорг. химия. 1981. Т. 7. С. 1169–1194.

Interaction of the Fluorophenyl Analogue of Retinal with Proteorhodopsin from *Exiguobacterium sibiricum*

N. E. Belikov*, L. E. Petrovskaya**, E. A. Kryukova**, D. A. Dolgikh**, ***, E. P. Lukashev***, A. Yu. Lukin****, O. V. Demina*, S. D. Varfolomeev*, V. V. Chupin*****, and A. A. Khodonov*.*

*Phone: +7 (495) 939-7148; e-mail: khodonov@gmail.com

*Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

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

***Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, ul. Leninskiye gory 1/12, Moscow, 119991 Russia

****MIREA – Russian Technological University, prosp. Vernadskogo 78, Moscow, 119571 Russia

*****Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskii per. 9, Dolgoprudny, 141701 Russia

An alternative variant of the method for the synthesis of an analogue of natural retinal, in which the trimethylcyclohexene ring of the molecule is replaced by a *p*-fluorophenyl fragment, has been developed. It has been shown that the proposed scheme for the synthesis of the target *all-E*-isomer of the target retinoid using C₅-phosphonate with a terminal nitrile group under Horner–Emmons reaction conditions is more efficient and gives a higher total yield of the target product than the variant synthesis described earlier. A procedure has been developed for preparation an analogue of microbial proteorhodopsin ESRh from *Exiguobacterium sibiricum* with a modified chromophore. It was found that, as in the case of bacterioopsin from *Halobacterium salinarum*, the replacement of the trimethylcyclohexene ring in the natural chromophore by the *p*-fluorophenyl fragment does not block the possibility of the formation of the artificial pigment F-Phe-ESRh from proteorhodopsin ESRh, which preserves the cycle of photochemical reactions. Certain differences were found in the properties of native recombinant ESRh and its analogue F-Phe-ESRh, including a shift in the absorption maximum to the short-wavelength region, the formation of intermediate M at lower pH values, the presence of “long-lived M”, and a general slowdown in the photocycle. The reduced stability of the resulting proteorhodopsin analog F-Phe-ESRh to prolonged exposure to visible light was also demonstrated.

Keywords: ESRh microbial proteorhodopsin from *Exiguobacterium sibiricum*, retinal analogs, Horner–Emmons olefination



УДК 547.415.057

СИНТЕЗ 2-МЕТИЛИДЕН-СПЕРМИДИНА И ЕГО N^1 -АЦЕТИЛЬНОГО ПРОИЗВОДНОГО

© 2022 г. М. А. Хомутов*, #, А. Р. Хомутов*

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

Поступила в редакцию 12.05.2022 г.

После доработки 07.06.2022 г.

Принята к публикации 17.06.2022 г.

Предложены простые и удобные методы синтеза неизвестных ранее 2-метиленовых производных спермидина (1,8-диамино-2-метилен-4-азаоктан, 2-Met-Spd) и N^1 -Ас-спермидина (N^1 -Ас-1,8-диамино-2-метилен-4-азаоктан, N^1 -Ас-2-Met-Spd), исходя из коммерчески доступного 2-хлор-метил-3-хлорпропена-1. Целевые соединения были получены в семь стадий с высоким суммарным выходом. Обсуждаются перспективы их использования для ингибирования FAD-зависимой N^1 -ацетилполиаминоксидазы.

Ключевые слова: полиамины, аналоги спермидина, ацетилполиаминоксидаза

DOI: 10.31857/S0132342322060148

ВВЕДЕНИЕ

Биогенные полиамины спермин (Spm) и спермидин (Spd), представляющие собой низкомолекулярные поликатионы, присутствуют в клетках эукариот в микро- и миллимолярных концентрациях, что определяет множественность и жизненную важность их клеточных функций [1, 2]. Нарушение гомеостаза полиаминов не только связано с возникновением злокачественных трансформаций (опухолевые клетки имеют повышенное содержание полиаминов, а соединения, снижающие их уровень, обладают противоопухолевой активностью [3, 4] и используются в период ремиссии [5]), но и ассоциировано с развитием некоторых типов панкреатита, синдрома Шнайдер–Робинсона, болезней Альцгеймера и Паркинсона, атеросклероза, сердечно-сосудистых заболеваний, инсульта, воспалительных процессов и заболеваний, связанных со снижением иммунного ответа [6–13].

Соответственно, уровень полиаминов в клетке необходимо поддерживать на заданном уровне, что достигается согласованной работой ферментов синтеза и деградации полиаминов, а также системой их транспорта в клетки. Биосинтез, активность и деградация скорость-определяющих ферментов синтеза (декарбоксилазы орнитина и S-аденозил-L-метионина – dcAdoMet, рис. 1) и катаболизма (спермидин/спермин- N^1 -ацетилтрансфераза – SSAT и сперминоксидаза – SMOX, рис. 1) полиаминов тонко регулируются в ответ на изменения внутриклеточной концентрации полиаминов. Считается, что FAD-зависимая N^1 -ацетилполиаминоксидаза (PAOX, рис. 1) конститутивно экспрессируется в большинстве клеток, и ее активность зависит от активности SSAT, которая синтезирует ацетилированный субстрат. Однако в клетках опухоли молочной железы экспрессия PAOX вариативна, что предполагает существование регуляторных путей, не характерных для других типов клеток [14].

N^1, N^4 -бис(2,3-Бутадиенил)-1,4-диаминобутан (MDL-72527, рис. 2) необратимо ингибирует изолированную PAOX ($K_i = 0.09$ мкМ, $\tau_{1/2} = 2.2$ мин [15]) и проявляет высокую активность в экспериментах в культуре клеток и *in vivo*. По данным рентгеноструктурного анализа, движущей силой необратимого торможения PAOX под действием MDL-72527 оказывается присоединение FAD к алленовой системе ингибитора с образованием ковалентного аддукта [16]. Вместе с тем MDL-72527 достаточно активен и в отношении близкородственной FAD-зависимой SMOX ($K_i = 63$ мкМ

Сокращения: AdoMetDC – декарбоксилаза S-аденозил-L-метионина; ODC – орнитиндекарбоксилаза; PAOX – N^1 -ацетилполиаминоксидаза; 2-Met-Spd – 1,8-диамино-2-(метилен)-4-азаоктан; N^1 -Ас-2-Met-Spd – N^1 -(ацетил)-1,8-диамино-2-(метилен)-4-азаоктан; Spd – спермидин (1,8-диамино-4-азаоктан); Spm – спермин (1,12-диамино-4,9-диазадокан); SMOX – сперминоксидаза; SSAT – спермидин/спермин N^1 -ацетилтрансфераза; N^1 -Ас-Spd – N^1 -(ацетил)-1,8-диамино-4-азаоктан; N^1 -Ас-Spm – N^1 -(ацетил)-1,12-диамино-4,9-диазадокан.

Автор для связи: (тел.: +7 (499) 135-60-65; эл. почта: makhomutov@mail.ru).

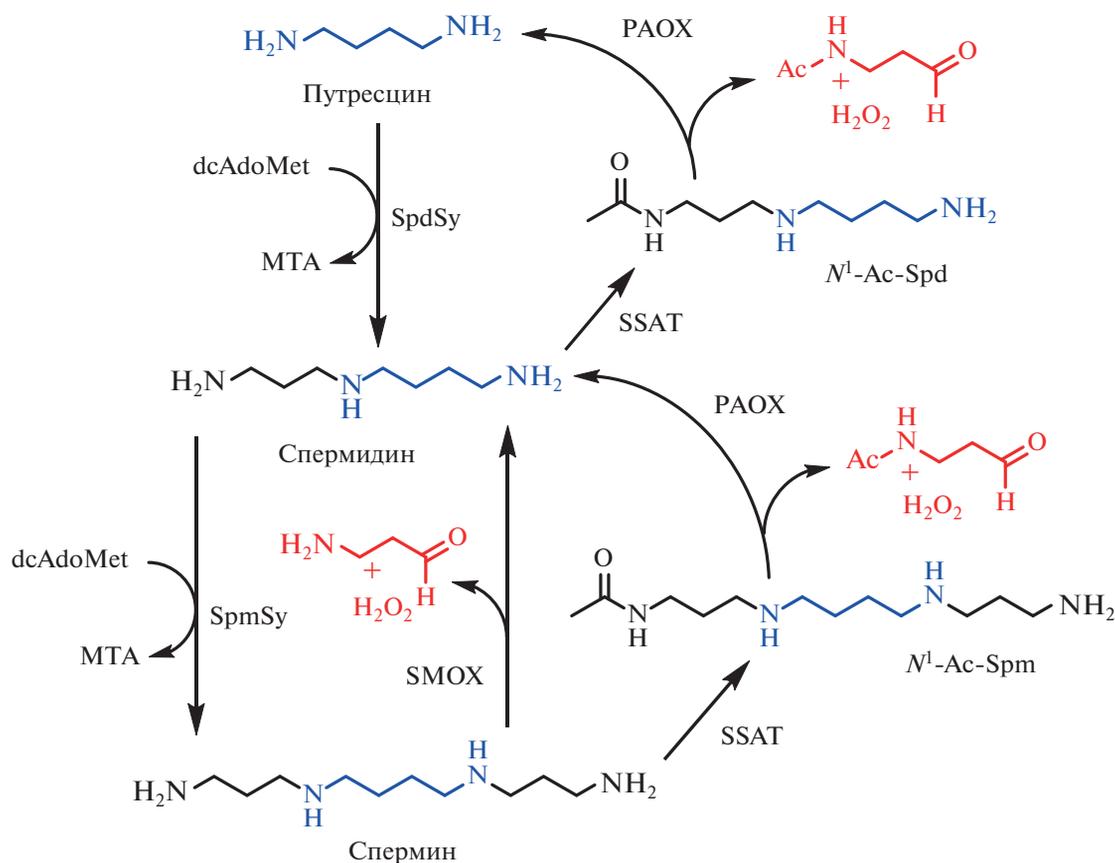


Рис. 1. Катаболизм и взаимопревращения полиаминов. PAOX – N^1 -ацетилполиаминоксидаза, SSAT – спермидин/спермин- N^1 -ацетилтрансфераза, SMOX – сперминоксидаза, SpdSy – спермидинсинтаза, SpmSy – сперминсинтаза.

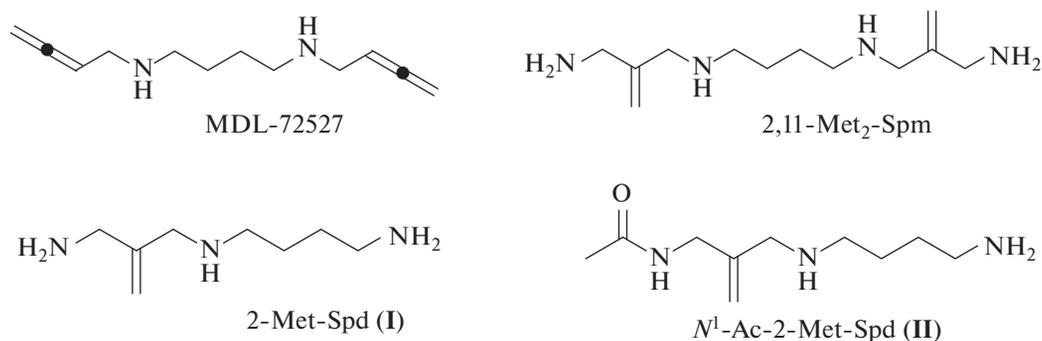


Рис. 2. Структуры MDL-72527, 2,11-Met₂-Spm, 2-Met-Spd (I) и N^1 -Ac-2-Met-Spd (II).

[17]), что в ряде случаев приводит к одновременному ингибированию PAOX и SMOX в культуре клеток и *in vivo*. Это затрудняет оценку вклада каждого из ферментов в интегральный биологический эффект или развитие полиамин-ассоциированного заболевания. Ряд других ингибиторов PAOX, созданных на основе α,ω -диаминоалканов и их производных, обладал худшей активностью по сравнению с MDL-72527. При этом фермент-активируемые ингибиторы (suicide inhibi-

tors) PAOX, созданные на основе скелета Spd, до настоящего времени не известны.

Недавно мы сообщали об использовании для ингибирования SMOX 2,11-бис(метилен)-1,12-диамино-4,9-диазадодекана (2,11-Met₂-Spm, рис. 2), активность которого в отношении SMOX была близка к активности MDL-72527 [18]. В настоящей работе мы используем этот алгоритм для получения нового ингибитора FAD-зависимой

РАОХ и описываем простой и удобный способ синтеза не известных ранее 1,8-диамино-2-(метилен)-4-азаоктана (2-Met-Spd (I), рис. 2) и *N*¹-Ac-1,8-диамино-2-(метилен)-4-азаоктана (*N*¹-Ac-2-Met-Spd (II), рис. 2), которые представляют интерес для изучения особенностей РАОХ-реакции, а также обладают определенным потенциалом для ингибирования фермента в культуре клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы исследовали взаимодействие *N*¹-Ac-производных *C*-метилованных аналогов Spd (рис. 3) с РАОХ и показали, что продуктивность взаимодействия этих соединений с ферментом можно регулировать, перемещая метильную группу по скелету Spd. Так, *N*¹-Ac-3-MeSpd не расщепляется РАОХ, по-видимому, из-за стерических эффектов метильной группы, а *N*¹-Ac-2-MeSpd и *N*¹-Ac-1-MeSpd оказались субстратами фермента [19]. Таким образом, метильный заместитель во втором положении Spd, как минимум, не препятствует его окислительному расщеплению под действием РАОХ.

Мы предположили, что *N*¹-Ac-2-Met-Spd (II) должен связываться в активном центре РАОХ и,

возможно, претерпевать субстратоподобные превращения, которые приведут к промежуточному образованию основания Шиффа, сопряженного с двойной связью ингибитора (рис. 4). По данным рентгеноструктурного анализа фермент-кофермент-субстратного комплекса, остаток Tyr430 находится на расстоянии 3.4 Å от расщепляемой связи [16], и нельзя исключить возможность присоединения фенольного гидроксила Tyr430 по активированной кратной связи. Наконец, если окислительное расщепление *N*¹-Ac-2-Met-Spd (II) все же приведет к образованию путресцина, то вторым продуктом реакции будет 2-(ацетиламино-метил)акриловый альдегид, который также способен присоединять нуклеофильную группу боковой цепи одной из аминокислот, формирующей активный центр РАОХ (рис. 4).

Синтезированный в настоящей работе 2-Met-Spd (I) (рис. 2) представляет самостоятельный интерес. Исследование взаимодействия *C*-метилованных аналогов Spd (рис. 3) с SSAT и активности соединений в культуре клеток показало, что субстратные свойства таких аналогов Spd можно регулировать, перемещая метильную группу по скелету Spd [20]. Так, 1-MeSpd и 3-MeSpd не были субстратами SSAT, тогда как 2-MeSpd достаточно эффективно превращается в *N*¹-Ac-2-MeSpd. В то же время все три аналога проникают в клетки

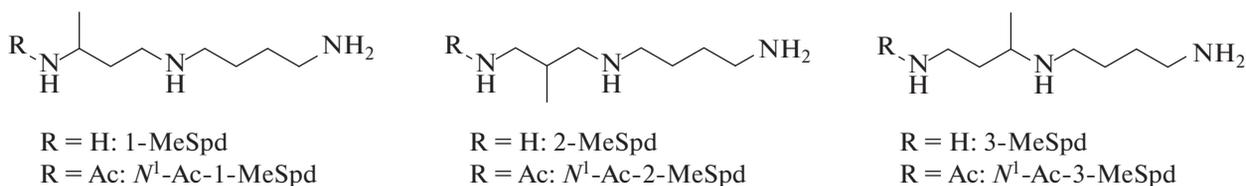


Рис. 3. *C*-Метилованные аналоги Spd и их *N*¹-Ac-производные.

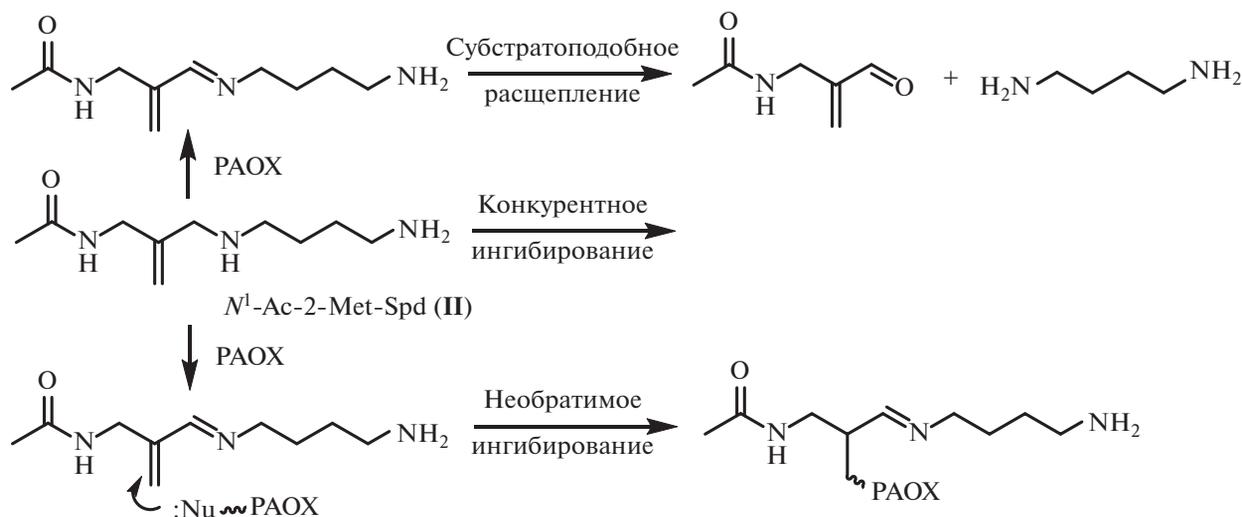


Рис. 4. Предполагаемый механизм взаимодействия РАОХ с *N*¹-Ac-2-Met-Spd (II).

DU145, используя систему транспорта полиаминов, и поддерживают рост клеток с истощенным пулом Spd [20]. Соответственно, следует ожидать, что и 2-Met-Spd (**I**) будет проникать в клетки, и, если он окажется субстратом SSAT, то этот аналог Spd будет представлять собой проингибитор PAOX.

Одной из ключевых стадий синтеза аналогов и производных полиаминов служит создание связей C–N в “скелете” полиаминов, и для этих целей используются разнообразные методы [21]. В настоящей работе в качестве исходного соединения для получения целевых 2-Met-Spd (**I**) и *N*¹-Ac-2-Met-Spd (**II**) использовали коммерчески доступный *N*-(*трет*-бутилоксикарбонил)-1,4-диаминобутан (**III**), который превращали в нозильное производное (**IV**) и затем алкилировали 1-фталимидо-2-метилен-3-хлорпропаном в DMF при 55°C в течение 8 ч в присутствии K₂CO₃ (схема 1). Затем Ns-защитную группу удаляли “one-pot” действием PhSH/K₂CO₃ в DMF, и Вос-Pht-триамин (**V**) выделяли колоночной хромато-

графией на силикагеле (алкилирование избытка 1,4-диаминобутана 1-фталимидо-2-метилен-3-хлорпропаном в THF при комнатной температуре проходило неоднозначно и приводило к набору трудноразделяемых продуктов). Дальнейшие превращения включали введение Вос-защитной группы по вторичной аминогруппе соединения (**V**), что привело к получению тризащищенного триамина (**VI**), и удаление фталильной защитной группы гидразинолизом, что позволило получить ди-Вос-триамин (**VII**), который выделяли колоночной хроматографией на силикагеле. После удаления Вос-защитных групп действием HCl/EtOH был получен целевой тригидрохлорид 2-Met-Spd (**I**) с суммарным выходом 41%, в расчете на Вос-диамин (**III**). Для получения *N*¹-Ac-2-Met-Spd (**II**) (схема 1) свободную аминогруппу ди-Вос-триамина (**VII**) ацетилировали AcCl и затем удаляли Вос-защитные группы действием HCl/EtOH, что привело к получению целевого дигидрохлорида *N*¹-Ac-2-Met-Spd (**II**) с суммарным выходом 45%, считая на Вос-диамин (**III**).

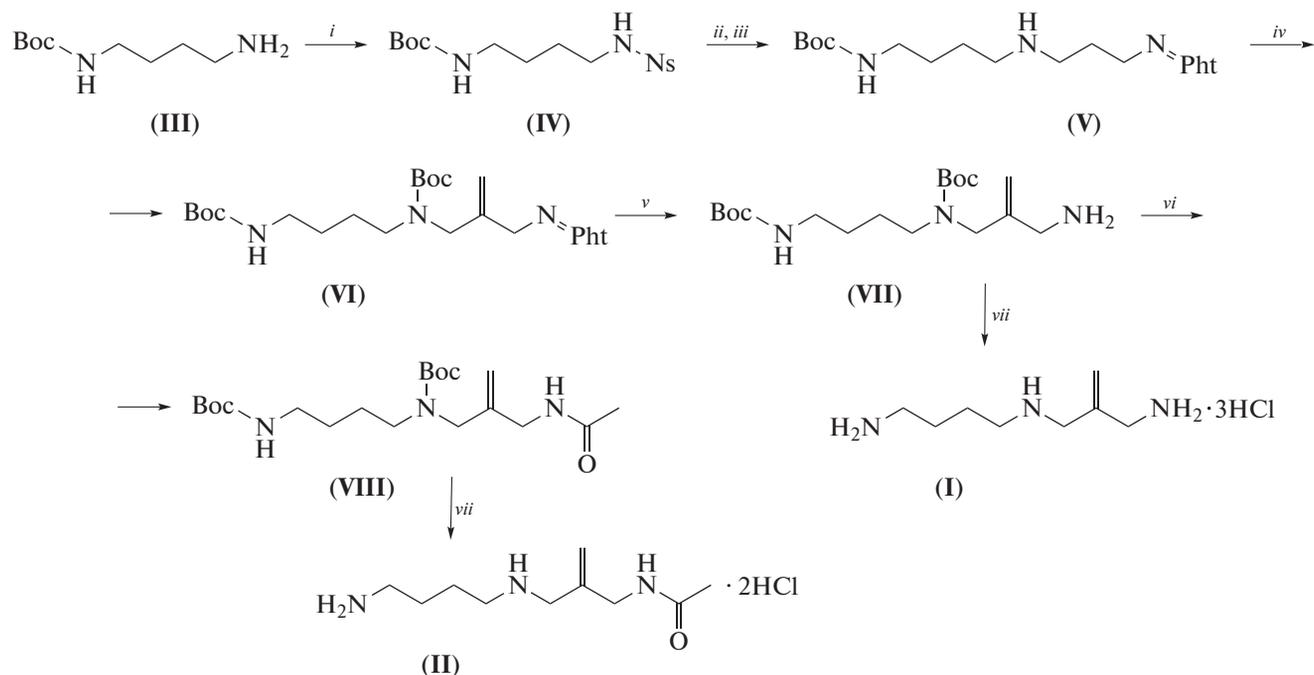


Схема 1. Синтез 2-Met-Spd (**I**) и *N*¹-Ac-2-Met-Spd (**II**). *i* – NsCl/CH₂Cl₂/Et₃N; *ii* – Pht=NCH₂C(CH₂)CH₂Cl/DMF/K₂CO₃/50°C; *iii* – PhSH/DMF/K₂CO₃; *iv* – Вос₂O/диоксан; *v* – H₂NNH₂ · H₂O/EtOH/Δ; *vi* – AcCl/Et₃N/CH₂Cl₂; *vii* – HCl/EtOH.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

При выполнении работы использовали следующие реактивы: *N*-(*трет*-бутилоксикарбонил)-1,4-диаминобутан (Вос-Put), тиофенол (PhSH),

хлорангидрид 2-нитробензолсульфокислоты (NsCl), триэтиламин (Et₃N), Вос₂O и безводный K₂CO₃ – все реактивы фирмы Aldrich (США). Синтез 1-фталимидо-2-метилен-3-хлорпропана был

осуществлен исходя из 2-хлорметил-3-хлорпропена-1 и фталимида калия согласно методу, описанному ранее [22].

Колоночную хроматографию выполняли на силикагеле Kieselgel (40–63 мкм; Merck, Германия), системы для элюции указаны в тексте. ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ Plates (Merck, Германия) в следующих системах: EtOAc–гексан, 1 : 2 (А); CH₂Cl₂–MeOH–NH₄OH (25%), 100 : 5 : 0.5 (Б); диоксан–NH₄OH (25%), 100 : 1 (В); CH₂Cl₂–MeOH, 95 : 5 (Г); диоксан–NH₄OH (25%), 7 : 3 (Д). Соединения на хроматограммах визуализировали по УФ-поглощению. Воспроизводные – при помощи бромфенолового синего, а соединения со свободной аминогруппой – с использованием цветной реакции с нингидрином.

Спектры ¹H- и ¹³C-ЯМР регистрировали на спектрометре AM-300 (Bruker, Германия) в CDCl₃ и D₂O, внутренние стандарты – Me₄Si (CDCl₃) и натриевая соль 3-триметилсилилпропан-сульфокислоты (D₂O). Химические сдвиги приведены в миллионных долях, КССВ – в герцах. Температуру плавления определяли в открытом капилляре на приборе Mel-Temp 1202D (Electrotherms, Великобритания).

N¹-(2-Нитрофенилсульфонил)-N⁴-(трет-бутилоксикарбонил)-1,4-диаминобутан (IV). К охлажденному до 4°C раствору 4.85 г (25.8 ммоль) N¹-(трет-бутилоксикарбонил)-1,4-диаминобутана (III) в смеси 4.5 мл (33.2 ммоль) Et₃N и 50 мл абс. CH₂Cl₂ добавляли при перемешивании в течение 60 мин раствор 5.21 г (23.5 ммоль) NaCl в 30 мл абс. CH₂Cl₂, перемешивали в течение 3 ч при 4°C и еще 4 ч при 20°C. Осадок отфильтровывали, фильтрат промывали последовательно 1 М NaHCO₃ (4 × 25 мл), H₂O (15 мл), 10%-ной лимонной кислотой (5 × 25 мл), H₂O (15 мл), 5 М NaCl (2 × 25 мл) и высушивали над MgSO₄. Растворитель отгоняли в вакууме. Получили 8.24 г (94%) соединения (IV) в виде густого масла, R_f 0.15 (А).

¹H-ЯМР (CDCl₃) δ: 8.17–8.09 (1H, м, Ns), 7.89–7.82 (1H, м, Ns), 7.79–7.69 (2H, м, Ns), 5.36 (1H, уш.с, NHNs), 4.53 (1H, уш.с, VocNH), 3.16–3.02 (2H, м, CH₂NHNs), 1.61–1.46 (2H, м, CH₂NHВoc + (CH₂)₂CH₂NH), 1.42 (9H, с, C(CH₃)₃).

¹³C-ЯМР (CDCl₃) δ: 156.1, 148.3, 133.9, 133.7, 132.9, 131.2, 125.5, 79.4, 43.6, 40.0, 28.5 (3C), 27.3, 27.0.

N¹-(Фталоил)-N⁸-(трет-бутилоксикарбонил)-1,8-диамино-2-(метилиден)-4-азаоктан (V). Смесь 7.84 г (21.0 ммоль) соединения (IV), 5.94 г (25.2 ммоль) 1-фталоимидо-2-метилиден-3-хлорпропана и 11.6 г (84.1 ммоль) безводного K₂CO₃ в 50 мл абс. DMF перемешивали в течение 8 ч при 55°C, затем добавляли 4.2 мл (37.5 ммоль) PhSH и 3.15 г (22.5 ммоль) безводного K₂CO₃, перемешивали

еще 3 ч при 20°C. Осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали досуха при 0.5 мм Hg, остаток растворяли в абс. CH₂Cl₂, последовательно промывали H₂O (25 мл) и 5 М NaCl (2 × 25 мл), высушивали над MgSO₄. Растворитель отгоняли в вакууме, остаток очищали колоночной хроматографией на SiO₂ (160 г), элюируя CH₂Cl₂–MeOH–NH₄OH (25%), 100 : 3 : 0.3. Фракции, содержащие соединение (V), объединяли, упаривали в вакууме досуха, высушивали в вакууме над P₂O₅/KOH. Получили 6.97 г (86%) соединения (V), R_f 0.33 (Б).

¹H-ЯМР (CDCl₃) δ: 7.88–7.81 (2H, м, Pht), 7.75–7.67 (2H, м, Pht), 5.09–5.04 (1H, м, C=CH₂), 5.01–4.96 (1H, м, C=CH₂), 4.76 (1H, уш. с, =CCH₂NH), 4.30 (2H, с, CH₂N=Pht), 3.25 (2H, с, =CCH₂NH), 3.16–3.04 (2H, м, NHCH₂CH₂), 2.61–2.53 (2H, м, CH₂NHВoc), 1.54–1.45 (5H, м, NH + CH₂CH₂CH₂NHВoc), 1.42 (9H, с, C(CH₃)₃).

¹³C-ЯМР (CDCl₃) δ: 168.3, 156.1, 142.0, 134.1, 132.2, 123.5, 113.4, 79.1, 53.1, 48.8, 40.9, 40.6, 28.6, 27.9, 27.4.

N⁴,N⁸-ди-(трет-Бутилоксикарбонил)-1,8-диамино-2-(метилиден)-4-азаоктан (VII). К раствору 6 г (15.5 ммоль) соединения (V) в 50 мл диоксана добавляли 3.7 г (17 ммоль) Voc₂O и перемешивали в течение 4 ч при 20°C. Реакционную смесь упаривали в вакууме досуха, остаток растворяли в 5 мл CH₂Cl₂ и очищали колоночной хроматографией на SiO₂ (60 г), элюируя CH₂Cl₂, а затем CH₂Cl₂–MeOH, 100 : 2. Фракции, содержащие соединение (VI), объединяли, упаривали в вакууме досуха, к остатку добавляли раствор 0.6 мл (12 ммоль) N₂H₄ · H₂O в 35 мл EtOH и кипятили при перемешивании 5 ч. Осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме досуха, остаток очищали колоночной хроматографией на SiO₂ (130 г), элюируя смесью диоксан–NH₄OH (25%), 100 : 0.5. Фракции, содержащие соединение (VII), объединяли, упаривали в вакууме досуха. После высушивания в вакууме над P₂O₅/KOH получили 2.1 г (63%, в расчете на соединение (V)) соединения (VII) в виде густого масла, R_f 0.46 (В).

¹H-ЯМР (CDCl₃) δ: 5.04–4.99 (1H, м, C=CH₂), 4.89–4.83 (1H, м, C=CH₂), 4.56 (1H, уш.с., NHВoc), 3.86 (2H, с, VocNCH₂C=), 3.25–3.03 (6H, м, VocNHCH₂CH₂ + NH₂CH₂C= + VocNCH₂CH₂), 1.59–1.35 (24H, м, NH₂ + N(C(O)O(CH₃)₃)CH₂CH₂CH₂CH₂NHC(O)OC(CH₃)₃).

¹³C-ЯМР (CDCl₃) δ: 156.1, 147.3, 110.9, 110.3, 79.8, 79.2, 50.1, 49.5, 46.0, 44.9, 40.4, 28.6, 27.6, 25.5.

N¹-Ацетил-N⁴,N⁸-ди-(трет-бутилоксикарбонил)-1,8-диамино-2-(метилиден)-4-азаоктан (VIII). К раствору 1 г (2.8 ммоль) соединения (VII) и 0.73 мл (5.25 ммоль) Et₃N в 6 мл абс. CH₂Cl₂ при 4°C добав-

ляли при перемешивании в течение 20 мин раствор 0.25 мл (3.5 ммоль) AsCl_3 в 3 мл абс. CH_2Cl_2 . Реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре, добавляли 1 мл абс. MeOH , перемешивали при комнатной температуре еще 20 мин, разбавляли вдвое CH_2Cl_2 и затем последовательно промывали 1 М NaHCO_3 (3×5 мл), H_2O (5 мл), 10%-ной лимонной кислотой (3×10 мл), H_2O (5 мл), 5 М NaCl (2×10 мл), высушивали над MgSO_4 и упаривали в вакууме досуха. Получили 1.1 г (98%) соединения (VIII) в виде густого масла, R_f 0.33 (Г).

^1H -ЯМР (CDCl_3) δ : 6.56 (1H, уш.с., NHAc), 5.12–5.02 (1H, м, $\text{C}=\text{CH}_2$), 4.98–4.91 (1H, м, $\text{C}=\text{CH}_2$), 4.61 (1H, уш.с., NH Boc), 3.87–3.74 (4H, м, $\text{AcNHCH}_2\text{C}=\text{C} + \text{BocNCH}_2\text{C}=\text{C}$), 3.20–3.04 (4H, м, $\text{BocNHCH}_2\text{CH}_2 + \text{BocNCH}_2\text{CH}_2$), 1.99 (3H, с, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{NH}$), 1.57–1.36 (22H, м, $\text{N}(\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_3)_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C -ЯМР (CDCl_3) δ : 170.1, 156.2, 142.1, 114.5, 112.0, 80.1, 79.3, 49.7, 46.3, 42.00, 40.3, 28.5, 27.6, 25.4, 23.4.

Тригидрохлорид 1,8-диамино-2-(метилен)-4-азаоктана (VIII). К раствору 0.49 г (1.36 ммоль) соединения (VII) в 3 мл абс. EtOH добавляли 2 мл 10 М HCl/EtOH , через 4 ч при 20°C реакционную смесь упаривали в вакууме досуха, остаток соупаривали с абс. EtOH (3×10 мл). Остаток растирали со смесью $\text{EtOH}/\text{Et}_2\text{O}$ (1 : 3), осадок отделяли центрифугированием. После высушивания в вакууме над $\text{P}_2\text{O}_5/\text{KOH}$ получили 287 мг (79%) соединения (VIII), R_f 0.28 (Д). Аналитический образец перекристаллизовывали из MeOH/EtOH , т. пл. $178\text{--}179^\circ\text{C}$.

^1H -ЯМР (D_2O) δ : 5.61–5.57 (1H, м, $\text{C}=\text{CH}_2$), 5.56–5.52 (1H, м, $\text{C}=\text{CH}_2$), 3.77 (2H, с, $=\text{CCH}_2\text{NH}_2$), 3.72 (2H, с, $=\text{CCH}_2\text{NH}$), 3.20–3.10 (2H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.09–2.99 (2H, м, NHCH_2CH_2), 1.88–1.69 (4H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$).

^{13}C -ЯМР (D_2O) δ : 132.7, 120.4, 49.4, 47.2, 41.4, 38.9, 24.0, 22.7.

HRESIMS: m/z вычислено для $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}_3$ [$M + \text{H}$] $^+$: 158.1657. Найдено: 158.1661.

Дигидрохлорид N^1 -ацетил-1,8-диамино-2-(метилен)-4-азаоктана (II). К раствору 1.1 г (2.8 ммоль) соединения (VIII) в 7 мл абс. EtOH добавляли 3 мл 10 М HCl/EtOH , через 4 ч при 20°C реакционную смесь упаривали в вакууме досуха, остаток соупаривали с абс. EtOH (3×10 мл). Остаток растирали со смесью $\text{EtOH}/\text{Et}_2\text{O}$ (1 : 3), осадок отделяли центрифугированием. После высушивания в вакууме над $\text{P}_2\text{O}_5/\text{KOH}$ получили 0.66 г (88%) соединения (II), R_f 0.54 (Д). Аналитический образец перекристаллизовывали из MeOH/EtOH , т. пл. $154\text{--}155^\circ\text{C}$.

^1H -ЯМР (D_2O) δ : 5.35–5.30 (1H, м, $\text{C}=\text{CH}_2$), 5.29–5.24 (1H, м, $\text{C}=\text{CH}_2$), 3.82 (2H, с, $=\text{CCH}_2\text{NH}_2$), 3.63 (2H, с, $=\text{CCH}_2\text{NH}$), 3.14–2.96 (4H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 + \text{NHCH}_2\text{CH}_2$), 2.01 (3H, с, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{NH}$), 1.84–1.65 (4H, м, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$).

^{13}C -ЯМР (D_2O) δ : 174.7, 136.2, 118.0, 49.3, 46.8, 42.0, 38.9, 24.0, 22.7, 21.8.

HRESIMS: m/z вычислено для $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}$ [$M + \text{H}$] $^+$: 200.1763. Найдено: 200.1762.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен и реализован удобный семистадийный способ синтеза неизвестных ранее 2-метиленовых производных спермидина 2-Met-Spd и N^1 -Ac-2-Met-Spd, позволяющий получать данные целевые вещества с высокими суммарными выходами. Полученные соединения могут служить полезными инструментами в исследовании метаболизма полиаминов, а именно представляют интерес для изучения особенностей PАОХ-реакции, а также обладают определенным потенциалом для ингибирования фермента в культуре клеток.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность А.О. Чижову (Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН) за регистрацию масс-спектров.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 17-74-20049).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miller-Fleming L., Olin-Sandoval V., Campbell K., Ralser M. // J. Mol. Biol. 2015. V. 427. P. 3389–3406. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.06.020>
2. Pegg A.E. // J. Biol. Chem. 2016. V. 291. P. 14904–14912. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.731661>
3. Casero R.A., Murray Stewart T., Pegg A.E. // Nature Rev. Cancer. 2018. V. 18. P. 681–695. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0050-3>

4. Holbert C.E., Cullen M.T., Casero R.A., Jr., Murray Stewart T. // *Nature Rev. Cancer*. 2022. <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00473-2>
5. Gerner E.W., Bruckheimer E., Cohen A. // *J. Biol. Chem.* 2018. V. 293. P. 18770–18778. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.003343>
6. Alhonen L., Parkkinen J.J., Keinänen T., Sinervirta R., Herzig K.H., Janne J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 8290–8295. <https://doi.org/10.1073/pnas.140122097>
7. Murray-Stewart T., Dunworth M., Foley J.R., Schwartz C.E., Casero R.A. // *Med. Sci. (Basel)*. 2018. V. 6. P. E112. <https://doi.org/10.3390/medsci6040112>
8. Inoue K., Tsutsui H., Akatsu H., Hashizume Y., Matsukawa N., Yamamoto T., Toyooka T. // *Sci. Rep.* 2013. V. 3. P. 2364. <https://doi.org/10.1038/srep02364>
9. Lewandowski N.M., Ju S., Verbitsky M., Ross B., Geddie M.L., Rockenstein E., Adame A., Muhammad A., Vonsattel J.P., Ringe D., Cote L., Lindquist S., Masliah E., Petsko G.A., Marder K., Clark L.N., Small S.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 16970–16975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011751107>
10. Guerra G.P., Rubin M.A., Mello C.F. // *Pharmacol. Res.* 2016. V. 112. P. 99–118. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.03.023>
11. Eisenberg T., Abdellatif M., Schoeder S., Primessnig U., Stekovic S., Pendl T., Harger A., Schipke J., Zimmermann A., Schmidt A., Tong M., Ruckstuhl Ch., Dambruuck Ch., Gross A.S., Herbst V., Magnes Ch., Trausinger G., Narath S., Meinitzer A., Hu Z., Kirsch A., Eller K., Carmona-Gutierrez D., Büttner S., Pietrocola F., Knittelfelder O., Schrepfer E., Rockenfeller P., Simonini C., Rahn A., Horsch M., Moreth K., Beckers J., Fuchs H., Gailus-Durner V., Neff F., Janik D., Rathkolb B., Rozman J., Hrabe de Angelis M., Moustafa T., Haemmerle G., Mayr M., Willeit P., von Frieling-Salewsky M., Pieske B., Scorrano L., Pieber T., Pechlaner R., Willeit J., Sigrist S.J., Linke W.A., Mühlfeld Ch., Sadoshima J., Dengjel J., Kiechl S., Kroemer G., Sedej S., Madeo F. // *Nature Med.* 2016. V. 22. P. 1428–1438. <https://doi.org/10.1038/nm.4222>
12. Igarashi K., Kashiwagi K. // *Mol. Nutr. Food Res.* 2011. V. 55. P. 1332–1341. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100068>
13. Ramani D., De Bandt J.P., Cynober L. // *Clin. Nutr.* 2014. V. 33. P. 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2013.09.019>
14. Wallace H.M., Duthie J., Evans D.M., Lamond S., Nicoll K.M., Heys S.D. // *Clin. Cancer Res.* 2000. V. 6. P. 3657–3661.
15. Bey P., Bolkenius F.N., Seiler N., Casara P. // *J. Med. Chem.* 1985. V. 28. P. 1–2. <https://doi.org/10.1021/jm00379a001>
16. Sjorgen T., Wassvik C.M., Snijder A., Aagaard A., Kumanomidou T., Barlund L., Kaminski T.P., Kasima T.P., Yokota T., Fjellstrom O. // *Biochemistry*. 2017. V. 56. P. 458–467. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b01140>
17. Bianchi M., Polticelli F., Ascenzi P., Botta M., Federico R., Mariottini P., Cona A. // *FEBS J.* 2006. V. 273. P. 1115–1123. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05137.x>
18. Dunston T.T., Khomutov M.A., Gabelli S.B., Stewart T.M., Foley J.R., Kochetkov S.N., Khomutov A.R., Casero R.A., Jr. // *Acta Naturae*. 2020. V. 12. P. 140–144. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.10992>
19. Khomutov M.A., Hyvönen M.T., Simonian A.R., Weisell J., Vepsäläinen J., Alhonen L., Kochetkov S.N., Keinänen T.A., Khomutov A.R. // *Mendeleev Commun.* 2018. V. 28. P. 479–481. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2018.09.008>
20. Hyvönen M.T., Keinänen T.A., Khomutov M., Simonian A., Weisell J., Kochetkov S.N., Vepsäläinen J., Alhonen L., Khomutov A.R. // *J. Med. Chem.* 2011. V. 54. P. 4611–4618. <https://doi.org/10.1021/jm200293r>
21. Хомутов М.А., Мухура И.В., Кочетков С.Н., Хомутов А.Р. // *Биоорг. химия*. 2019. Т. 45. С. 588–614. [Khomutov M.A., Mikhura I.V., Kochetkov S.N., Khomutov A.R. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 463–487.] <https://doi.org/10.1134/S013234231906023X>
22. Григоренко Н.А., Хомутов М.А., Симонян А.Р., Кочетков С.Н., Хомутов А.Р. // *Биоорг. химия*. 2016. Т. 42. С. 469–474. [Grigorenko N.A., Khomutov M.A., Simonian A.R., Kochetkov S.N., Khomutov A.R. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2016. V. 42. P. 423–427.] <https://doi.org/10.7868/S0132342316030088>

Synthesis of 2-Methylidene Spermidine and Its *N*¹-Acetylated Derivative

M. A. Khomutov*, # and A. R. Khomutov*

#Phone: +7 (499) 135-60-65; e-mail: makhomutov@mail.ru

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

Simple and practical synthetic protocols are developed for the preparation of earlier unknown 2-methylidene derivatives of spermidine and *N*¹-Ac-spermidine, i.e., 1,8-diamino-2-methylidene-4-azaooctane (2-Met-Spd) and *N*¹-(acetyl)-1,8-diamino-2-methylidene-4-azaooctane (*N*¹-Ac-2-Met-Spd), respectively. Target compounds were obtained each in seven steps with high overall yields starting from the commercially available 2-chloromethyl-3-chloropropene-1. Possible application of newly synthesized spermidine analogues for the inhibition of FAD-dependent *N*¹-acetyl polyamine oxidase is discussed.

Keywords: polyamines, spermidine analogs, acetylpolyamine oxidase



УДК 543.544.5.068.7;577.164.12;591.148.1

РИБОФЛАВИН КАК ОДИН ИЗ ВОЗМОЖНЫХ КОМПОНЕНТОВ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ СИСТЕМЫ ГРИБНЫХ КОМАРОВ РОДА *Keroplatus* (INSECTA: DIPTERA: KEROPLATIDAE)¹

© 2022 г. А. А. Котлобай*, #, М. А. Дубинный*, А. В. Полевой**,
С. И. Ковальчук*, З. М. Каськова*, ***, #

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

**Институт леса Карельского научного центра РАН, Россия, 185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

***Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова,
Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Поступила в редакцию 04.05.2022 г.

После доработки 09.06.2022 г.

Принята к публикации 17.06.2022 г.

Личинки некоторых видов грибных комаров рода *Keroplatus* семейства Keroplatidae (Diptera, Bibiopotomorph) способны испускать свечение синего цвета. Биолюминесценция Keroplatidae наименее изучена среди всех наземных насекомых, и на данный момент известны лишь единичные факты о биологии и биохимии этого процесса. В данной работе мы приводим первые результаты изучения биохимии светящихся личинок *Keroplatus testaceus*, содержащих рибофлавин в достаточно высокой концентрации. Мы предполагаем, что рибофлавин может быть одним из участников процесса биолюминесценции *Keroplatus* spp.

Ключевые слова: *Keroplatus*, биолюминесценция, рибофлавин, Diptera, ЯМР-спектроскопия, витамины

DOI: 10.31857/S0132342322060161

ВВЕДЕНИЕ

Биолюминесценция, или способность излучать свет, среди насекомых встречается у представителей трех отрядов: Жесткокрылые, Двукрылые и Коллемболы. Механизмы биолюминесценции жесткокрылых хорошо изучены, в то время как знаний о молекулярных основах свечения двукрылых недостаточно. Отряд двукрылых включает в себя только одну группу видов, обладающих биолюминесценцией, — это грибные комары семейства Keroplatidae, к которым относятся ~1000 видов, объединенных в 100 родов [1]. Среди них способны светиться лишь представители нескольких отдельных видов — это виды рода *Arachnocampa* (Edwards, 1924) из подсемейства Arachnocampinae (Австралия и Новая Зеландия) [2], вид *Orfelia fultoni* (Fisher, 1940) подсемейства Keroplatinae (триба Orfeliini) (Северная Америка) [3] и, наконец, виды рода *Keroplatus* (Bosc, 1792) (Европа и северная часть Азии), а также недавно от-

крытый вид *Neoceroplatus betaryensis* (Falaschi, Johnson & Stevani, 2019) (Бразилия) подсемейства Keroplatinae, триба Keroplatini [4].

Светоизлучение у насекомых Keroplatidae основано на каталитическом окислении молекулы люциферина при участии фермента люциферазы [5, 6], однако в морфологии, физиологии и химической природе биолюминесценции двукрылых разных подсемейств мало общего [7]. У личинок *Arachnocampa* spp. светится брюшко, а в излучении света участвуют мальпигиевы сосуды [8]. Биолюминесцентная система *Arachnocampa luminosa* относится к АТФ-зависимым, а молекула люциферина, по всей видимости, состоит из остатков тирозина и ксантуреновой кислоты [9]. У личинок *O. fultoni* светятся пять передних сегментов и брюшко [10], сама реакция биолюминесценции не зависит от кофакторов и, вероятно, имеет схожий с видами Keroplatini механизм [11]. У представителей *Keroplatus* spp. за счет белковых гранул жирового тела светится все тело личинки [12]. Сами личинки создают слизистую паутину под древесными грибами и излучают синий свет ($\lambda_{\max} = 460$ нм) [13]. Биолюминесценция личинок *Keroplatus* впервые была описана в середине XIX в. [14] на примере *K. tipuloides* (Bosc, 1792)

¹ Дополнительные материалы к этой статье доступны по doi 10.31857/S0132342322060161 для авторизованных пользователей.

Авторы для связи: (эл. почта: alexey_kotlobay@ibch.ru; zkaskova@ibch.ru).



Рис. 1. Личинка *Keroplatus* spp. на нижней поверхности трутовика (масштабный отрезок 20 мм).

(=*K. sesioides* Wahlberg, 1839) и несколько раз подтверждалась уже позднее [3, 15, 16]. Биохимия биолюминесценции *Keroplatus*, а также ее биологическая и экологическая функции до сих пор остаются одними из наименее изученных аспектов биологии среди всех светящихся насекомых. В данной работе мы сообщаем о рибофлавине (витаине В2) как об одном из флуоресцентных соединений, обнаруженных в относительно высокой концентрации [17] в личинках *Keroplatus testaceus*. Мы предполагаем, что рибофлавин может иметь отношение к химизму свечения этого вида Keroplatidae.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для данного исследования личинки *Keroplatus* были собраны с нижней поверхности трутовиков на территории Государственного природного заповедника “Кивач” в Карелии (рис. 1) в июне–июле 2020 г. Для сохранения компонентов биолюминесцентной системы биоматериал сразу после сбора замораживали в алюминиевой фольге с помощью сухого льда, а затем перемещали в лабораторную морозильную камеру для дальнейшего хранения при температуре -70°C . Несколько незамороженных живых личинок были перевезены в лабораторию для определения вида. Как мы и предполагали изначально, собранные личинки

принадлежали к виду *K. testaceus*, наиболее распространенному в данном регионе.

Для первичного исследования биолюминесцентной системы *Keroplatus* мы сосредоточились на выделении флуоресцентных компонентов из экстрактов личинок, которые могли бы быть возможными молекулами оксилуциферина [18]. Среди ряда полученных экстрактов (в этаноле, ацетоне, гексане, водных буферах и др.), приготовленных из замороженных личинок *K. testaceus*, водные экстракты проявляли наиболее интенсивную флуоресценцию (рис. 2а, врезка). Оптимизация условий экстракции (включая выбор оптимальной температуры и состава буфера) позволила получить флуоресцентный экстракт, который затем фильтровали с помощью ультрафильтрационной мембраны для удаления высокомолекулярных примесей. В результате все флуоресцентные компоненты оказывались исключительно в фильтрате. Далее полученный образец подвергли процедуре очистки методом ВЭЖХ (рис. 2а). Фракции, содержащие флуоресцентные соединения, идентифицировали путем измерения флуоресценции и поглощения при 366 нм, собирали отдельно, лиофильно высушивали и использовали для дальнейшего анализа. Последовательная серия хроматографических экспериментов позволила выделить из биомассы личинок *K. testaceus* ~3.5 опт. ед. индивидуального флуоресцентного

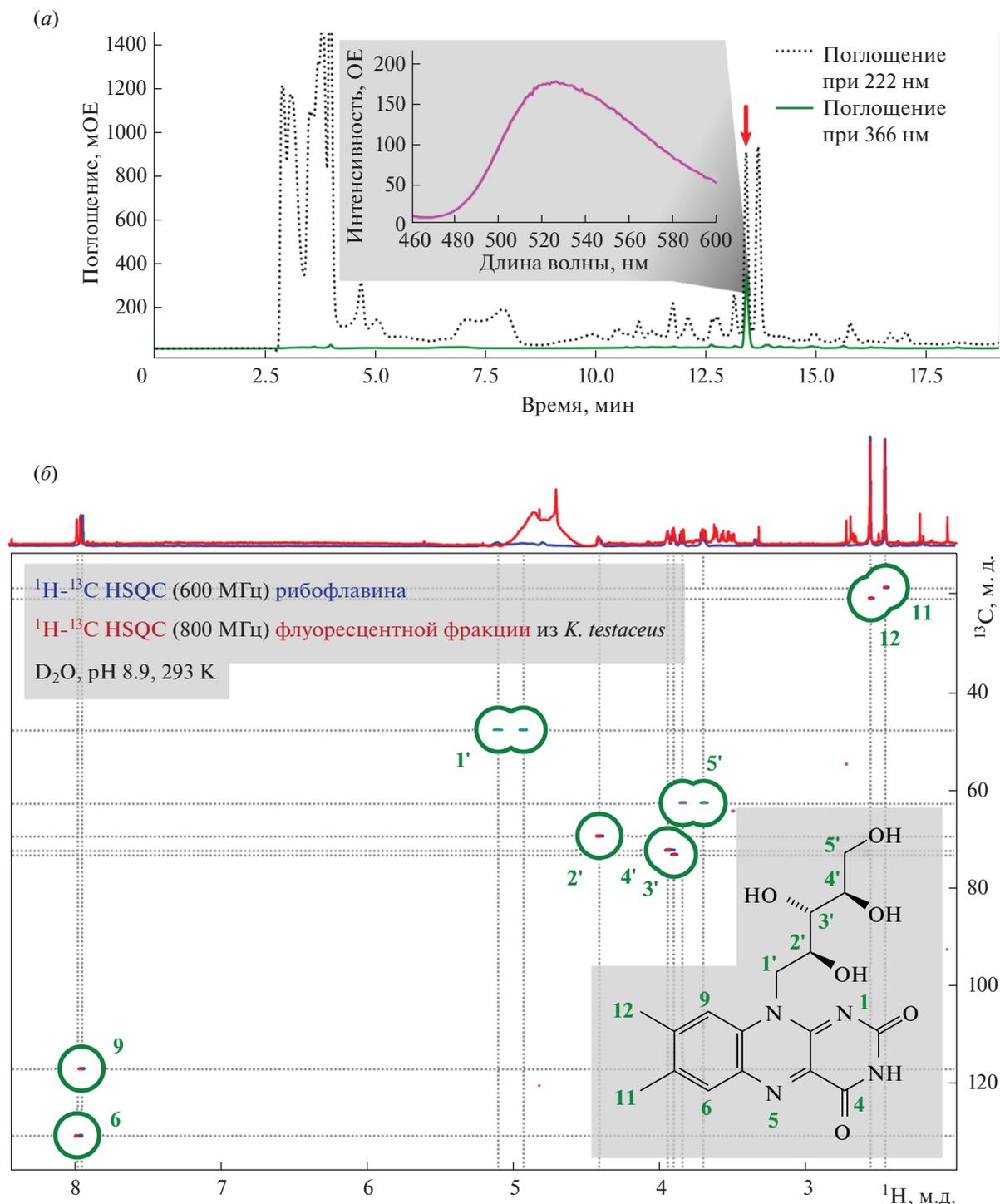


Рис. 2. Очистка и определение структуры флуоресцентного вещества – рибофлавина (витамина В2) – из личинок *Keroplatus* spp.: (а) – хроматографический профиль водного экстракта из лиофилизированных личинок *Keroplatus* spp. Красной стрелкой отмечена флуоресцентная фракция. Врезка – спектр флуоресценции водного экстракта из замороженных личинок *Keroplatus* spp. (возбуждение при 366 нм); (б) – ^1H - ^{13}C HSQC ЯМР-спектр с редактированием в соответствии с мультиплетностью сигналов для флуоресцентного соединения из личинок *Keroplatus* (красный и розовый), наложенный на ЯМР-спектр стандартного образца рибофлавина (синий и голубой) при тех же условиях. Врезка – условия проведения ЯМР-экспериментов (более подробную информацию см. в “Эксперим. части”) и химическая структура рибофлавина с нумерацией атомов (зеленый), совпадающей с метками пиков и химическими сдвигами в табл. S1 (см. дополнительные материалы).

соединения. Полученный образец анализировали методом ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения. Комбинацией ЯМР-экспериментов (рис. 2б; рис. S1 и табл. S1 в дополнительных материалах) и ВЭЖХ-анализа полученного образца в сравнении с коммерчески доступным рибофлавином (витамин В2) была показана идентичность данных соединений. Масс-спектрометрией высокого разрешения было установлено наличие в природном образце молекулярных ионов рибофлавина при положительном и отрицательном режимах съемки. Концентрация рибофлавина в биомассе личинок *Keroplatus testaceus* достаточно высока — 3.4 опт. ед. на 1 г биомассы, что соответствует 83 мкг рибофлавина на 1 г биомассы.

Биологическое и экологическое значение биолюминесценции двукрылых до сих пор изучено мало. Личинки *Arachnocampa luminosa* — хищники, обитают в темных пещерах. Предположительно, они используют светоизлучение для привлечения добычи в липкие нити создаваемых ими охотничьих сетей [19]. Хищные *Orfelia fultoni* также используют свечение для привлечения и захвата добычи в липкую паутину [20].

В то же время о биологии, и особенно о биохимии и экологической функции биолюминесценции *Keroplatus* известно очень мало. Свечение *Keroplatus* было впервые описано более ста лет назад [14], а представители этого рода очень редки. На данный момент существуют предложения использовать *Keroplatus* в качестве биоиндикатора состояния лесных экосистем, в том числе для отслеживания изменений экологического состояния конкретных биотопов и охраны природы [21]. Личинки *Keroplatus* spp. питаются грибными спорами и мелкими беспозвоночными [22]. Они испускают видимый свет с самой короткой длиной волны излучения среди всех наземных членистоногих. Возможно, он используется для привлечения потенциальной добычи, как и у других *Keroplatae*. Поскольку личинки склонны избегать солнечного света, существует гипотеза о том, что биолюминесценция может иметь защитную функцию [23]. По другому предположению, свет может быть направлен на гриб, чтобы он произвел больше спор [23]. Биолюминесцентная система *Keroplatus* уникальна и выступает одной из наименее изученных среди представителей всех наземных видов насекомых. Любые новые данные могут быть полезны для дальнейшего понимания природы и химизма биолюминесценции *Keroplatae*.

Рибофлавин (витамин В2) — исходное соединение в биосинтезе коферментов флавиномононуклеотида (FMN) и флавинадениндуклеотида (FAD). Биосинтез рибофлавина осуществляется в клетках бактерий, грибов и растений, но не в клетках животных [24]. Высокая концентрация

витамина В2 в личинках *Keroplatus* указывает на то, что особи накапливают его по какой-то определенной причине. В качестве витамина рибофлавин необходим для трансформации насекомого из стадии личинки в стадию имаго. Также мы предполагаем, что он может иметь отношение к биолюминесценции *Keroplatus*, но для определения точной роли рибофлавина в свечении личинок требуется установление структуры всех участников данного процесса. Известно, что рибофлавин и FMN — это светоизлучатели в бактериальной биолюминесцентной системе [25–27], и их спектры эмиссии могут изменяться в результате ковалентного связывания с белком. Интересно, что недавние эксперименты с родственной биолюминесцентной системой вида *Orfelia fultoni* показали наличие в “горячих” экстрактах флуоресцентного зелено-желтого пигмента неизвестной структуры с максимумом флуоресценции в области 543 нм [11], который также может быть рибофлавином, однако данное предположение требует дополнительного подтверждения. Для установления потенциальной роли рибофлавина или его метаболитов в реакции биолюминесценции *Keroplatus* необходимы дальнейшие исследования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Сбор биоматериала. Личинок *Keroplatus testaceus* собирали с нижней стороны грибов трутовиков, растущих на упавших деревьях, в Государственном природном заповеднике “Кивач” с разрешения администрации. Заповедник “Кивач” находится на расстоянии 27 км от г. Кондопога и 80 км от г. Петрозаводск. Географические координаты: N 62.16126 E 33.58969. Адрес: 186220, Республика Карелия, Кондопожский район, пос. Кивач, ул. Заповедная, 14. Собранных личинок помещали в алюминиевую фольгу (по 2–3 личинки на лист площадью 12–14 см²) и замораживали с помощью сухого льда для транспортировки и дальнейшего хранения в лаборатории в морозильной камере при температуре –70°C. Несколько замороженных живых личинок перевезли в лабораторию для определения вида.

Определение вида. Род *Keroplatus* в Карелии представлен тремя близкими видами: *K. testaceus* (Dalman, 1918), *K. dispar* (Dufour, 1839) и *K. tuvensis* (Zaitzev, 1991) [28]. Все виды имеют схожий внешний вид и могут быть достоверно идентифицированы по различиям в строении гениталий самцов, а именно по форме вентрального отростка гонокситов [22]. По нашим предположениям, собранные личинки принадлежат к наиболее распространенному в данном регионе виду *K. testaceus*. Достоверное определение до видового уровня на личиночных стадиях развития в данной группе практически невозможно, поэтому 28.06.2020 г.

несколько живых личинок были помещены в камеру для выведения имаго. В результате 09.07.2020 г. была получена одна взрослая самка. Самки *K. testaceus* отличаются от *K. dispar* особенностями жилкования крыльев (субкоста заканчивается примерно на уровне конца отрезка слияния радиальной и медиальной жилок) и формой церок (наибольшая толщина приходится на среднюю часть) [29, 30]. Идентификация, которую проводили по ключу Matile [29], подтвердила, что данная особь принадлежит к виду *K. testaceus* (рис. S2 в дополнительных материалах). Учитывая тот факт, что личинки были собраны на достаточно ограниченной территории, на сходных субстратах и в одно и то же время, мы предполагаем, что все они принадлежат к одному виду.

Получение экстрактов из биомассы. Две–три замороженные личинки *K. testaceus* (~0.2 г) перетирали в жидком азоте с помощью ступки и пестика. Полученный в результате измельчения порошок переносили в 1 мл TBS-буфера (50 mM Tris-HCl, 2 mM ЭДТА, pH 7.5) и инкубировали 30 мин на ледяной бане при постоянном перемешивании. Затем образец центрифугировали в течение 15 мин при 4°C и 15 000 g. Полученный в результате надосадочный раствор, содержащий исследуемые соединения, переносили в отдельную пробирку и использовали для процедуры ультрафильтрации перед дальнейшим разделением или лиофильно высушивали для хранения при температуре –70°C.

Ультрафильтрация. Раствор экстракта биомассы переносили в ультрафильтрационную ячейку 3 kDa Amicon® Ultra Centrifugal Filter Unit (Merck Millipore, Германия) и осуществляли процедуру ультрафильтрации согласно инструкции производителя. Проводили детекцию флуоресценции: флуоресценция наблюдалась только в профильтрованных образцах, которые в дальнейшем использовали для исследования методом обращенно-фазовой хроматографии.

ВЭЖХ-анализ. Для анализа образца методом обращенно-фазовой хроматографии использовали колонку Luna 5 μm C18(2) 100 Å (4.6 × 250 мм; Phenomenex, США), установленную на хроматографическую систему (Shimadzu Corporation, Япония). Состав растворов подвижной фазы был следующим: раствор А – 0.1%-ный водный раствор трифторуксусной кислоты, раствор Б – 0.08%-ный раствор трифторуксусной кислоты в ацетонитриле. Разделение проводили в линейном градиенте раствора Б от 25 до 45% в течение 20 мин при скорости потока 1 мл/мин. Во время разделения детектировали поглощение выходящего после колонки раствора при длине волны проходящего света 222 и 366 нм. Фракции, содержащие исследуемые соединения, собирали по отдельности и затем лиофильно высушивали.

Регистрация спектров флуоресценции. Для регистрации спектров флуоресценции использовали спектрометр Cary Eclipse Fluorescence Spectrometer (Agilent Technologies, США). Для проведения измерения лиофильно высушенный образец растворяли в 1 мл TBS-буфера (50 mM Tris-HCl, 2 mM ЭДТА, pH 7.5). Коррекцию фона производили по измерению флуоресценции чистого TBS-буфера.

ЯМР-спектроскопия. ЯМР-спектры регистрировали на ЯМР-спектрометре Avance III 800 МГц (Bruker, Германия), снабженном криодатчиком 5 мм СРТС1. Для этого лиофилизированную флуоресцентную фракцию растворяли в D₂O (330 мкл), значение pH 8.9 определяли с использованием настольного pH-метра Orion 2-star (Thermo Scientific, США). Образец переносили в 5-мм ЯМР-ампулу Shigemi со стеклянным плунжером для максимальной концентрации и повышенной ЯМР-чувствительности. 1D и 2D ЯМР-спектры регистрировали при 20°C. Получили спектры 1D ¹H-ЯМР с предварительным насыщением сигнала воды, 2D ¹H-¹³C-HSQC с редактированием спектра в соответствии с мультиплетностью сигналов (рис. 2б) и 2D DQF-COSY (рис. S1 в дополнительных материалах). Полученных данных было достаточно для однозначной идентификации рибофлавина как единственного вещества в образце. Его идентичность была подтверждена сравнением со стандартом рибофлавина (Sigma-Aldrich, США), аналогичные спектры были получены для образца стандарта в D₂O при pH 8.9 и температуре 20°C на ЯМР-спектрометре Avance III 600 МГц (Bruker, Германия), снабженном криодатчиком 5 мм СРТХ1. Величины химических сдвигов нормировали относительно сигнала HOD (4.826 м.д. при 20°C [31]). Отнесение ЯМР-сигналов рибофлавина соответствовало данным, полученным из SDBS (Spectral Database for Organic Compounds), номер соединения 2254 (<https://sdb.sdb.aist.go.jp>).

Масс-спектрометрический анализ. Масс-спектрометрический анализ высокого разрешения для очищенных образцов проводили на масс-спектрометре QExactive Plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, США). Образцы разделяли на хроматографе Ultimate 3000 RSLCnano (Thermo Fisher Scientific, США) и подавали в масс-спектрометр через источник ионизации электроспреем. Разделение образцов проводили на колонке Zorbax C8 2 × 150 мм (Agilent, США) в линейном градиенте раствора Б от 15 до 99% в течение 8 мин при скорости потока 200 мкл/мин. В качестве буферов для разделения использовали 0.1%-ный раствор муравьиной кислоты, 10 mM формиат аммония в воде (раствор А); 0.1%-ный раствор муравьиной кислоты, 10 mM формиат аммония в 90%-ном ацетонитриле, 10% воды (раствор Б). Данные по-

лучали в режиме зависимых сканирований (DDA – Data Dependent Acquisition) с регистрацией спектров в позитивном и негативном режимах ионизации в диапазоне масс 250–2000 а.е.м. и разрешении 35К для спектров MS1. MS2-спектры получали при разрешении 17.5К с использованием ступенчатой энергии ионизации (N)CE 15, 30, 45 и окном изоляции родительских ионов шириной 1.4 m/z . Для выделенного из биомассы соединения были детектированы m/z 377.1470 ($[M + H]^+$) и 375.1285 ($[M - H]^-$) при вычисленной массе для молекулы с атомарным составом $C_{17}H_{20}N_4O_6$ для ионов ($[M + H]^+$) $m/z = 377.1456$ и ($[M - H]^-$) $m/z = 375.1310$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В связи с редкостью, небольшими размерами и скрытым образом жизни изучение грибных комаров *Keroplastus* spp. очень затруднено, и на сегодняшний день о биохимии их биолюминесценции известно очень мало. Мы проанализировали водные экстракты личинок *K. testaceus* и обнаружили, что одно из выделенных из личинок флуоресцентных веществ – это рибофлавин (витамин B2). Мы предполагаем, что рибофлавин может участвовать в биолюминесценции этих представителей Keroplatidae, однако точную роль данного соединения в процессе свечения личинок еще предстоит установить.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Ольге Викторовне Фоминой (ГПЗ “Кивач”) и Ренате Загитовой (Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН) за помощь в организации сбора биомассы.

Исследования частично выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00479).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mantič M., Sikora T., Burdíkova N., Blagoderov V., Kjørandsen J., Kurina O., Ševčík J. // *Insects*. 2020. V. 11. P. 348. <https://doi.org/10.3390/insects11060348>
2. Baker C. // In *Bioluminescence in Focus – a Collection of Illuminating Essays* / Ed. Meyer-Rochow V.B. Res. Signpost, Kerala, India, 2009. P. 305–324.
3. Sivinski J.M. // *Fla. Entomol.* 1998. V. 81. P. 282–292.
4. Falaschi R.L., Amaral D.T., Santos I., Domingos A.H.R., Johnson G.A., Martins A.G.S., Viroomal I.B., Pompéia S.L., Mirza J.D., Oliveira A.G., Bechara E.J.H., Viviani V.R., Stevani C.V. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 11291. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47753-w>
5. Viviani V.R. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2002. V. 59. P. 1833–1850. <https://doi.org/10.1007/PL00012509>
6. Ševčík J., Kasprák D., Mantič M., Fitzgerald S., Ševčíková T., Tóthová A., Jaschhof M. // *PeerJ*. 2016. V. 4. P. e2563. <https://doi.org/10.7717/peerj.2563>
7. Viviani V.R., Hastings J.W., Wilson T. // *Photochem. Photobiol.* 2002. V. 75. P. 22–27. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)0750022TB DTNA2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0750022TB DTNA2.0.CO2)
8. Green L.F.B. // *Tissue Cell.* 1979. V. 11. P. 457–465. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(79\)90056-9](https://doi.org/10.1016/0040-8166(79)90056-9)
9. Watkins O.C., Sharpe M.L., Perry N.B., Krause K.L. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 3278. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21298-w>
10. Bassot J.M. // *Comptes Rendus Hebd. Seances Ser. D. Sci. Nat.* 1978. V. 268. P. 623–626.
11. Viviani V.R., Silva J.R., Amaral D.T., Bevilaqua V.R., Abdalla F.C., Branchini B.R., Johnson C.H. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. P. 9608. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66286-1>
12. Baccetti B., Crovetto A., Santini L. // *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 1987. V. 16. P. 169–176. [https://doi.org/10.1016/0020-7322\(87\)90016-X](https://doi.org/10.1016/0020-7322(87)90016-X)
13. Oba Y., Branham M.A., Fukatsu T. // *Zoolog. Sci.* 2011. V. 28. P. 771–789. <https://doi.org/10.2108/zsj.28.771>
14. Wahlberg P. // *Stett. Entomol. Ztg.* 1849. V. 10. P. 120–123.
15. Pfeiffer H., Stammer H.J. // *Z. Für Morphol. Ökol. Tiere.* 1930. V. 20. P. 136–171. <https://doi.org/10.1007/BF00407647>
16. Stammer H.-J. // *Z. Für Morphol. Ökol. Tiere.* 1932. V. 26. P. 135–146. <https://doi.org/10.1007/BF00446392>
17. Kouřimská L., Adámková A. // *NFS J.* 2016. V. 4. P. 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2016.07.001>
18. Kotlobay A.A., Dubinnyi M.A., Purtov K.V., Guglya E.B., Rodionova N.S., Petushkov V.N., Bolt Y.V., Kublitski V.S., Kaskova Z.M., Ziganshin R.H., Nelyubina Y.V., Dorovatskii P.V., Eliseev I.E., Branchini B.R., Bourenkov G., Ivanov I.A., Oba Y., Yampolsky I.V., Tsarkova A.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019. V. 116. P. 18911–18916. <https://doi.org/doi.org/10.1073/pnas.1902095116>

19. *Broadley R.A., Stringer I.A.N.* // *Biolumin. Focus. Collect. Illum. Essays Kerala Res. Signpost.* 2009. P. 325–355.
20. *Fulton B.B.* // *Ann. Entomol. Soc. Am.* 1941. V. 34. P. 289–302.
<https://doi.org/10.1093/aesa/34.2.289>
21. *Speight M.C.* // *Les Invertébrés Saproxyliques et Leur Protection.* Conseil de l'Europe, 1989.
22. *Зайцев А.И.* // *Бюлл. Моск. общества испытателей природы. Отд. биол.* 1991. Т. 96. № 3. С. 39–47.
23. *Osawa K., Sasaki T., Meyer-Rochow V.* // *Entomologie Heute.* 2014. V. 26. P. 139–149.
24. *Merrill A.H., McCormick D.B.* // *Present Knowl. Nutr. Basic Nutr. Metab.* 11th ed. / Eds. Marriott B.P., Birt D.F., Stallings V.A., Yates A.A. Cambridge: Elsevier, 2020.
25. *Daubner S.C., Astorga A.M., Leisman G.B., Baldwin T.O.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987. V. 84. P. 8912–8916.
<https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.8912>
26. *Macheroux P., Schmidt K.U., Steinerstauch P., Ghisla S., Colepicolo P., Buntic R., Hastings J.W.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987. V. 146. P. 101–106.
[https://doi.org/10.1016/0006-291x\(87\)90696-6](https://doi.org/10.1016/0006-291x(87)90696-6)
27. *Petushkov V.N., Gibson B.G., Lee J.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. V. 211. P. 774–779.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1880>
28. *Полевой А.В.* // *Грибные комары (Diptera: Bolitophilidae, Ditomyiidae, Keroplatidae, Diadocidiidae, Muscatorphilidae) Карелии / Под ред. Яковлева Е.Б. Карельский НЦ РАН, Петрозаводск, 2000. 84 с.*
29. *Matile L.* // *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle. Série A, Zoologie.* 1990. V. 148. P. 1–682.
30. *Økland B., Sølvi G.E., Serie B.* // *Fauna Norv. Ser. B. Citeseeer.* 1992. V. 39. P. 85–88.
31. *Gottlieb H.E., Kotlyar V., Nudelman A.* // *J. Org. Chem.* 1997. V. 62. P. 7512–7515.
<https://doi.org/10.1021/jo971176v>

Riboflavin as One of Possible Components of *Keroplatus* (Insecta: Diptera: Keroplatidae) Fungus Gnat Bioluminescence

A. A. Kotlobay*^{*, #}, M. A. Dubinnyi*, A. V. Polevoi^{*, #}, S. I. Kovalchuk*, and Z. M. Kaskova*^{*, ***}, #**

[#]*E-mail: alexey_kotlobay@ibch.ru; zkaskova@ibch.ru*

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

^{**}*Forest Research Institute of Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences,
ul. Pushkinskaya 11, Petrozavodsk, 185910 Russia*

^{***}*Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997 Russia*

Keroplatus is a genus of fungus gnats family Keroplatidae (Diptera, Bibionomorpha). Larvae of some species emit a constant blue light from the body. The bioluminescence of Keroplatidae is one of the least studied of all terrestrial insects and very few facts are known to date of its biology and biochemistry. Here we report the high level of riboflavin in *Keroplatus testaceus* larvae, a fluorescent compound that might be relative to its bioluminescent system. We suppose that riboflavin may play a role in *Keroplatus* spp. bioluminescence.

Keywords: Keroplatus, bioluminescence, riboflavin, Diptera, NMR spectroscopy, vitamins



УДК 577.214.62:5577.218

ПОИСК ОПУХОЛЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРОМОТОРОВ *in silico*¹

© 2022 г. К. Н. Кашкин*, #

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

Поступила в редакцию 06.04.2022 г.

После доработки 18.05.2022 г.

Принята к публикации 20.05.2022 г.

Ранее мы продемонстрировали опухолеспецифическую активность нескольких природных и химерных промоторов человека. В данной работе исследованы профили узнавания транскрипционных факторов и нуклеотидные мотивы в опухолеспецифических промоторах. Был идентифицирован ряд профилей, которые чаще присутствуют в опухолеспецифических промоторах, чем в промоторах генов домашнего хозяйства. Проведен поиск новых предполагаемых регуляторных связей промоторов с факторами транскрипции. Выявлен нуклеотидный мотив из 44 пар нуклеотидов, характерный для опухолеспецифических промоторов, но не для промоторов генов домашнего хозяйства. Среди 29 598 промоторов человека из базы данных промоторов EPDnew выявлен ряд промоторов с этим мотивом, гены которых ассоциированы с неблагоприятным прогнозом при различных опухолях. Мы предполагаем, что некоторые из этих промоторов могут обладать опухолеспецифической активностью. Также было обнаружено близкое сходство по нуклеотидным мотивам между промоторами генов *BIRC5* и *MCM2*. Результаты исследования могут помочь в понимании особенностей транскрипции генов в опухолях, а также в поиске природных опухолеспецифических промоторов или в создании искусственных промоторов для генной терапии рака и разработки противоопухолевых векторных вакцин.

Ключевые слова: транскрипция, регуляция транскрипции, опухоль, промотор, профиль узнавания, фактор транскрипции

DOI: 10.31857/S0132342322060124

ВВЕДЕНИЕ

Функционирование эукариотического промотора – сложный процесс, включающий взаимодействие *цис*- и *транс*-регуляторных элементов промотора с факторами транскрипции (ФТ), ферментами транскрипционного комплекса и регуляторными РНК [1]. Существенную роль в регуляции транскрипции играют эпигенетические механизмы, такие как конформационные изменения хроматина, метилирование ДНК, модификации гистонов [2], а также физико-химические процессы, связанные с разделением фаз [3]. Однако в основе всей регуляции активности промоторов лежит связывание ФТ со специфическими

последовательностями в ДНК и взаимодействие между факторами.

Всего в настоящее время известно более 1600 ФТ человека, их число постоянно растет, но для значительной части из них (более 500 факторов) неизвестны последовательности сайтов связывания с ДНК [4]. Существенная черта сайтов связывания ФТ – их вырожденность и перекрестное сродство разных ФТ к одной и той же последовательности ДНК [5]. Это обеспечивает вероятностную и конкурентную регуляцию транскрипции.

Особенности транскрипции генов наряду с перестройкой метаболизма в трансформированных клетках определяют способности опухолей расти, избегая контроля со стороны окружающих тканей и организма, поэтому изучение этих процессов имеет теоретическое и практическое значение для онкологии. Некоторые из известных ФТ рассматривают в качестве диагностических маркеров опухолей или их метастазов. Так, CDX2 – чувствительный маркер колоректальных аденокарцином, TTF1 – значимый маркер для аденокарцином легкого, PAX8 может служить маркером гинекологических опухолей и т.д. [6]. Поэтому

¹ Дополнительные материалы к этой статье доступны по doi 10.31857/S0132342322060124 для авторизованных пользователей.

Сокращения: ФТ – фактор транскрипции; EPDnew – База эукариотических промоторов (Eucaryotic Promoter Database); TCGA – Атлас геномов рака (The Cancer Genome Atlas); HPA – Атлас белков человека (The Human Protein Atlas); TSS – точка начала транскрипции (Transcription Start Site).

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 330-63-29; эл. почта: kachkine@yandex.ru).

Таблица 1. Промоторы, исследованные в данной работе

Промотор	Индекс EPDnew
Опухолеспецифические промоторы*	
<i>BIRC5</i>	FP024000
<i>CDC6</i>	FP023205
<i>CKS1B</i>	FP001855
<i>MCM2</i>	FP005950
<i>PLK1</i>	FP021553
<i>POLD1</i>	FP026208
<i>TERT</i>	FP007749
	Промотор <i>PCNA</i> *
<i>PCNA</i>	FP026732
Химерные промоторы	
<i>CH2-CH26</i>	[13]
Промоторы генов домашнего хозяйства	
<i>ACTB</i>	FP010679
<i>ALAS1</i>	FP005471
<i>B2M</i>	FP020416
<i>GAPDH</i>	FP017185
<i>GUSB</i>	FP011089, FP011090
<i>HMBS</i>	FP016933, FP016934
<i>HPRT1</i>	FP029346, FP029347
<i>PGK1</i>	FP029028
<i>PPIA1</i>	FP011011
<i>RPL13A</i>	FP026153
<i>RPLP0</i>	FP018538, FP018539
<i>SDHA</i>	FP007723
<i>TBP</i>	FP010603, FP010604
<i>TFRC</i>	FP006502
<i>TUBB</i>	FP009374
<i>YWHAZ</i>	FP012696, FP012697, FP012698

* Только промоторы, изученные в экспериментах [11–13].

изучение ФТ, в частности присутствия их профилей узнавания в промоторах, остается актуальным.

В настоящее время накопленные данные о структуре промоторов уже открывают большие перспективы для использования промоторов в практической медицине, например, в составе генно-инженерных векторов для генной терапии опухолей [7, 8]. Однако выбор оптимальных промоторов, а также поиск новых промоторов для генно-инженерных терапевтических векторов остаются нетривиальными задачами. В последнее время большой интерес к промоторам возобновился в связи с необходимостью создания вакцинных векторов для профилактики или терапии инфекционных заболеваний и рака [9, 10].

Ранее мы клонировали ряд промоторов генов, регулирующих пролиферацию клеток, которые проявляют опухолеспецифическую активность [11, 12] (табл. 1). Целью данной работы стал поиск особенностей этих промоторов, а также полученных из них химерных промоторов [13], которые обуславливают их повышенную активность в клетках опухолей. Для этого мы сравнили эти промоторы с набором промоторов генов домашнего хозяйства по составу известных профилей узнавания ФТ, а также провели поиск нуклеотидных мотивов *de novo* в промоторах.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Профили, преобладающие в опухолеспецифических промоторах. Ранее мы показали, что относительно короткие (размером в сотни нуклеотидов) промоторы ряда генов (табл. 1), участвующих в регуляции пролиферации, обладают опухолеспецифической активностью [11, 12]. Известно, что в исследованных промоторах наиболее важные регуляторные элементы сосредоточены на участке приблизительно до –500 п.н. от точки начала транскрипции (TSS) [12, 14, 15]. Поэтому мы выбрали из базы эукариотических промоторов EPDnew семь последовательностей ДНК с координатами [–499; +100] по отношению к точке начала транскрипции, которые соответствовали ранее исследованным опухолеспецифическим промоторам. Поскольку для некоторых из этих генов известно более одного промотора, мы отобрали только те промоторы, которые были исследованы в прямых экспериментах (табл. 1). Для сравнения мы использовали 23 промотора генов домашнего хозяйства такой же длины. С помощью программы CiiDER [16] и базы профилей транскрипционных факторов JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>) [5] мы провели сравнение (enrichment) опухолеспецифических промоторов с промоторами генов домашнего хозяйства по составу профилей узнавания ФТ (рис. S1 в дополнительных материалах). При этом мы сопоставляли число промоторов в обеих группах, содержащих соответствующие профили ФТ; результат оценивали по критерию Манна–Уитни. Полные результаты сравнения промоторов приведены в табл. S1 в дополнительных материалах. В табл. 2 и S2 (см. дополнительные материалы) приведены профили ФТ, которые статистически значимо ($p < 0.05$) преобладают в опухолеспецифических промоторах по сравнению с промоторами генов домашнего хозяйства (далее – условно опухолеспецифические ФТ).

Из семи промоторов более других насыщены профилями ФТ этой группы промоторы *MCM2* (13 профилей), *CKS1B* (10 профилей) и *PLK1* (9 профилей) (табл. S3 в дополнительных материалах). Более чем в половине опухолеспецифических

Таблица 2. Факторы транскрипции, профили которых преобладают в опухолеспецифических промоторах по сравнению с промоторами генов домашнего хозяйства

Фактор транскрипции	Номенклатура JASPAR	Класс	Семейство	Содержатся в опухолеспецифических промоторах
RUNX2*	MA0511.2	Runt domain factors	Runt-related factors	<i>POLD1, BIRC5, PLK1, CDC6, CKS1B</i>
Creb3l2*	MA0608.1	Basic leucine zipper factors (bZIP)	CREB-related factors	<i>MCM2, PLK1, CDC6, TERT</i>
SREBF2*	MA0596.1	Basic helix-loop-helix factors (bHLH)	bHLH-ZIP factors	<i>MCM2, POLD1, BIRC5, PLK1, CKS1B, TERT</i>
ETS2*	MA1484.1	Tryptophan cluster factors	Ets-related factors	<i>MCM2, PLK1, CDC6, CKS1B, TERT</i>
CENPB	MA0637.1	CENP-B		<i>MCM2, CDC6, CKS1B</i>
HEY1	MA0823.1	Basic helix-loop-helix factors (bHLH)	Hairy-related factors	<i>MCM2, PLK1, TERT</i>
HEY2	MA0649.1	Basic helix-loop-helix factors (bHLH)	Hairy-related factors	<i>MCM2, PLK1, TERT</i>
RARA::RXRG	MA1149.1	Nuclear receptors with C4 zinc fingers::Nuclear receptors with C4 zinc fingers	Thyroid hormone receptor-related factors (NR1)::RXR-related receptors (NR2)	<i>MCM2, POLD1, CKS1B</i>
SREBF1 (var. 2)	MA0829.2	Basic helix-loop-helix factors (bHLH)	bHLH-ZIP factors	<i>MCM2, BIRC5, PLK1</i>
ZNF75D*	MA1601.1	C2H2 zinc finger factors	More than 3 adjacent zinc finger factors	<i>MCM2, POLD1, PLK1, CDC6, CKS1B, TERT</i>
Zfx*	MA0146.2	C2H2 zinc finger factors	More than 3 adjacent zinc finger factors	<i>MCM2, POLD1, BIRC5, CDC6, CKS1B, TERT</i>
HOXD11	MA0908.1	Homeo domain factors	HOX-related factors	<i>POLD1, CKS1B</i>
KLF11	MA1512.1	C2H2 zinc finger factors	Three-zinc finger Kruppel-related factors	<i>POLD1, BIRC5</i>
MEF2A	MA0052.4	MADS box factors	Regulators of differentiation	<i>MCM2, BIRC5</i>
RORB	MA1150.1	Nuclear receptors with C4 zinc fingers	Thyroid hormone receptor-related factors (NR1)	<i>MCM2, POLD1</i>
SIX1	MA1118.1	Homeo domain factors	HD-SINE factors	<i>PLK1, CKS1B</i>
Stat6	MA0520.1	STAT domain factors	STAT factors	<i>MCM2, CKS1B</i>

Примечание: представлены факторы с $p < 0.05$ по критерию Манна–Уитни для числа опухолеспецифических промоторов относительно числа промоторов генов домашнего хозяйства, содержащих данный профиль. Полные результаты сравнения приведены в табл. S1 в дополнительных материалах. Профили узнавания ФТ представлены в табл. S2 и S4 в дополнительных материалах.

* Профили, найденные в четырех и более опухолеспецифических промоторах.

ских промоторов найдены профили узнавания факторов SREBF2, ZNF75D, Zfx (каждый в шести промоторах), RUNX2 и ETS2 (каждый в пяти промоторах), Creb3l2 (в четырех промоторах) (табл. 2). Для трех ФТ удалось выявить преиму-

щественные зоны расположения в промоторах (рис. 1). Так, профили SREBF2 в четырех из семи промоторов расположены в области [–458; –384] относительно TSS на некодирующей цепи ДНК. Профили ZNF75D в четырех промоторах занима-

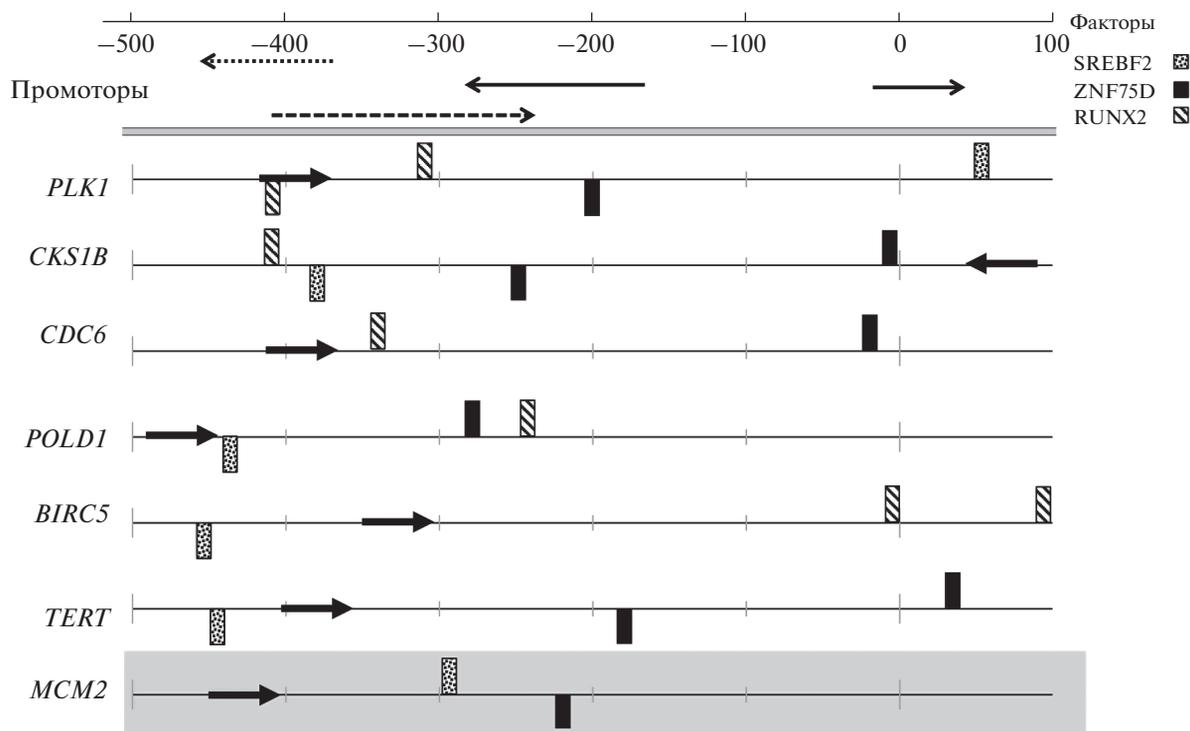


Рис. 1. Расположение профилей узнавания факторов транскрипции SREBF2, ZNF75D и RUNX2 в промоторах. Точки начала транскрипции (0) указаны в соответствии с базой эукариотических промоторов EPDnew. Жирные стрелки – Мотив 1.

ют область $[-253; -184]$ относительно TSS также на некодирующей цепи ДНК и в трех промоторах вблизи TSS $[-24; +30]$ на кодирующей цепи. Профили RUNX2 в четырех промоторах располагаются на кодирующей цепи в области $[-414; -247]$.

Взаимодействие факторов транскрипции с промоторами. С помощью ресурса Pathway Commons [17] мы построили сеть прямых регуляторных взаимодействий выявленных ФТ с продуктами исследованных опухолеспецифических генов (рис. 2). На схеме присутствует антиген пролиферирующих клеток PCNA, поскольку он взаимодействует с продуктами генов, промоторы которых мы исследовали. PCNA участвует в регуляции пролиферации клеток и обладает выраженной опухолеспецифической экспрессией [18]. Однако клонированный нами промотор *PCNA* [19] был активен как в опухолевых, так и в нормальных клетках [20], поэтому изначально он не был включен в дифференциальный анализ промоторов. В настоящей работе промотор *PCNA* (FP026732) рассматривается как неспецифический.

Как видно на рис. 2а, MCM2 и PLK1 занимают центральное положение в данной регуляторной сети, что согласуется с наличием в их промоторах большого количества профилей условно опухолеспецифических ФТ. Факторы Creb3l2, CENPB, SIX1, ZNF75D, Zfx, HOXD11 и KLF11 в регуляторную сеть не вошли, хотя их профили узнавания присутствуют в опухолеспецифических промоторах значительно чаще, чем в промоторах ге-

нов домашнего хозяйства. Прямых данных о том, участвуют ли эти семь ФТ в регуляции исследованных промоторов, нет. Однако их отбор не кажется случайным, поскольку эти ФТ, согласно базе данных GEP1A2, демонстрируют дифференциальную экспрессию либо ассоциированы с определенным прогнозом в ряде опухолей (табл. S2 в дополнительных материалах) и, следовательно, могут играть важные роли в канцерогенезе.

Неспецифические факторы транскрипции. Дополнительно мы определили профили ФТ, которые чаще встречаются в промоторах генов домашнего хозяйства по сравнению с опухолеспецифическими промоторами (табл. S4 и S5 в дополнительных материалах, далее – условно неспецифические факторы). Следует отметить, что эти факторы также проявляют дифференциальную экспрессию и могут служить маркерами прогноза при некоторых опухолях. В то же время шесть из семи ФТ этой группы участвуют в развитии и дифференцировке клеток различного типа (Mafb [21], Arid3a [22], MEIS3 [23], VHLHA15 [24], BSX [25], E2F1 [26]). Фактор ТВР имеет отношение к общим механизмам транскрипции [27]. Согласно Pathway Commons, только ТВР и E2F1 напрямую взаимодействуют с продуктами исследованных опухолеспецифических генов (рис. 2б).

Поиск нуклеотидных мотивов *de novo*. Для улучшения поиска регуляторных последовательностей ДНК, характерных для опухолеспецифиче-

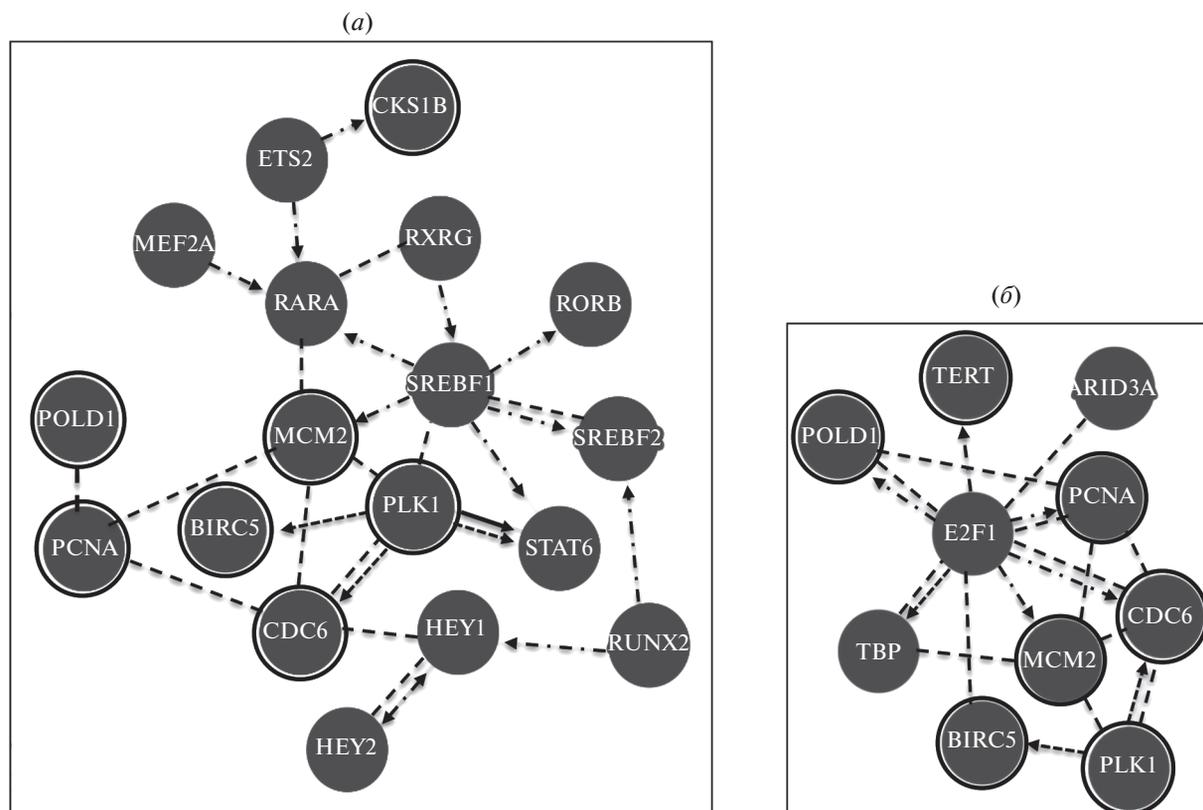


Рис. 2. Прямые регуляторные взаимодействия между продуктами исследованных генов (в черных кружках) и факторами транскрипции (Pathway Commons): (а) – для условно опухолеспецифических факторов транскрипции; (б) – для условно неспецифических факторов транскрипции. Штрихпунктирные стрелки – регуляция экспрессии, штриховые стрелки – модификации, сплошная стрелка – контроль транспорта, штриховые линии без стрелок – связывание в комплекс.

ских промоторов, мы провели поиск мотивов *de novo* с помощью программы MEME Suite [28].

Мы провели дискриминационный поиск нуклеотидных мотивов в семи опухолеспецифических промоторах по отношению к промоторам генов домашнего хозяйства. Таким способом был выявлен Мотив 1 из 44 п.н., который присутствует во всех опухолеспецифических промоторах (рис. S2 в дополнительных материалах). Согласно тесту GOMO, функции Мотива 1 связаны с активностью обонятельных рецепторов, сенсорным восприятием запаха и сигнальным путем рецепторного белка, связанного с G-белком (G-protein coupled receptor protein signaling pathway). В шести из семи исследуемых промоторов Мотив 1 расположен приблизительно в области [–490; –210] по отношению к TSS. В промоторе *CKS1B* Мотив 1 расположен в области [–47; –4] в обратном направлении по отношению к ориентации промотора. Это может быть связано с двунаправленной природой промотора *CKS1B/SHC1*. Можно предположить, что Мотив 1 состоит из трех более коротких субмотивов. Поэтому мы проанализировали эти субмотивы отдельно, используя программу Tomtom из MEME Suite и базу данных ФТ позвоночных (табл. S6 в дополнительных материалах).

Так, субмотив 1a содержит профили узнавания энхансерных факторов миоцитов MEF2, которые могут активировать гены, индуцированные факторами роста и стрессом, и участвуют как в супрессии, так и в прогрессии рака в различных условиях [29]; профиль фактора forkhead E1, ассоциированного с раком щитовидной железы [30], и профиль транскрипционного фактора POU homeobox, который относится к главным (master) регуляторам мелкоклеточного рака легких [31]. Фактор NR2E1 также важен в канцерогенезе, т.к. он, в частности, связан с метастазированием рака молочной железы [32]. PNOX2B был определен как ключевой регулятор дифференцировки и поддержания стволовых свойств нейробластомы [33]. Sp100 представляет собой компонент ядерных теллец промиелоцитарной лейкемии (PML) [34].

Субмотив 1b содержит профиль узнавания ретиноидных X-рецепторов (RXRs) и рецепторов ретиноевой кислоты (RARs) – ядерных рецепторов, которые опосредуют биологические эффекты ретиноидов, связанные с развитием опухолей [35]. Активация гена *DMRT1* обнаружена при гермиогенной неоплазии яичка [36]. Интерферон-регулирующий фактор 3 (IFN3) вовлечен в такие важные процессы, как противораковый иммуни-

тет и устойчивость к некоторым бактериальным и вирусным инфекциям [37].

Субмотив 1с включает последовательность, отвечающую на сAMP (сAMP-response element) и способную связывать ФТ семейства CREB3, которые регулируют пролиферацию и миграцию раковых клеток [38], а также профиль фактора ATF6, участвующего в ответе на разворачивание белков (unfolded protein response), причем сверхэкспрессия ATF6 коррелирует с агрессивностью опухолей [39]. ZNF135 относится к мишеням регуляции дифференциально экспрессирующимися микроРНК в карциноме носоглотки [40].

Конечно, в составе Мотива 1 могут быть выявлены профили узнавания других ФТ, кроме перечисленных, а также неизвестных ФТ, по причине

вырожденности. Тем не менее наши данные позволяют предположить, что Мотив 1 может быть характерен и для других опухолеспецифических промоторов.

Мы попытались найти другие промоторы, содержащие Мотив 1. Для этого мы просканировали 29598 промоторов человека из базы данных промоторов EPDnew (все в координатах [−499; +100] относительно TSS) с помощью программы FIMO из пакета MEME Suite. Были найдены 4733 последовательности в обеих ориентациях с $p < 0.0001$, включая все семь исследуемых промоторов. Десять промоторов, содержащих наиболее близкие к Мотиву 1 последовательности, представлены в табл. 3. По данным The Human Protein Atlas, девять (90%) соответствующих им генов – прогностические

Таблица 3. Десять промоторов, наиболее близких к Мотиву 1, из базы данных EPDnew

№	Индекс EPDnew	Промотор гена	Старт	Стоп	Цепь	Оценка (score)	<i>p</i> -Value	<i>q</i> -Value	Прогностическое значение в опухолях*
1	FP024000	BIRC5_1	−357	−314	+	48.9817	2,22E-19	7,32E-12	Рак почки (−), печени (−), легких (−)
2	FP020135	CDCA4_2	−437	−394	−	48.4404	5,93E-19	9,78E-12	Рак почки (−), печени (−), поджелудочной железы (−), легких (−)
3	FP014177	WDR37_1	−423	−380	+	48.0183	1,24E-18	1,35E-11	Рак поджелудочной железы (+), щитовидной железы (−), головы и шеи (+)
4	FP025645	YIF1B_2	−487	−444	−	47.6055	2,45E-18	1,35E-11	Рак печени (−), поджелудочной железы (+)
5	FP027891	RSPH14_1	−478	−435	−	47.6055	2,45E-18	1,35E-11	Рак почки (+)
6	FP011458	SRRT_2	−403	−360	+	47.6055	2,45E-18	1,35E-11	Рак почки (−), печени (−)
7	FP003432	PLEK_3	−470	−427	+	47.4495	3,21E-18	1,35E-11	Рак почки (−)
8	FP013453	S1PR3_2	−448	−405	−	47.4404	3,28E-18	1,35E-11	Рак почки (−), толстой и прямой кишки (−), молочной железы (+)
9	FP026025	C5AR1_1	−482	−439	−	47.1927	4,74E-18	1,62E-11	Рак почки (−), шейки матки (+), яичка (−), яичника (−)
10	FP009477	MSH5-SAPCD1_5	−300	−257	+	47.156	5,2E-18	1,62E-11	НП

Примечание: старт, стоп – положение Мотива 1 относительно точки начала транскрипции; score – оценка соответствия последовательности промотора заданному мотиву; *p*-value – вероятность того, что случайная последовательность такой же длины соответствует заданному мотиву с таким же или лучшим результатом; *q*-value – коэффициент ложных обнаружений, если встречаемость мотива принимается значимой (FIMO).

* Прогностические маркеры в опухолях согласно базе данных The Human Protein Atlas: (+) – благоприятный прогноз, (−) – неблагоприятный прогноз, НП – нет связи с прогнозом.

маркеры опухолей (в основном, неблагоприятные). Примечательно, что расположение Мотива 1 в приведенных промоторах относительно TSS примерно соответствует таковому в семи исследованных опухолеспецифических промоторах.

Наиболее близкими к Мотиву 1 из семи исследованных промоторов оказались промоторы *MCM2* и *BIRC5*. Отдельный анализ мотивов *de novo* в этих двух промоторах с помощью MEME Suite выявил консенсусный Мотив 2 длиной 184 п.н. в координатах [–579; –396] для *MCM2* и [–496; –303] для *BIRC5* относительно TSS (рис. S3 в дополнительных материалах). Интересно, что область сходства между промоторами *MCM2* и *BIRC5* заметно шире, она охватывает 296 п.н. и имеет одинаковый порядок более коротких мотивов. Мотив, похожий на Мотив 2, может быть выявлен и в других пяти промоторах с помощью FIMO, но с очень низкими оценками (данные не приведены). Поэтому мы считаем такое сходство особенностью промоторов *MCM2* и *BIRC5*.

Анализ химерных промоторов. Мы исследовали химерные промоторы, которые обладали большей активностью в клетках эпидермоидной карциномы A431, чем в нормальных фибробластах (рис. S4 в дополнительных материалах) [13]. С помощью программы CiiiDER мы провели поиск условно опухолеспецифических и неспецифических профилей ФТ в химерных промоторах, а также в неспецифических промоторах *CMV* и *PCNA*. Профили *Steb312*, *ETS2*, *HEY1*, *HEY2* и *SREBF1* (var. 2) обнаружены только в химерных промоторах, обладающих повышенной активностью в клетках A431 (*CH2*, *CH20*, *CH26*, рис. S4 в дополнительных материалах), но отсутствуют в неспецифических промоторах *CH10*, *CMV*, *PCNA* (табл. S7 в дополнительных материалах). Все профили условно неспецифических ФТ, преобладающие в промоторах генов домашнего хозяйства (табл. S5 в дополнительных материалах), встречаются как минимум в одном из трех неспецифических промоторов (табл. S8 в дополнительных материалах).

Хотя это наблюдение вряд ли можно оценить статистически, мы склонны рассматривать его как тенденцию, которая подтверждает наши выводы, но требует дополнительной проверки. Только два химерных промотора, *CH8* и *CH16*, содержат Мотив 1 длиной 44 п.н. в составе промоторного фрагмента *POLD1* (данные не представлены).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Накопленные данные о структуре и функциях промоторов уже открывают большие перспективы для применения промоторов в практической медицине, например, в составе генно-инженер-

ных векторов для генной терапии опухолей [7, 8]. Завершены клинические исследования генно-терапевтических конструкций, содержащих промоторы вирусов и человека (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01455259, NCT00891748, NCT00197522, NCT00051480; см. обзор Ginn et al. [8] и др.). Кроме генной терапии рака, природные промоторы могут использоваться в генно-инженерных векторах для лечения других заболеваний, в промышленности и различных биотехнологических процессах. Большой интерес к промоторам возобновился в последнее время в связи с необходимостью создания вакцинных векторов для профилактики или терапии инфекционных заболеваний и рака [9, 10]. Разрабатываются подходы с конструированием гибридных промоторов [41, 42] и химерных промоторов [13]. Поэтому исследование первичной структуры промоторов, в частности опухолеспецифических промоторов, остается актуальным.

В данной работе мы исследовали семь опухолеспецифических промоторов (табл. 1) по содержанию профилей узнавания известных ФТ. Несмотря на то что в регуляции транскрипции участвуют как прилежащие к TSS последовательности ДНК, так и отдаленные, было показано, что определенные регуляторные функции сохраняются в относительно коротких проксимальных промоторах, представляющих собой минимальные (core) промоторы с прилегающими *cis*-регуляторными элементами, общей длиной в несколько сотен нуклеотидов [43]. Это справедливо и для исследованных промоторов, в которых многие важные регуляторные элементы сосредоточены на участке приблизительно до –500 п.н. от TSS [12, 14, 15]. Такой размер промоторов удобен для генно-инженерных манипуляций с ними.

В ходе сравнения промоторов мы выявили 17 профилей узнавания ФТ, более частых в опухолеспецифических промоторах, чем в промоторах генов домашнего хозяйства (условно опухолеспецифические ФТ, табл. 2). В табл. S2 (см. дополнительные материалы) приведены профили узнавания данных факторов в соответствии с базой данных JASPAR [5]. Профили факторов *SREBF2*, *ZNF75D*, *Zfx*, *RUNX2*, *ETS2* и *Steb312* встречались более чем в половине опухолеспецифических промоторов. Остальные из 17 ФТ встречались в некоторых опухолеспецифических промоторах, но ни в одном из 23 промоторов группы сравнения. Нам также удалось определить преимущественные зоны расположения профилей узнавания факторов *SREBF2*, *ZNF75D* и *RUNX2* в опухолеспецифических промоторах (рис. 1). Следует отметить, что промоторы *CKS1B* и *PLK1*, содержащие, соответственно, 10 и 9 профилей ФТ этой группы (табл. S9 в дополнительных материалах), ранее показали наибольшую опухоле-

вую специфичность по сравнению с другими промоторами [12].

Ряд опухолеспецифических промоторов содержит профили узнавания ФТ, об участии которых в регуляции данных промоторов известно недостаточно. К таким факторам относятся Creb312, CENPB, SIX1, ZNF75D, HOXD11, Zfx и KLF11.

Возможно, наши результаты послужат доводом в пользу изучения роли данных ФТ в регуляции соответствующих генов.

Также мы выявили семь профилей ФТ, более представленных в промоторах генов домашнего хозяйства, чем в исследуемых промоторах (табл. S4 и S5 в дополнительных материалах). Шесть из семи ФТ этой группы участвуют в развита и дифференцировке клеток различного типа (см. выше). Дифференцировку клеток часто рассматривают как процесс, обратный опухолевой трансформации, а также предлагают использовать для терапии опухолей [44]. Наши наблюдения указывают на неслучайность отбора ФТ по признаку неспецифичности в данном случае. В то же время дифференциальная экспрессия этих ФТ в некоторых опухолях и их связь с прогнозом (табл. S4 в дополнительных материалах) свидетельствуют о необходимости более глубокого изучения этого вопроса.

Очевидно, что связывание транскрипционно-го фактора с ДНК зависит не только от последовательности нуклеотидов, но и от многих других параметров – ориентации профиля, соседних последовательностей, взаимодействия данного ФТ с другими регуляторными молекулами и последовательностями и т.д. [43]. Кроме того, условно опухолеспецифические ФТ могут иметь отношение не столько к опухолевой трансформации клеток, сколько к пролиферативным функциям генов, и это различие следует изучить в каждом конкретном случае. Тем не менее полученные данные дают возможность более прицельно исследовать регуляцию промоторов в прямых экспериментах.

С помощью дискриминационного поиска мотивов *de novo* мы обнаружили последовательность из 44 п.н. (Мотив 1), которая присутствует во всех семи опухолеспецифических промоторах, но не характерна для промоторов генов домашнего хозяйства. В базе данных EPDnew мы нашли группу промоторов с таким мотивом, причем соответствующие им гены – это прогностические маркеры опухолей. Мы полагаем, что по крайней мере некоторые из этих промоторов могут обладать опухолеспецифической активностью.

Мы показали, что два промотора – *BIRC5* и *MCM2* – содержат очень близкий мотив из 184 п.н. Более того, область сходства между этими двумя промоторами распространяется на 296 п.н. Мы предполагаем, что такое сходство – скорее

особое свойство этих двух промоторов, связанное с их регуляцией, чем типичная общая черта опухолеспецифических промоторов. Хотя это наблюдение представляет интерес, оно выходит за рамки нашего исследования.

Отчасти проверкой наших выводов может служить исследование профилей ФТ в химерных промоторах. Пять из 17 профилей условно опухолеспецифических ФТ, а именно профили Creb312, ETS2, HEY1, HEY2 и SREBF1 (var. 2), прошли селекцию на клетках A431 и были отобраны в химерных промоторах по признаку опухолевой специфичности [13]. Только два химерных промотора, CN8 и CN16, содержат Мотив 1 длиной 44 п.н., который был найден в семи нативных опухолеспецифических промоторах. В совокупности с другими данными это может означать, что наличие Мотива 1 в промоторе – достаточное, но не необходимое условие для опухолевой специфичности. Очевидно, эти вопросы требуют более глубокого изучения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Последовательности промоторов человека получены из базы данных EPDnew (Eucaryotic Promoter Database, https://epd.epfl.ch/EPDnew_database.php) [45] в координатах [–499; +100] по отношению к точке начала транскрипции (TSS) (табл. 1). Для поиска и сравнения профилей ФТ в промоторах, поиска мотивов *de novo* использовали программы CiiiDER [16], MEME Suite [28] (<https://meme-suite.org/meme/>) с параметрами по умолчанию и базы профилей узнавания транскрипционных факторов JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>) [5] и Jolma, 2013 [46]. Различия групп промоторов по частоте профилей ФТ оценивали по статистическому критерию Манна–Уитни, при этом в первую очередь учитывали показатели “significance score” и “gene *p*-value” (CiiiDER). Экспрессия ФТ в опухолях приведена по базе данных GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>). Прогностическое значение ФТ в опухолях определяли по базе данных The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>) [47]. Для построения сетей регуляторных взаимодействий использовали ресурс Pathway Commons (<http://www.pathwaycommons.org/>) [17].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что исследованные опухолеспецифические промоторы отличаются от неспецифических промоторов генов домашнего хозяйства присутствием профилей узнавания 17 факторов транскрипции, а также мотива длиной 44 п.н., которые могут быть перспективными объектами исследования опухолеспецифической регуляции экспрессии генов. Присутствие данных последовательностей в каком-либо неизвестном промо-

торе может указывать на его опухолевую специфичность. Мы полагаем, что наши результаты могут способствовать выбору перспективных природных промоторов для использования в генно-инженерных противоопухолевых конструкциях, таких как векторы с генами-убийцами (killer genes) или векторные вакцины. Из семи исследованных промоторов более других насыщены профилями условно опухолеспецифических ФТ промоторы *MCM2*, *CKS1B* и *PLK1*, что согласуется с данными о значительной опухолевой специфичности этих промоторов [12]. Практическое значение могут иметь и некоторые химерные промоторы, полученные нами ранее [13].

Необходимо подчеркнуть, что выводы данной работы сделаны на основании теоретического анализа нуклеотидной последовательности промоторов. Мы рассматривали профили узнавания ФТ только как нуклеотидные мотивы с определенной вариабельностью. Поэтому все заключения относятся только к присутствию таких последовательностей в промоторах. Действительная роль факторов транскрипции в опухолеспецифической регуляции промоторов должна быть исследована в прямых экспериментах. Мы надеемся, что наша работа поможет лучше понять механизмы опухолеспецифической транскрипции генов и откроет новые возможности для создания искусственных промоторов и генно-инженерных векторов, применяемых в генной терапии опухолей.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность Dr. Jamie Gearing (Hudson Institute of Medical Research, Австралия) за ценные консультации по программе CiiiDER, академику Е.Д. Свердлову за существенные замечания по работе, И.П. Чернову (ФГБУН “Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН) за поддержку при подготовке данной статьи.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-15-00317).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Zabidi M.A., Stark A.* // Trends Genet. 2016. V. 32. P. 801–814.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.10.003>
2. *Corso-Diaz X., Jaeger C., Chaitankar V., Swaroop A.* // Prog. Retin. Eye Res. 2018. V. 65. P. 1–27.
<https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.03.002>
3. *Gurumurthy A., Shen Y., Gunn E.M., Bungert J.* // Bio-Essays. 2019. V. 41. P. e1800164.
<https://doi.org/10.1002/bies.201800164>
4. *Lambert S.A., Jolma A., Campitelli L.F., Das P.K., Yin Y., Albu M., Chen X., Taipale J., Hughes T.R., Weirauch M.T.* // Cell. 2018. V. 172. P. 650–665.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.029>
5. *Castro-Mondragon J.A., Riudavets-Puig R., Raulusevičiute I., Berhanu Lemma R., Turchi L., Blanc-Mathieu R., Lucas J., Boddie P., Khan A., Manosalva Pérez N., Fornes O., Leung T.Y., Aguirre A., Hammal F., Schmelter D., Baranasic D., Ballester B., Sandelin A., Lenhard B., Vandepoele K., Wasserman W.W., Parcy F., Mathelier A.* // Nucleic Acids Res. 2022. V. 50. P. D165–D173.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkab1113>
6. *Moll R.* // Der Pathologe. 2018. V. 39. P. 285–290.
<https://doi.org/10.1007/s00292-018-0518-7>
7. *Alekseenko I.V., Snezhkov E.V., Chernov I.P., Pleshkan V.V., Potapov V.K., Sass A.V., Monastyrskaya G.S., Kopantzev E.P., Vinogradova T.V., Khrantsov Y.V., Ulasov A.V., Rosenkranz A.A., Sobolev A.S., Bezborodova O.A., Plyutinskaya A.D., Nemtsova E.R., Yakubovskaya R.I., Sverdlov E.D.* // J. Transl. Med. 2015. V. 13. P. 78.
<https://doi.org/10.1186/s12967-015-0433-0>
8. *Ginn S.L., Amaya A.K., Alexander I.E., Edelstein M., Abedi M.R.* // J. Gene Med. 2018. V. 20. P. e3015.
<https://doi.org/10.1002/jgm.3015>
9. *Watanabe M., Nishikawaji Y., Kawakami H., Kosai K.I.* // Viruses. 2021. V. 13. P. 2502.
<https://doi.org/10.3390/v13122502>
10. *Morse M.A., Gwin W.R., 3rd, Mitchell D.A.* // Target Oncol. 2021. V. 16. P. 121–152.
<https://doi.org/10.1007/s11523-020-00788-w>
11. *Alekseenko I.V., Pleshkan V.V., Kopantzev E.P., Stukacheva E.A., Chernov I.P., Vinogradova T.V., Sverdlov E.D.* // PLoS One. 2012. V. 7. P. e46474.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046474>
12. *Kashkin K., Chernov I., Stukacheva E., Monastyrskaya G., Uspenskaya N., Kopantzev E., Sverdlov E.* // J. Cell. Biochem. 2015. V. 116. P. 299–309.
<https://doi.org/10.1002/jcb.24968>
13. *Kashkin K.N., Chernov I.P., Didych D.A., Sverdlov E.D.* // BioTechniques. 2017. V. 63. P. 107–116.
<https://doi.org/10.2144/000114586>
14. *Takakura M., Kyo S., Kanaya T., Hirano H., Takeda J., Yutsudo M., Inoue M.* // Cancer Res. 1999. V. 59. P. 551–557.
15. *Xu R., Zhang P., Huang J., Ge S., Lu J., Qian G.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007. V. 356. P. 286–292.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.02.140>
16. *Gearing L.J., Cumming H.E., Chapman R., Finkel A.M., Woodhouse I.B., Luu K., Gould J.A., Forster S.C., Hert-*

- zog P.J. // PLoS One. 2019. V. 14. P. e0215495. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215495>
17. Rodchenkov I., Babur O., Luna A., Aksoy B.A., Wong J.V., Fong D., Franz M., Siper M.C., Cheung M., Wrana M., Mistry H., Mosier L., Dlin J., Wen Q., O'Callaghan C., Li W., Elder G., Smith P. T., Dallago C., Cerami E., Gross B., Dogrusoz U., Demir E., Bader G.D., Sander C. // *Nucleic Acids Res.* 2020. V. 48. P. D489–D497. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz946>
 18. Tang Z., Kang B., Li C., Chen T., Zhang Z. // *Nucleic Acids Res.* 2019. V. 47. P. W556–W560. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz430>
 19. Свердлов Е.Д., Алексеенко И.В., Безбородова О.А., Виноградова Т.В., Кашкин К.Н., Копанцев Е.П., Монастырская Г.С., Немцова Е.Р., Успенская Н.Я., Чернов И.П., Якубовская Р.И. // Патент RU 2551784 С1, 2015.
 20. Кондратьева Л.Г., Кашкин К.Н., Чернов И.П., Стукачева Е.А., Дидыч Д.А., Копанцев Е.П., Свердлов Е.Д. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2017. Т. 3. С. 89–92. [Konratyeva L.G., Kashkin K.N., Chernov I.P., Stukacheva E.A., Dydich D.A., Kopantzev E.P., Sverdlow E.D. // *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2017. V. 3. P. 137–140]. <https://doi.org/10.3103/S089141681703003X>
 21. Miyai M., Hamada M., Moriguchi T., Hiruma J., Kamitani-Kawamoto A., Watanabe H., Hara-Chikuma M., Takahashi K., Takahashi S., Kataoka K. // *J. Invest. Dermatol.* 2016. V. 136. P. 1848–1857. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.05.088>
 22. Popowski M., Lee B.K., Rhee C., Iyer V.R., Tucker H.O. // *J. Stem Cell Ther. Transplant.* 2017. V. 1. P. 52–62. <https://doi.org/10.29328/journal.jsctt.1001005>
 23. Elkouby Y.M., Polevoy H., Gutkovich Y.E., Michaelov A., Frank D. // *Development.* 2012. V. 139. P. 1487–1497. <https://doi.org/10.1242/dev.072934>
 24. Dekaney C.M., King S., Sheahan B., Cortes J.E. // *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2019. V. 8. P. 549–560. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.07.003>
 25. Schredelseker T., Driever W. // *Development.* 2018. V. 145. P. dev163477. <https://doi.org/10.1242/dev.163477>
 26. Xu X., Zhang T., Zhang M., Li L., Deng G., Lu Z., Zhang Z., Du Y., Feng Y., Feng X., Peng X., Chen F. // *Cell. Signal.* 2022. V. 93. P. 110280. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2022.110280>
 27. Kramm K., Engel C., Grohmann D. // *Biochem. Soc. Trans.* 2019. V. 47. P. 411–423. <https://doi.org/10.1042/bst20180623>
 28. Bailey T.L., Johnson J., Grant C.E., Noble W.S. // *Nucleic Acids Res.* 2015. V. 43. P. W39–W49. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv416>
 29. Di Giorgio E., Hancock W.W., Brancolini C. // *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* 2018. V. 1870. P. 261–273. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.05.007>
 30. Credendino S.C., Moccia C., Amendola E., D'Avino G., Di Guida L., Clery E., Greco A., Bellevicine C., Brunetti A., De Felice M., De Vita G. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 22. P. 25. <https://doi.org/10.3390/ijms22010025>
 31. Huang Y.H., Klingbeil O., He X.Y., Wu X.S., Arun G., Lu B., Somerville T.D.D., Milazzo J.P., Wilkinson J.E., Demerdash O.E., Spector D.L., Egeblad M., Shi J., Vakkoc C.R. // *Genes Dev.* 2018. V. 32. P. 915–928. <https://doi.org/10.1101/gad.314815.118>
 32. Park S.B., Hwang K.T., Chung C.K., Roy D., Yoo C. // *Clin. Exp. Metastasis.* 2020. V. 37. P. 657–674. <https://doi.org/10.1007/s10585-020-10060-0>
 33. Yang L., Ke X.X., Xuan F., Tan J., Hou J., Wang M., Cui H., Zhang Y. // *Cancer Biother. Radiopharm.* 2016. V. 31. P. 44–51. <https://doi.org/10.1089/cbr.2015.1952>
 34. Guion L.G., Sapp M. // *Front Cell. Infect. Microbiol.* 2020. V. 10. P. 35. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00035>
 35. le Maire A., Alvarez S., Shankaranarayanan P., Lera A.R., Bourguet W., Gronemeyer H. // *Curr. Top. Med. Chem.* 2012. V. 12. P. 505–527. <https://doi.org/10.2174/156802612799436687>
 36. Al-Hussain T., Bakshi N., Akhtar M. // *Adv. Anat. Pathol.* 2015. V. 22. P. 202–212. <https://doi.org/10.1097/pap.0000000000000066>
 37. Petro T.M. // *J. Immunol.* 2020. V. 205. P. 1981–1989. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000462>
 38. Kim H.C., Choi K.C., Choi H.K., Kang H.B., Kim M.J., Lee Y.H., Lee O.H., Lee J., Kim Y.J., Jun W., Jeong J.W., Yoon H.G. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2010. V. 67. P. 3499–3510. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0388-5>
 39. Urra H., Dufey E., Avril T., Chevet E., Hetz C. // *Trends Cancer.* 2016. V. 2. P. 252–262. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.03.007>
 40. Xi T., Zhang G. // *Pathol. Res. Pract.* 2017. V. 213. P. 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2016.12.007>
 41. Алексеенко И.В., Плешкан В.В., Сасс А.В., Филюкова О.Б., Снежков Е.В., Свердлов Е.Д. // Доклады Российской академии наук (Биохимия, Биофизика). 2018. Т. 480. С. 609–612. [Aleksenko I.V., Pleshkan V.V., Sass A.V., Filyukova O.B., Snezhkov E.V., Sverdlow E.D. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2018. V. 480. P. 158–161.] <https://doi.org/10.1134/s1607672918030092>
 42. Farokhimanesh S., Rahbarizadeh F., Rasaee M.J., Kamali A., Mashkani B. // *Biotechnol. Prog.* 2010. V. 26. P. 505–511.
 43. Haberle V., Stark A. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018. V. 19. P. 621–637. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0028-8>
 44. Prasad S., Ramachandran S., Gupta N., Kaushik I., Srivastava S.K. // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2020. V. 1866. P. 165424. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.02.019>
 45. Dreos R., Ambrosini G., Groux R., Cavin Perier R., Bucher P. // *Nucleic Acids Res.* 2017. V. 45. P. D51–D55. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1069>
 46. Jolma A., Yan J., Whittington T., Toivonen J., Nitta K.R., Rastas P., Morgunova E., Enge M., Taipale M., Wei G., Palin K., Vaquerizas J.M., Vincentelli R., Luscombe N.M., Hughes T.R., Lemaire P., Ukkonen E., Kivioja T., Taipale J. // *Cell.* 2013. V. 152. P. 327–339. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.009>

47. Sjöstedt E., Zhong W., Fagerberg L., Karlsson M., Mitsios N., Adori C., Oksvold P., Edfors F., Limiszewska A., Hikmet F., Huang J., Du Y., Lin L., Dong Z., Yang L., Liu X., Jiang H., Xu X., Wang J., Yang H., Bolund L., Mardinoglu A., Zhang C., von Feilitzen K., Lindskog C., Pontén F., Luo Y., Hökfelt T., Uhlén M., Mulder J. // *Science*. 2020. V. 367. P. eaay5947. <https://doi.org/10.1126/science.aay5947>

Looking for Tumor Specific Promoters *In Silico*

K. N. Kashkin*.* #

#Phone: +7 (495) 330-63-29; e-mail: kachkine@yandex.ru

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

Previously we demonstrated tumor specific activity of several human native and chimeric promoters. Here we analyzed DNA sequences of experimentally tested tumor specific promoters for the presence of recognition matrices of transcription factors and for de novo motif discovery. CiiiDER and MEME Suite software tools were used for this purpose. A number of transcription factor matrices has been identified which are present more often in tumor specific promoters than in promoters of housekeeping genes. New promoter-TF regulatory bounds were predicted by pathway analysis. A motif of 44 bp that is characteristic to tumor specific promoters but not to housekeeping gene promoters was discovered. Search through 29,598 human promoters from EPDnew promoter database revealed a series of promoters with this motif whose genes are associated with the unfavorable prognoses in cancer. We suppose that some of these promoters may possess tumor specific activity. Also, close similarity by nucleotide motifs between promoters of BIRC5 and MCM2 genes was found. The results of the study may help in understanding the peculiarities of gene transcription in tumors and in the search for native tumor specific promoters or in the creation of artificial ones for cancer gene therapy as well as in the development of anticancer vaccines.

Keywords: transcription, regulation of transcription, cancer, tumor-specific, promoter, transcription factor



УДК 577.151.45;577.322.9

РАСЧЕТЫ СВОБОДНОЙ ЭНЕРГИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ШИРОКОСПЕЦИФИЧНОЙ ПИРИМИДИННУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗЫ С ПОТЕНЦИАЛЬНЫМИ ИНГИБИТОРАМИ

© 2022 г. П. А. Эйстрих-Геллер*, #, С. В. Рубинский*, В. Р. Самыгина*, **, А. А. Лашков*

*Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Россия, 119333 Москва, Ленинский проспект, 59

**Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Россия, 123182 Москва, ул. Академика Курчатова, 1

Поступила в редакцию 26.01.2022 г.

После доработки 09.03.2022 г.

Принята к публикации 17.06.2022 г.

Цель работы – поиск специфичного ингибитора пиримидиннуклеозидфосфорилазы. Использовали методы молекулярного моделирования комплексов белок–лиганд, такие как молекулярный докинг и молекулярная динамика, позволяющие найти энергию связывания белка с лигандом (ΔG_{bind}). В качестве возможных ингибиторов взяты следующие соединения: 2',3'-дидегидро-3'-дезокситимидин (d4T), 1-(2-дезоксидеокси-2-фтор- β -D-арабинофуранозил)-5-иодурацил (фиауридин, FIAU), 1-(2-дезоксидеокси-2-фтор- β -D-арабинофуранозил)-5-урацил (FAU) и 2-пиримидин-2-ил-1*H*-имидазол-4-карбоновая кислота (PIA). Предварительную оценку энергии связывания проводили методом линейной интерполяции свободной энергии (LIE), уточнение расчетов – методом возмущения свободной энергии (FER) в пакете программ GROMACS. Полученные в ходе расчетов данные указывают на то, что соединения PIA и d4T связываются с активным центром белка BsPyNP из *Bacillus subtilis* с наибольшей аффинностью среди других предполагаемых ингибиторов. PIA к тому же хуже связывается с тимидинфосфорилазой человека, что минимизирует возможные побочные эффекты применения этого соединения в терапевтических целях.

Ключевые слова: молекулярный докинг, пиримидиннуклеозидфосфорилаза, метод возмущения свободной энергии

DOI: 10.31857/S0132342322060100

ВВЕДЕНИЕ

Нуклеозидфосфорилазы (в частности, тимидинспецифичная нуклеозидфосфорилаза КФ 2.4.2.4.) – белки-ферменты, играющие важную роль в синтезе нуклеозидов и азотистых оснований [1]. Нуклеозидфосфорилазы катализируют фосфоролитическое расщепление пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов. Некоторые белки этого класса обнаружены во многих раковых клетках, что позволяет использовать их в качестве ак-

тиваторов противоопухолевых препаратов [2, 3]. У некоторых классов прокариот присутствует широкоспецифичная пиримидиннуклеозидфосфорилаза (PyNP), способствующая расщеплению как тимидина, так и уридина примерно с равной каталитической активностью. При этом тимидинфосфорилаза и широкоспецифичная пиримидиннуклеозидфосфорилаза – единственные представители NP-II-семейства нуклеозидфосфорилаз. Показано, что инфицирование клеток

Сокращения: AD – Autodock; BsPyNP – пиримидиннуклеозидфосфорилаза из *Bacillus subtilis*; d4T – 2',3'-дидегидро-3'-дезокситимидин; FAU – 1-(2-дезоксидеокси-2-фтор- β -D-арабинофуранозил)-5-урацил; FER – возмущение свободной энергии; FIAU – фиауридин (1-(2-дезоксидеокси-2-фтор- β -D-арабинофуранозил)-5-иодурацил); ΔG_{bind} – энергия связывания белка с лигандом; ΔG^{coil} – свободная энергия coupling кулоновского взаимодействия; ΔG^{vdw} – свободная энергия coupling ван-дер-ваальсового взаимодействия, определяемого как потенциал Ленарда–Джонса; $\Delta \Delta G_{\text{DSF}}$ – поправка на использование дискретной модели растворителя, учитывающая конечные размеры ячейки; $\Delta \Delta G_{\text{NET}}$ – поправка на влияние периодичности на взаимодействие бесконечного числа копий точечного заряда; ΔG^{rest} – свободная энергия рестрейной; $\Delta \Delta G_{\text{RIP}}$ – поправка на остаточные интегрированные потенциальные эффекты; $\Delta \Delta G_{\text{USV}}$ – поправка на недостаточную сольватацию, вызванную периодичностью; hTP – тимидиннуклеозидфосфорилаза человека; LIE – линейная интерполяция свободной энергии; MhPyNP – пиримидиннуклеозидфосфорилаза из *Mycoplasma hyorhinis*; PIA – 2-пиримидин-2-ил-1*H*-имидазол-4-карбоновая кислота; PL – PLANTS; PME – метод частица–сетка; PyNP – пиримидиннуклеозидфосфорилаза; RMSD – среднее квадратическое отклонение; TI – термодинамическое интегрирование; МД – молекулярная динамика.

Автор для связи: (тел.: +7 (916) 875-27-80; эл. адрес: eistrikh.geller@crys.ras.ru).

некоторых тканей бактериями *Mycoplasma hyorhinis* препятствует нормальной фармакинетике фторпиримидинов. Это объясняется активностью фермента PyNP в этих бактериях в отношении 5-фтор-2'-дезоксисуридина, 5-трифтортимидина и 5-фтор-5'-дезоксисуридина [1, 2]. Препятствование ферментативной функции PyNP из *M. hyorhinis* [4] при фторпиримидиновой терапии обуславливает необходимость разработки конкурентных ингибиторов, специфичных к BsPyNP (пиримидиннуклеозидфосфорилаза из *Bacillus subtilis*) и неактивных в отношении hTP (тимидиннуклеозидфосфорилаза человека) [3].

Цель данного исследования – поиск предполагаемых ингибиторов тимидинфосфорилазы и широкоспецифичной пиримидиннуклеозидфосфорилазы и их сравнение по энергии связывания с белком-мишенью.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярный докинг и молекулярная динамика.

В качестве стартовой трехмерной модели белка взята определенная нами ранее методом рентгеноструктурного анализа структура пиримидиннуклеозидфосфорилазы из *Bacillus subtilis* (BsPyNP) [5, 6], гомологичной пиримидиннуклеозидфосфорилазе из *M. hyorhinis*. Для поиска соединений, аффинных активному центру BsPyNP, среди суще-

ствующих биологически активных соединений, удовлетворяющих правилам “пяти” Липински [7], были отобраны четыре соединения. Первые два взяты из работы [8]: 2',3'-дидегидро-3'-дезокситимидин (d4T) и 1-(2-дезоксидеокси-2-фтор-β-D-арабинофуранозил)-5-иодурацил (фиауридин, FIAU) (рис. 1). Поскольку в молекуле FIAU заместителем в пятом положении пиримидинового цикла является атом иода, который может создать дополнительные стерические ограничения при связывании вероятного ингибитора с активным центром фермента, было решено взять в качестве третьего лиганда то же соединение, но без заместителя – атома иода – 1-(2-дезоксидеокси-2-фтор-β-D-арабинофуранозил)-5-урацил (FAU). Моделирование связывания двух схожих молекул, но с разными по размеру заместителями по пиримидиновому кольцу, позволяет выяснить степень влияния атома иода на связывание лиганда с белком.

В работе [9] описано соединение 2-пиримидин-2-ил-1*H*-имидазол-4-карбоновая кислота (PIA) (рис. 1) – предполагаемый специфичный ингибитор BsPyNP, для которого в этой работе был проведен первый этап молекулярного докинга. Однако это соединение при разных значениях pH раствора присутствует в разных формах с разным общим электрическим зарядом: в растворах с нейтральной реакцией среды – в виде в целом не заряженного цвиттер-иона, а при кислой – в

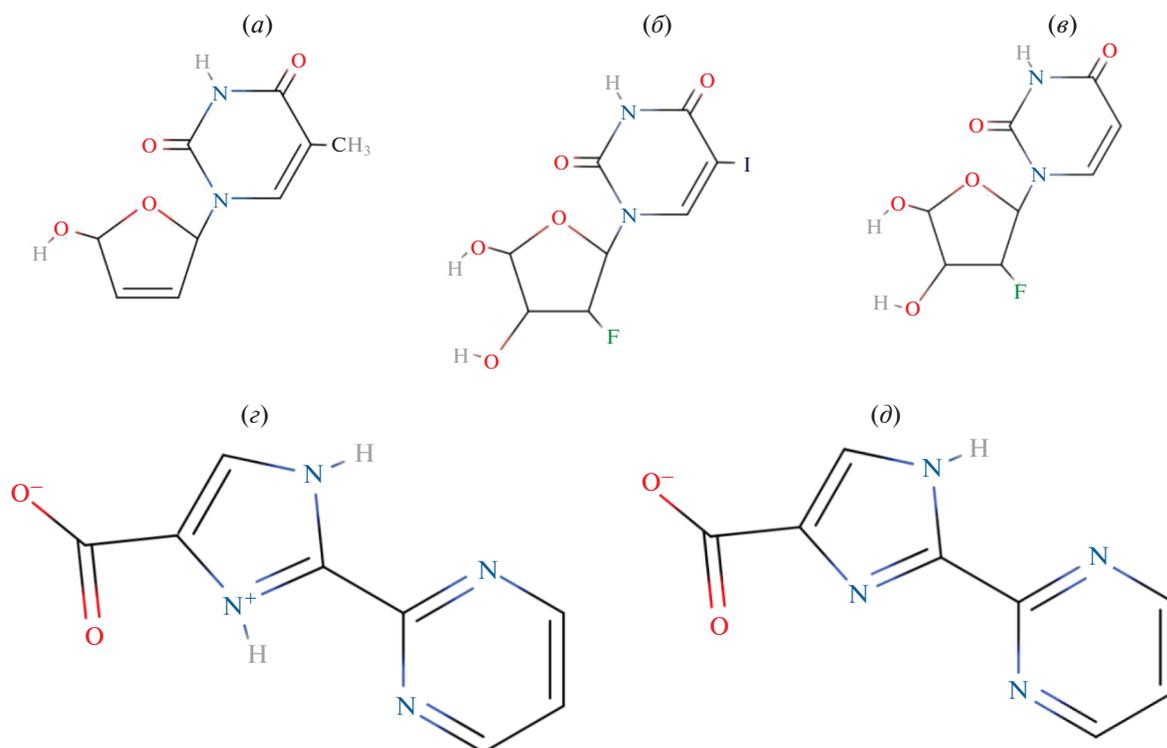


Рис. 1. Структурные формулы предполагаемых лигандов (ингибиторов) пиримидиннуклеозидфосфорилазы из *Bacillus subtilis* (BsPyNP): d4T (а), FIAU (б), FAU (в), PIA (з) при pH < 6.5, PIA (д) при pH > 6.5.

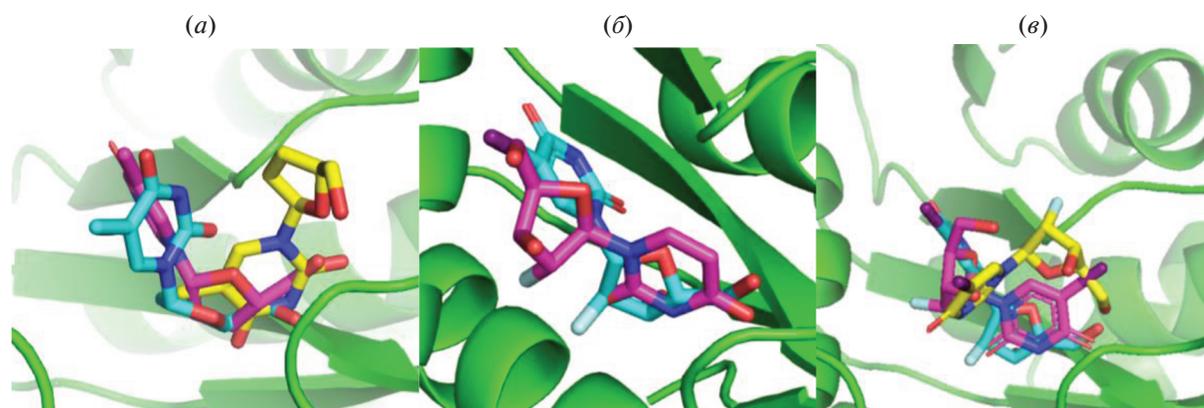


Рис. 2. Центровая конформация для каждого кластера отобранных конформаций лигандов для d4Т (а), FIAU (б) и FAU (в).

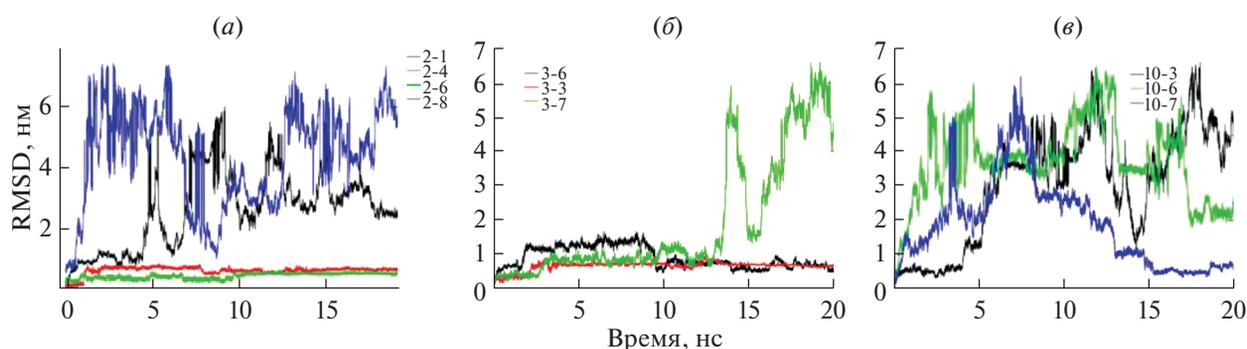


Рис. 3. Графики зависимости RMSD-координат неводородных атомов лигандов от времени МД-симуляции для d4Т (а), FIAU (б) и FAU (в) для разных стартовых конформаций лигандов. Выравнивание структур выполнено по атомам главной цепи фермента *BsPuNP*.

виде аниона. Различие общего заряда и состояния протонирования лиганда может кардинальным образом повлиять на его связывание с ферментом.

Результатом первого этапа стал набор конформаций для каждого лиганда. Разница в решениях докинга, полученных с помощью разных программ (Autodock и PLANTS), объясняется разницей в методике определения подходящих конформаций. Близкие друг к другу конформации объединены в кластеры по сходству расположения атомов и углов между связями атомов в конформере. Для d4Т найден 1 кластер конформаций, для FIAU – 3 кластера (2 (Autodock) + 1 (PLANTS)), для FAU – два кластера (1 + 1) (рис. 2). Для каждой из конформаций был проведен анализ энергии взаимодействия и устойчивости комплекса (рис. 3) в зависимости от времени молекулярно-динамической симуляции частиц системы и получены, кроме стартовой, конформации с минимальной энергией взаимодействия по методу линейной интерполяции свободной энергии (LIE). Проведено сравнение конформаций лиган-

дов с конформациями похожих лигандов в структурах экспериментально определенных комплексов тимидинфосфорилаз. По трехмерной структуре тимидин- и пиримидинфосфорилазы схожи, однако для последней не изучены структуры комплексов белок–лиганд.

Таким образом, в работе рассмотрены две конформации: start – начальный вариант после молекулярного докинга, min – варианты с наименьшей энергией связывания белок–лиганд, вычисленной по методу LIE. Для лигандов d4Т, FAU и FIAU была подобрана одна конформация со стартовым и одна – с минимальным значением энергии связывания по методу LIE (табл. 1).

Для конформаций PIA, полученных в программах Autodock и PLANTS при pH < 6.5, были найдены два минимума энергии с близкими значениями энергии связывания (табл. 1), но сильно отличающимися положениями атомов, поэтому дальнейшие расчеты проводили для двух конформаций: min₁ и min₂. Аналогичная ситуация характерна для конформаций PIA, полученных с помо-

Таблица 1. Результаты расчета относительной аффинности связывания (кДж/моль) лигандов *BsPyNP* методом LIE

Составляющая свободной энергии Гиббса	FAU (AD)	d4T (AD)	d4T (PL)	FIAU (AD)	PIA (AD) (pH < 6.5)	PIA (PL) (pH < 6.5)	PIA (AD) (pH > 7.0)	PIA (PL) (pH > 7.0)
$\langle \Delta G_{\text{bind}} \rangle$	-3.2	-5.8	0.1	7.2	13.2	-15.3	-46.5	-56.9
$\sigma(\Delta G_{\text{bind}})$	15.2	18.4	11.1	9.6	15.5	16.7	22.4	21.9
$\Delta G_{\text{bind_start}}$	18.9	22.1	-4.8	10.9	-2.6	-10.0	-50.5	-55.9
$\Delta G_{\text{bind_min1}}$	-95.7	-55.7	-50.5	-38.4	-79.1	-87.0	-136.1	-140.0
$\Delta G_{\text{bind_min2}}$	-	-	-	-	-73.6	-80.6	-	-138.1

Примечание: выбраны лучшие решения для программы докинга: AD – Autodock, PL – PLANTS.

Таблица 2. Свободная энергия (и ее составляющие) связывания *BsPyNP* с производными пириимидиновых нуклеозидов (кДж/моль)

Составляющая свободной энергии Гиббса	d4T _{min}	d4T _{start}	d4T _{min_PL}	FIAU	FAU
$\Delta G_{\text{solv_coul}}$	-85.8 ± 0.5		-79.5 ± 0.5	-84.1 ± 0.5	-86.3 ± 0.5
$\Delta G_{\text{solv_vdw}}$	-0.6 ± 0.3		-0.2 ± 0.4	-7.1 ± 0.4	-4.8 ± 0.4
$\Delta G_{\text{solv}(wv + coul)}$	-86.4 ± 0.6		-79.7 ± 0.6	-91.2 ± 0.6	-91.1 ± 0.6
$\Delta G_{\text{solv_rest}}$	-33.7	-35.7	-38.0	-34.3	-33.7
$\Delta G_{\text{prot_restr}}$	-9.6 ± 0.2	-18.4 ± 0.2	-26.7 ± 0.4	-13.9 ± 0.2	-24.0 ± 0.5
$\Delta G_{\text{prot_coul}}$	-86.1 ± 0.7	-72.0 ± 0.4	-103.5 ± 1.3	-77.0 ± 0.6	-66.2 ± 0.5
$\Delta G_{\text{prot_vdw}}$	-34.7 ± 0.6	-10.8 ± 0.9	-12.7 ± 0.8	-18.6 ± 0.8	-20.8 ± 0.8
ΔG_{prot}	-130.3 ± 1.0	-101.2 ± 1.0	-143.0 ± 1.6	-109.5 ± 1.0	-111.1 ± 1.0
ΔG_{bind}	-10.2 ± 1.2	20.9 ± 1.2	-25.3 ± 1.7	16.0 ± 1.2	13.7 ± 1.7

Примечание: полужирным выделена общая энергия связывания.

стью программы PLANTS при pH 7.0. Для них также найдены два минимума со схожими значениями энергий (табл. 1), и для дальнейшей обработки отобраны три конформации (стартовая и две минимальные).

Молекулярная динамика и расчеты методом возмущения свободной энергии (FEP). Полученные величины ΔG_{bind} представлены в табл. 2–5. Для всех конформаций лигандов с $\Delta G_{\text{bind}} > 0$ вероятность связывания низкая. Это связано с тем, что при большом значении энергии Гиббса реакция связывания лиганда с активным центром белка не спонтанная. Константа ингибирования в этом случае имеет слишком высокие значения, такие, что концентрация лиганда не является достижимой.

Молекулярное моделирование комплекса белок–лиганд FIAU. Присоединение лиганда осуществляется с помощью трех водородных связей между атомами O1 и O2 лиганда и атомом водорода остатка Gly85, между атомом O2 лиганда и атомом N остатка Phe207 (рис. 4). Величина $\Delta G_{\text{bind}} = 16.0$ кДж/моль (табл. 2) говорит об очень низкой аффинности связывания данного лиганда с активным центром белка.

Молекулярное моделирование для комплекса белок–лиганд d4T. Для d4T в конформации с минимальной энергией взаимодействия $\Delta G_{\text{bind}} = -10.2$ кДж/моль ($K_i = 1.4$ мкМ) при $T = 300$ К (табл. 2). Отрицательное значение свободной энергии связывания говорит о возможности связывания

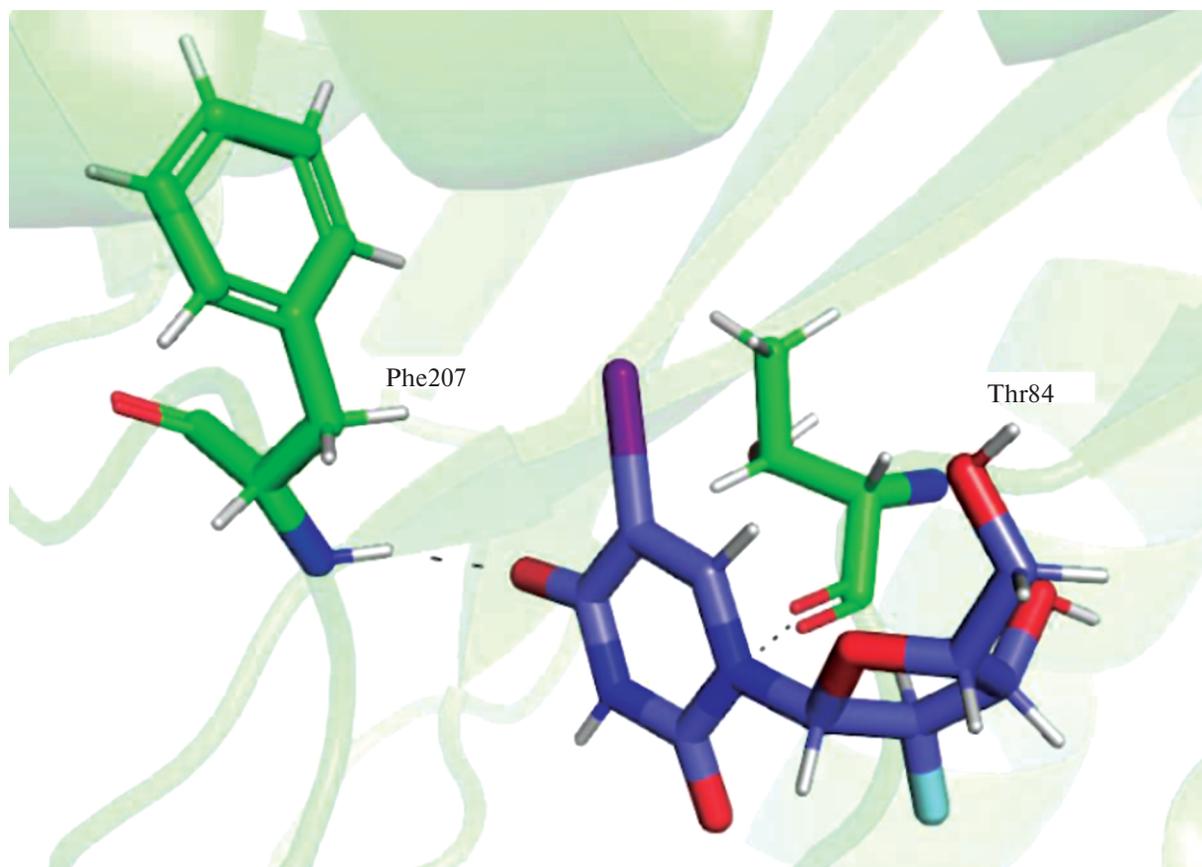


Рис. 4. FIAU в активном центре *BsPyNP*.

лиганда d4T с активным центром *BsPyNP*, т.е. d4T – потенциальный ингибитор. В связи с этим проверили специфичность соединения, сравнив комплекс белок–лиганд для *BsPyNP* и для *hTP*, соответствующим катализатором синтеза азотистых оснований в теле человека. Для этой цели было проведено выравнивание аминокислотной последовательности *BsPyNP* и *hTP* (рис. 5). Выявлены аминокислотные остатки активного центра *hTP*, отличающиеся от соответствующих остатков *BsPyNP*. Далее был проведен анализ связывания d4T с активными центрами двух ферментов, d4T образует водородные связи с атомами аминокислотных остатков *BsPyNP*: атомы кислорода d4T связываются с атомами водорода Ser183 (2.2 Å), Val174 (2.1 Å), Arg168 (2.1, 1.9 и 1.7 Å) и Asp161 (1.8 Å) (рис. 6а). В то же время d4T образует связи в активном центре *hTP* с аминокислотными остатками Arg171 (3 Å), Ser186 (2.7 и 3.5 Å) и Lys109 (2.9 Å) (рис. 6б). Один из остатков – Arg168 (рис. 6а) и этот же остаток под номером Arg171 (рис. 6б) – встречается в обоих случаях.

Молекулярное моделирование комплекса белок–лиганд PIA. Молекула PIA была исследована в двух вариантах протонирования: в форме карбокси-

аниона (нейтральные значения pH) и цвиттер-иона (кислая среда).

При $\text{pH} < 6.5$ $\Delta G_{\text{bind}} = -6.2$ кДж/моль для конформации min_2 , что лучше с точки зрения энергии связывания с белком, чем стартовая конформация, полученная в результате молекулярного докинга, и конформация min_1 (табл. 3). Однако это значение намного превышает значение ΔG_{bind} для конформации анионной формы PIA. Для нее проведено моделирование не только с нативной *BsPyNP*, но и с *BsPyNP* с мутациями в активном центре, соответствующими активному центру *hTP*, для сравнения активности PIA в бактериальной клетке и клетках человека. Это сделано не только для определения различий в аффинности связывания лиганда, но и для выявления конкретных остатков активного центра *BsPyNP*, обуславливающих различие. При $\text{pH} > 6.5$ $\Delta G_{\text{bind}} = -65.5$ кДж/моль для конформации min_1 , что говорит о высокой аффинности связывания PIA с активным центром в этой конформации (табл. 4).

Водородные связи образуются между молекулой предполагаемого ингибитора – PIA – и остатками Lys108, His82, Lys188 и Ser110 белка

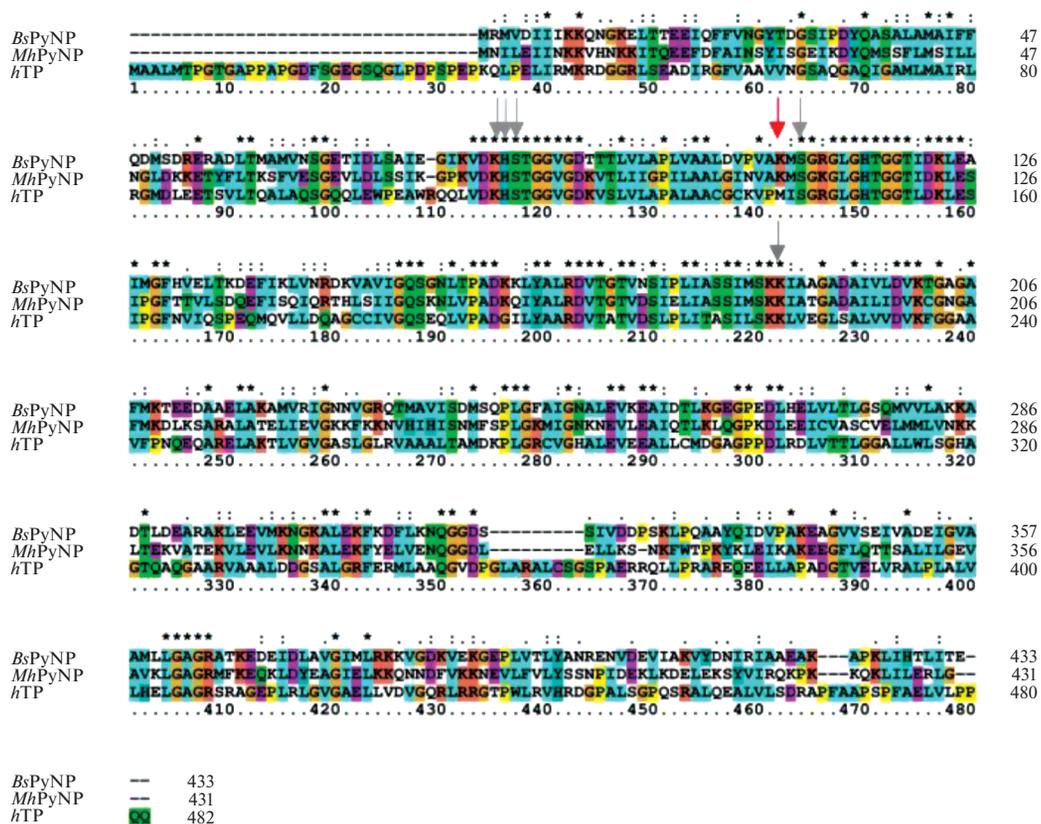


Рис. 5. Вываривание аминокислотных последовательностей пиридиннуклеозидфосфорилазы из *Bacillus subtilis* (*BsPyNP*), пиридиннуклеозидфосфорилазы из *Mycoplasma hyorhinitis* (*MhPyNP*) и тимидиннуклеозидфосфорилазы человека (*hTP*). Цвета обозначают степень совпадения аминокислотных остатков, точки обозначают локации полных совпадений, стрелками обозначены аминокислотные остатки, образующие активный центр.

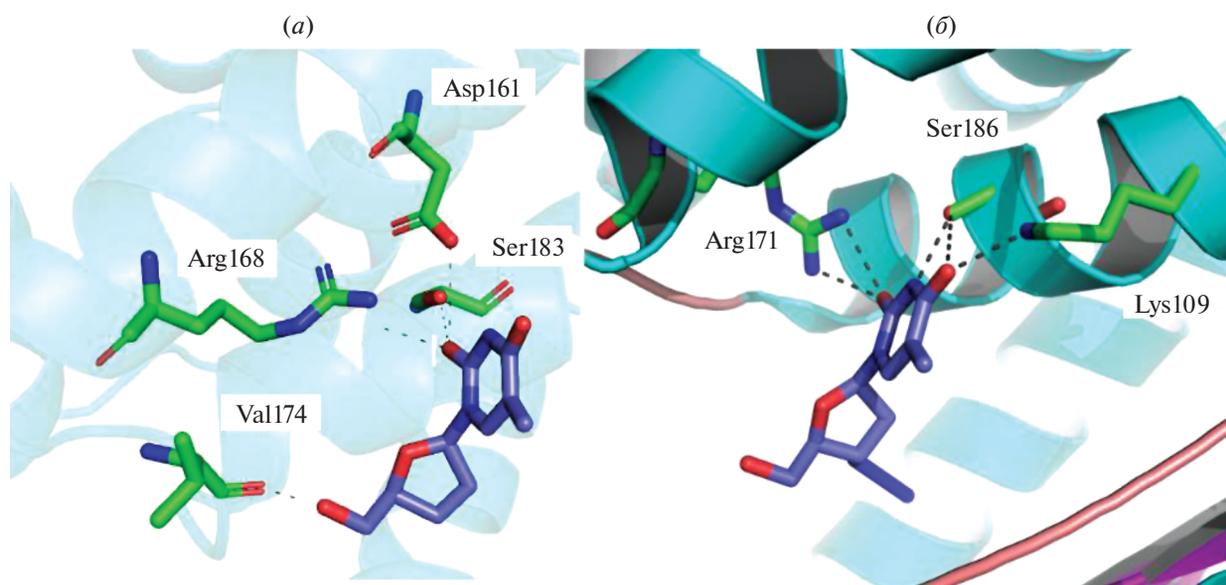


Рис. 6. (a) – Взаимодействие лиганда d4T с белком *BsPyNP*; (б) – взаимодействие d4T с *hTP*.

Таблица 3. Свободная энергия (и ее составляющие) связывания *BsPyNP* с различными конформациями цвиттер-ионной формы PIA (кДж/моль) при pH < 6.5

Составляющая свободной энергии Гиббса	AD _{start}	AD _{min1}	AD _{min2}	PL _{start}	PL _{min1}	PL _{min2}
$\Delta G^{\text{solv_coul}}$	-248.2 ± 0.4					
$\Delta G^{\text{solv_vdw}}$	2.3 ± 0.2					
$\Delta G^{\text{solv(vdw+coul)}}$	-245.9 ± 0.4					
$\Delta G^{\text{solv_rest}}$	-30.0	-31.2	-30.1	-30.1	-30.4	-30.1
$\Delta G^{\text{prot_restr}}$	-15.7 ± 0.3	-8.1 ± 0.1	-3.7 ± 0.0	-52.8 ± 1.4	-8.8 ± 0.2	-10.7 ± 0.2
$\Delta G^{\text{prot_coul}}$	-265.7 ± 1.4	-269.5 ± 0.8	-283.9 ± 1.0	-246.6 ± 1.4	-259.5 ± 1.5	-280.4 ± 0.9
$\Delta G^{\text{prot_vdw}}$	18.3 ± 0.9	-1.4 ± 0.7	2.8 ± 0.6	-0.1 ± 0.6	-6.9 ± 0.5	8.8 ± 0.6
ΔG^{prot}	-263.1 ± 1.7	-279.0 ± 1.1	-284.8 ± 1.1	-299.3 ± 2.0	-275.2 ± 1.6	-282.2 ± 1.1
ΔG^{bind}	12.8 ± 1.7	-1.9 ± 1.2	-8.8 ± 1.2	-23.3	1.1 ± 1.6	-6.2 ± 1.2

Примечание: полужирным выделена общая энергия связывания.

Таблица 4. Свободная энергия (и ее составляющие) связывания *BsPyNP* с различными конформациями анионной формы PIA при pH > 6.5 (кДж/моль)

Составляющая свободной энергии Гиббса	AD _{start}	AD _{min}	PL _{start}	PL _{min1}	PLANTS _{min2}
$\Delta G^{\text{solv_coul}}$	-522.1 ± 0.6				
$\Delta G^{\text{solv_vdw}}$	2.7 ± 0.2				
$\Delta G^{\text{solv(vdw+coul)}}$	-519.3 ± 0.7				
$\Delta \Delta G^{\text{DSF_solv}}$	-0.3				
$\Delta \Delta G^{\text{NET}} + \Delta \Delta G^{\text{USV}}$	0.7				
$\Delta \Delta G^{\text{RIP_solv}}$	~0.0				
$\Delta G^{\text{solv_rest}}$	-31.7	-30.2	-29.6	-32.2	-31.7
$\Delta G^{\text{prot_restr}}$	-39.0 ± 0.3	-4.1 ± 0.0	-28.2 ± 0.4	-3.4 ± 0.0	-7.1 ± 0.0
$\Delta G^{\text{prot_coul}}$	-554.5 ± 2.4	-569.2 ± 2.7	-553.7 ± 2.6	-613.3 ± 2.6	-597.1 ± 2.5
$\Delta G^{\text{prot_vdw}}$	16.3 ± 0.6	13.3 ± 0.8	14.2 ± 0.7	4.2 ± 0.7	36.3 ± 0.8
$\Delta G^{\text{prot(vdw+coul+restr)}}$	-577.2 ± 2.5	-560.0 ± 2.9	-567.6 ± 2.7	-612.5 ± 2.7	-567.9 ± 2.6
$\Delta \Delta G^{\text{DSF}}$	-4.2	-4.4	-4.4	-4.4	-4.6
$\Delta \Delta G^{\text{NET}} + \Delta \Delta G^{\text{USV}}$	0.3				
$\Delta \Delta G^{\text{RIP}}$	0.6	0.3	0.2	0.0	0.0
ΔG^{bind}	-29.9 ± 2.6	-14.7 ± 3.0	-23.0 ± 2.7	-65.5 ± 2.7	-21.6 ± 2.7

Примечание: полужирным выделена общая энергия связывания.

BsPyNP (рис. 7). Различные найденные конформации PIA отличаются в основном положением карбоксильной группы, которая связывается во-

дородными связями с Lys108 и His82. Эти аминокислотные остатки было решено заменить на соответствующие остатки *hTP* и провести расчет

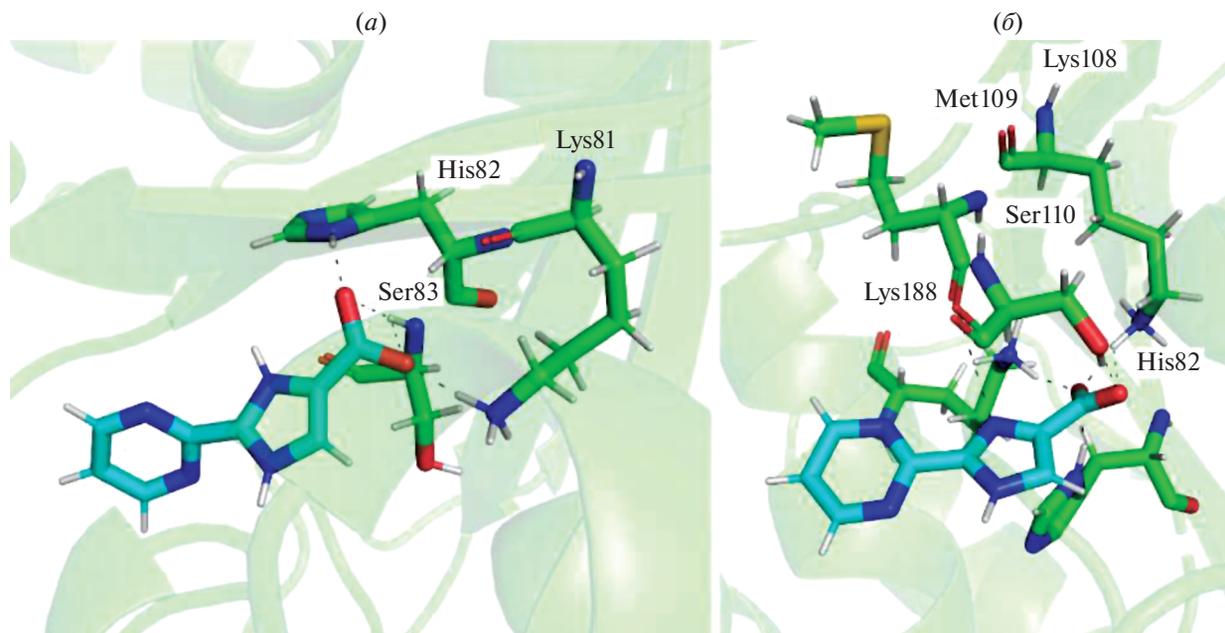


Рис. 7. Молекула PIA в активном центре белка *BsPyNP* при pH < 6.5 (а) и pH > 6.5 (б).

свободной энергии методом возмущения свободной энергии (FEP).

Созданы структурные модели двух мутантов: с заменой остатка Lys108 на Trp108 и с заменой остатка His82 на Gly82. В результате для получившихся моделей ΔG_{bind} варьируется от -25.1 до 4.4 кДж/моль (табл. 5), что существенно меньше по модулю энергии для лиганда в активном центре нативной *BsPyNP* при pH > 6.5.

После замены аминокислотных остатков в активном центре белка остатки, образующие водородные связи с лигандом, изменились (рис. 8). Водородные связи образуются между карбоксильной группой лиганда и атомами кислорода для Thr108 (2.9 Å), Lys188 (3.4 и 3.0 Å) и Ser110 (2.6 Å). Также образуется водородная связь между карбоксильной группой и атомом азота в случае Lys188 (3.1 Å). В целом наблюдаются большие расстояния между атомами при связывании PIA с

Таблица 5. Свободная энергия (и ее составляющие) связывания мутантной (K108M) *BsPyNP* с различными конформациями цвиттер-ионной (при pH < 6.5) и анионной (при pH > 6.5) формы PIA (кДж/моль)

Конформация	pH < 6.5		pH > 6.5	
	start	min	start	min
$\Delta G^{\text{solv_rest}}$	-31.8	-33.1	-31.3	-31.1
$\Delta G^{\text{prot_restr}}$	-32.4 ± 0.6	-7.2 ± 0.1	-11.3 ± 0.1	-14.0 ± 0.2
$\Delta G^{\text{prot_coul}}$	-251.0 ± 1.0	-277.8 ± 0.9	-537.4 ± 2.4	-554.4 ± 2.4
$\Delta G^{\text{prot_vdw}}$	-6.3 ± 0.7	8.5 ± 0.6	6.3 ± 0.8	-2.7 ± 0.8
$\Delta G^{\text{prot(vdw + coul + restr)}}$	-293.5 ± 1.3	-276.5 ± 1.1	-542.5 ± 2.5	-571.1 ± 2.5
$\Delta \Delta G^{\text{DSF}}$	—	—	-4.4	-4.4
$\Delta \Delta G^{\text{NET}} + \Delta \Delta G^{\text{USV}}$	—	—	0.3	
$\Delta \Delta G^{\text{RIP}}$	—	—	0.8	0.1
ΔG_{bind}	-15.8 ± 1.4	2.5 ± 1.2	4.4 ± 2.6	-25.1 ± 2.6

Примечание: полужирным выделена общая энергия связывания. Составляющие энергии сольватации лиганда показаны в табл. 3 и 4.

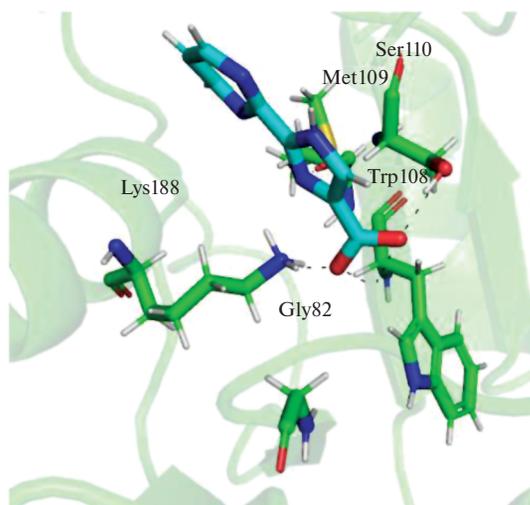


Рис. 8. Молекула PIA в активном центре белка *BsPuNP* с замененными аминокислотными остатками, имитирующими активный центр *hTP*.

мутантными формами PuNP, что подтверждается меньшей по модулю ΔG_{bind} .

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Молекулярный докинг. В качестве исходной структуры для молекулярного докинга была использована структура белка *BsPuNP*, полученная в ходе рентгеноструктурного анализа [5]. Для получения наиболее полного набора конфигураций использовали программы молекулярного докинга Autodock [10] и PLANTS [11], работающие с разными алгоритмами поиска глобального минимума: Autodock использует алгоритм Монте-Карло [12], а PLANTS – алгоритм оптимизации подражания муравьиной колонии [13]. В обеих программах для параметризации атомов использовали полуэмпирическое силовое поле AMBER. В качестве активной области докинга был выбран куб с ребром 22 Å, в который были включены все атомы аминокислотных остатков активного центра белка *BsPuNP*. Шаг сетки докинга составлял 0.375 Å. Аминокислотные остатки считались неподвижными. В ходе докинга было отобрано по 10 конформаций для каждого лиганда с самыми высокими значениями оценочных функций, используемых по умолчанию в каждой из программ. Конформации объединены в кластеры по параметру среднеквадратичного отклонения координат атомов лиганда (рис. 2).

Молекулярное моделирование методом классической молекулярной динамики. Для исследования устойчивости связывания лигандов с PuNP проводили молекулярно-динамическое (МД) моделирование этого комплекса в пакете программ

GROMACS (версия 2018.6) [13, 14]. Компоновку и параметризацию МД-систем комплексов белок–лиганд проводили в web-сервисе CHARMM-GUI [13–15] с использованием набора полноатомных силовых полей CHARMM [16, 17] версии C36m [15]. Модельные ячейки заполняли молекулами воды, которые описывались трехцентровой моделью TIP3P, с добавлением нейтрализующих ионов Na^+ и Cl^- с концентрацией 0.1 М.

Для интегрирования с шагом 2 фс уравнений движения Ньютона использовали алгоритм “leapfrog”. Длина траектории молекулярной динамики составляла 20 нс. Расчет дальних электростатических взаимодействий проводили методом частица–сетка (PME) [18, 19]. Для описания ван-дер-ваальсовых взаимодействий использовали функцию сглаживания “force-switch” в интервале 10–12 Å. Давление в системе контролировали баростатом Паринелло–Рахмана [19] на уровне 1 бар. Температуру МД-системы поддерживали постоянной с помощью термостата V-rescale [20] на уровне 300 К. Процедуре молекулярной динамики предшествовал этап минимизации энергии системы с использованием выбранного силового поля в виртуальной ячейке методом градиентного спуска и уравнивание системы путем моделирования с ограничениями, накладываемыми на положения неводородных атомов белка и лиганда в NVT- и NPT-ансамблях в течение 200 пс (использовали баростат Берендсена).

Определение относительной аффинности связывания лигандов методом линейной интерполяции свободной энергии (LIE). Приблизительную оценку аффинности связывания лигандов методом LIE [21] осуществляли в программе gmx lie программного пакета GROMACS (версия 2018.6) [13, 14]. Метод использовали как для оценки энергии связывания лиганда в конформациях, полученных на этапе молекулярного докинга, так и для поиска дополнительных конформаций лиганда с помощью молекулярно-динамической симуляции. Для этого предварительно рассчитывались средние энергии силового поля ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий лигандов с водой в течение 20 нс.

Для расчета потенциальной энергии кулоновского взаимодействия лиганда с окружением траектории МД-симуляции белок–лиганд перерабатывали с использованием метода обобщенного поля реакции (Generalized RF) при отсечке 12 Å. Эмпирические константы α и β , определяющие вклад ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий в оценку энергии связывания лигандов, выбраны в соответствии со статьей [22]. Коэффициент сдвига γ был принят равным нулю в связи с невозможностью его подбора на данном

этапе исследования. Коэффициент γ – дополнительный, он зависит от особенностей модели и гидрофобности активного центра и требуется для согласования данных LIE с экспериментальными данными.

Расчет свободной энергии связывания лиганда с ферментом *BsPynP* методом возмущения свободной энергии (FER). Расчет свободной энергии связывания лигандов с белком *BsPynP* проводили, используя термодинамический цикл, описанный Aldeghi et al. [23]. Первый этап заключался в сборе отсчетов производной гамильтониана системы по параметру связи Кирквуда (λ -параметр, [24]) (для метода термодинамического интегрирования (ТИ) и разницы в потенциальной энергии системы между текущим состоянием и остальными (для методов на основе FER)).

Для систем белок–лиганд и белок–вода проводили МД-симуляцию в NPT-ансамбле в течение 2.4 нс, используя алгоритм интегрирования “leapfrog” уравнений стохастической динамики для каждого набора λ -параметров. С целью удержания лиганда в области связывания при уменьшении силы взаимодействия с белком вводили дополнительные межмолекулярные ограничения – ориентационные рестрейны [23], используя программу PyFERestr [25]. Для системы белок–лиганд параметр связи λ менялись последовательно для λ_{restr} (0, 0.010, 0.025, 0.050, 0.075, 0.100, 0.200, 0.350, 0.500, 0.750, 1.000) и λ_{coul} (0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00); λ_{vdw} (0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60, 0.65, 0.70, 0.75, 0.80, 0.85, 0.90, 0.95, 1.00). В случае системы лиганд–вода параметры связи менялись лишь для кулоновских и ван-дер-ваальсовых взаимодействий лиганда с водой. Необходимую для вычисления свободной энергии связывания (ΔG_{bind}) поправку на энергию введенных ограничений для системы лиганд–вода ($\Delta G_{\text{solvent}}^{\text{rest}}$) считали аналитически по формуле, приведенной в работе [26]. Ван-дер-ваальсовые взаимодействия рассчитывали, используя потенциал “мягкого ядра” (soft core) Леннарда–Джонса. Для учета как дальних кулоновских, так и ван-дер-ваальсовых взаимодействий использовали метод частица–сетка (PME) [27].

До проведения МД-симуляций в дополнение к общему уравниванию системы при каждом значении параметра связи λ проводили процедуры оптимизации геометрии и уравнивания системы в NVT- и NPT-ансамблях в течение 100 пс.

Обработку данных МД-симуляций при разных параметрах связи Кирквуда осуществляли в написанной в среде Jupyter Notebook программе, с использованием библиотек alchemlib и rumbbar. Первый шаг – извлечение разницы редуцирован-

ных потенциалов (ΔU_{ij}) – выполняли с использованием библиотеки alchemlyb. Затем проводили отбор нескорелированных отсчетов ΔU_{ij} и отсекали неуровновешенную часть траекторий с использованием функции detectEquilibration библиотеки rumbbar [28]. В качестве входного параметра для расчета статистической неэффективности использовали значения ΔU_{ij} между МД-симуляциями с соседними λ . На третьем шаге статистически независимые отсчеты ΔU_{ij} обрабатывали с использованием метода множественного отношения вероятности принятия шага Беннетта (MBAR) [29]. Корректность расчетов контролировали по матрице перекрытия между λ -состояниями, а также сравнением полученных значений ΔG со значениями, полученными другими методами: EXP (метод экспоненциального усреднения) [28], VAR (метод отношения вероятности принятия шага Беннетта) [29] и TI (метод термодинамического интегрирования).

Поскольку суммарный заряд атомов PIA при $\text{pH} > 6.5$ равен $-1e$, необходимо было в этом случае вычислить поправки на суммирование по Эвальду и периодические граничные условия, их рассчитывали с использованием аналитической схемы [30]. Заряд белка был полностью нейтрализован противоионами, эффективный $Q_p = 0$. $1/4\pi\epsilon_0$ полагался равным $138.93545585 \text{ кДж нм } e^{-2} \text{ моль}^{-1}$, ϵ_s для TIP3P воды -82 , $\rho_{300\text{K}} = 997 \text{ кг/м}^3$, $\gamma_s = 0.0764 \text{ е нм}^2$. Остаточные интегральные потенциалы (RIP) молекулы белка и лиганда рассчитывали с использованием программы APBS [24].

Свободную энергию связывания белок–лиганд (ΔG_{bind}) рассчитывали по формуле:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G^{\text{prot}} - \Delta G^{\text{solv}},$$

$$\Delta G^{\text{x}} = \Delta G^{\text{coul}} + \Delta G^{\text{vdw}} + \Delta G^{\text{rest}},$$

где ΔG^{coul} – свободная энергия кулоновского взаимодействия; ΔG^{vdw} – свободная энергия ван-дер-ваальсового взаимодействия, определяемого как потенциал Леннарда–Джонса; ΔG^{rest} – свободная энергия рестрейнов (в случае системы лиганд–растворитель рассчитывается аналитически по формуле, описанной в работе [26]).

В случае заряженного лиганда как к ΔG^{prot} , так и $\Delta G^{\text{solvent}}$ добавляются соответствующие поправки: $\Delta\Delta G_{\text{DSF}}$ – часть поправки, связанной с использованием явной (дискретной) модели растворителя, учитывающая конечные размеры ячейки моделирования; $\Delta\Delta G_{\text{NET}}$ – поправка на влияние периодических граничных условий на кулоновское взаимодействие бесконечного количества периодических копий точечного заряда, $\Delta\Delta G_{\text{USV}}$ – поправка на влияние эффекта неполной сольватации;

$\Delta\Delta G_{\text{RIP}}$ – поправка на влияние остаточного интегрированного потенциала. Часть поправки, связанной с использованием явной (дискретной) модели растворителя, для случая системы бесконечного объема ячейки моделирования (DSI) не включена в выходные данные, т.к. ее значение (-74.11 кДж/моль) одинаково для всех рассматриваемых в статье систем белок–лиганд и лиганд–растворитель и обнуляется при расчете ΔG_{bind} [24, 30, 31].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы был проведен поиск специфичного ингибитора пиримидиннуклеозидфосфорилазы. В качестве возможных лигандов были изучены 2',3'-дидегидро-3'-дезокситимидин (d4T), 1-(2-дезоксидефтор-β-D-арабинофуранозил)-5-иодурацил (фиауридин, FIAU), 1-(2-дезоксидефтор-β-D-арабинофуранозил)-5-урацил (FAU) и 2-пиримидин-2-ил-1*H*-имидазол-4-карбоновая кислота (PIA) с помощью методов молекулярного моделирования комплексов белок–лиганд, таких как молекулярный докинг и молекулярная динамика, позволяющие найти энергию связывания белка с лигандом (ΔG_{bind}) с использованием методов LIE и FER. По данным моделирования, а именно по величине свободной энергии связывания белок–лиганд, можно сделать вывод о том, что лиганды d4T и PIA – потенциальные ингибиторы бактериальных широкоспецифичных пиримидиннуклеозидфосфорилаз, т.к. их связывание с активным центром энергетически выгодно.

В настоящее время соединение d4T выпускается под названием Ставудин (ОАО Фармсинтез, Россия) и применяется для лечения ВИЧ [32, 33]. Возможный ингибитор PIA не проходил клинические исследования. Клинические исследования для лиганда FAU не проводились, а для лиганда FIAU в ходе эксперимента была обнаружена высокая токсичность [34].

Полученные в ходе расчетов результаты указывают на то, что оба соединения – PIA и d4T – связываются с активным центром *BsPyNP* с наибольшей аффинностью среди других предполагаемых субстратов. Причем при моделировании связывания PIA в средах с различным pH энергия принимает более высокие значения по модулю, чем при нейтральном pH. Это, вероятно, объясняется образованием шести водородных связей с 3 а.о. белка при pH > 6.5, в отличие от пяти водородных связей при pH < 6.5 в случае PIA. Дополнительная водородная связь образуется с Lys108. Особенную роль здесь играет значение pH, т.к. в бактериальных клетках значения pH приближены к 7, т.е. химические реакции проходят в нейтральной среде. Следствием специфического свя-

зывания белка *BsPyNP* с выбранными соединениями может стать снижение скорости процессов ресинтеза азотистых оснований, что, в свою очередь, может привести к гибели бактериальных клеток.

В ходе расчетов свободной энергии связывания для комплекса белок–лиганд с замененными аминокислотными остатками в активном центре, имитирующими активный центр тимидинфосфорилазы человека, было обнаружено: PIA хуже связывается с *hTP* чем с *BsPyNP*, это минимизирует возможные побочные эффекты применения этого соединения в терапевтических целях.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием инфраструктуры Центра коллективного пользования “Высокопроизводительные вычисления и большие данные” (ЦКП “Информатика”) ФИЦ ИУ РАН (г. Москва). Положение о ЦКП “Информатика”: <http://www.frccsc.ru/ckp>.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-29-12054) в части расчетов методом возмущения свободной энергии, при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по государственному заданию ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН (в части моделирования методами молекулярного докинга и молекулярной динамики).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Friedkin M., Roberts D.* // *J. Biol. Chem.* 1954. V. 207. P. 245–256.
2. *Liekens S., Bronckaers A., Balzarini J.* // *Lancet Oncol.* 2009. V. 10. P. 628–635. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(09\)70037-3](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(09)70037-3)
3. *Bronckaers A., Balzarini J., Liekens S.* // *Biochem. Pharmacol.* 2008. V. 76. P. 188–197. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.04.019>

4. *Vande Voorde J., Gago F., Vrancken K., Liekens S., Balzarini J.* // *Biochem. J.* 2012. V. 445. P. 113–123.
<https://doi.org/10.1042/bj20112225>
5. *Balaev V.V., Prokofev I.I., Gabdoulkhakov A.G., Betzel C., Lashkov A.A.* // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 2018. V. 74. P. 193–197.
<https://doi.org/10.1107/s2053230x18002935>
6. *Van Rompay A.R., Johansson M., Karlsson A.* // *Pharmacol. Ther.* 2003. V. 100. P. 119–139.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2003.07.001>
7. *Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J.* // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001. V. 46. P. 3–26.
[https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0)
8. *Balaev V.V., Lashkov A.A., Prokofev I.I., Gabdulkhakov A.G., Seregina T.A., Mironov A.S., Betzel C., Mikhailov A.M.* // *Crystallogr. Rep.* 2016. V. 61. P. 830–841.
<https://doi.org/10.1134/S1063774516050023>
9. *Korb O., Stütze T., Exner T.E.* // *Swarm Intell.* 2007. V. 1. P. 115–134.
<https://doi.org/10.1007/s11721-007-0006-9>
10. *Goodsell D.S., Olson A.J.* // *Proteins.* 1990. V. 8. P. 195–202.
<https://doi.org/10.1002/prot.340080302>
11. *Korb O., Stütze T., Exner T.E.* // *J. Chem. Inf. Model.* 2009. V. 49. P. 84–96.
<https://doi.org/10.1021/ci800298z>
12. *Metropolis N., Ulam S.* // *J. Am. Stat. Assoc.* 1949. V. 44. P. 335–341.
<https://doi.org/10.1080/01621459.1949.10483310>
13. *Dorigo M., Maniezzo V., Colnari A.* // *IEEE Trans. Syst. Man Cybern. B Cybern.* 1996. V. 26. P. 29–41.
<https://doi.org/10.1109/3477.484436>
14. *Van Der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A.E., Berendsen H.J.C.* // *J. Comput. Chem.* 2005. V. 26. P. 1701–1718.
<https://doi.org/10.1002/jcc.20291>
15. *Jo S., Kim T., Iyer V.G., Im W.* // *J. Comput. Chem.* 2008. V. 29. P. 1859–1865.
<https://doi.org/10.1002/jcc.20945>
16. *MacKerell A.D., Bashford D., Bellott M., Dunbrack R.L., Evanseck J.D., Field M.J., Fischer S., Gao J., Guo H., Ha S., Joseph-McCarthy D., Kuchnir L., Kuczera K., Lau F.T., Mattos C., Michnick S., Ngo T., Nguyen D.T., Prodhom B., Reiher W.E., Roux B., Schlenkrich M., Smith J.C., Stote R., Straub J., Watanabe M., Wiórkiewicz-Kuczera J., Yin D., Karplus M.* // *J. Phys. Chem. B.* 1998. V. 102. P. 3586–3616.
<https://doi.org/10.1021/jp973084f>
17. *Huang J., Rauscher S., Nawrocki G., Ran T., Feig M., de Groot B.L., Grubmüller H., MacKerell A.D., Jr.* // *Nat. Methods.* 2017. V. 14. P. 71–73.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.4067>
18. *Petersen H.G.* // *J. Chem. Physics.* 1995. V. 103. P. 3668–3679.
<https://doi.org/10.1063/1.470043>
19. *Parrinello M., Rahman A.* // *J. Appl. Physics.* 1981. V. 52. P. 7182–7190.
<https://doi.org/10.1063/1.328693>
20. *Bussi G., Parrinello M.* // *Computer Physics Comm.* 2008. V. 179. P. 26–29.
<https://doi.org/10.1016/j.cpc.2008.01.006>
21. *Hansson T., Marelius J., Åqvist J.* // *J. Comput. Aided Mol. Des.* 1998. V. 12. P. 27–35.
<https://doi.org/10.1023/a:1007930623000>
22. *Aldeghi M., Heifetz A., Bodkin M.J., Knapp S., Biggin P.C.* // *Chem. Sci.* 2016. V. 7. P. 207–218.
<https://doi.org/10.1039/c5sc02678d>
23. *Lashkov A.A., Tolmachev I.V., Eistrikk-Heller P.A., Rubinsky S.V.* // *Crystallogr. Rep.* 2021. V. 66. P. 861–865.
<https://doi.org/10.1134/S1063774521050126>
24. *Rocklin G.J., Mobley D.L., Dill K.A., Hünenberger P.H.* // *J. Chem. Phys.* 2013. V. 139. P. 184103.
<https://doi.org/10.1063/1.4826261>
25. *Boresch S., Tettinger F., Leitgeb M., Karplus M.* // *J. Phys. Chem. B.* 2003. V. 107. P. 9535–9551.
<https://doi.org/10.1021/jp0217839>
26. *Wennberg C.L., Murtola T., Páll S., Abraham M.J., Hess B., Lindahl E.* // *J. Chem. Theory Comput.* 2015. V. 11. P. 5737–5746.
<https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00726>
27. *Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B., Lindahl E.* // *SoftwareX.* 2015. V. 1. P. 19–25.
<https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
28. *Shirts M.R., Chodera J.D.* // *J. Chem. Phys.* 2008. V. 129. P. 124105.
<https://doi.org/10.1063/1.2978177>
29. *Zwanzig R.W.* // *J. Chem. Phys.* 1954. V. 22. P. 1420–1426.
30. *Jurrus E., Engel D., Star K., Monson K., Brandi J., Felberg L.E., Brookes D.H., Wilson L., Chen J., Liles K., Chun M., Li P., Gohara D.W., Dolinsky T., Konecny R., Koes D.R., Nielsen J.E., Head-Gordon T., Geng W., Krasny R., Wei G., Holst M.J., McCammon J.A., Baker N.A.* // *Protein Sci.* 2018. V. 27. P. 112–128.
<https://doi.org/10.1002/pro.3280>
31. *Balaev V.V., Prokofev I.I., Gabdoulkhakov A.G., Betzel C., Lashkov A.A.* // X-Ray Structure of the Complex Pyrimidine-Nucleoside Phosphorylase from *Bacillus subtilis* at 1.88 Å. Worldwide Protein Data Bank, 2018.
32. *Kandil S., Pannecouque C., Chapman F.M., Westwell A.D., McGuigan C.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2019. V. 29. P. 126721.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.126721>
33. Institute of Medicine, Committee to Review the Fialuridine (FIAU/FIAC) Clinical Trials. Review of the Fialuridine (FIAU) Clinical Trials. National Academies Press, 1995. 280 p.
34. *Kirkwood J.G.* // *J. Chem. Phys. Am. Inst. Phys.* 1935. V. 3. № 5. P. 300–313.

Free Energy of Binding Calculations of Widely Specific Pyrimidine Nucleoside Phosphorylase with Suspected Inhibitors

P. A. Eistrikh-Heller*, #, S. V. Rubinsky*, V. R. Samygina*, **, and A. A. Lashkov*

#Phone: +7 (916) 875-27-80; e-mail: eistrikh.geller@crys.ras.ru

*Shubnikov Institute of Crystallography of Federal Scientific Research Centre "Crystallography and Photonics", Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 56, Moscow, 119333 Russia

**National Research Center "Kurchatov Institute", pl. Akademika Kurchatova 1, Moscow, 123182 Russia

The search for a specific inhibitor of pyrimidine nucleoside phosphorylase is a central objective of the work. The search was carried out using methods of molecular modeling of protein-ligand complexes: molecular docking and molecular dynamics. These methods are used to calculate the binding energy of a protein to a ligand (ΔG_{bind}). The following compounds were selected as possible inhibitors: 2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine (d4T), 1-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)-5-ioduracil (fiauridine, FIAU), 1-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)-5-uracil (FAU) and 2-pyrimidin-2-yl-1H-imidazole-4-carboxylic acid (PIA). A preliminary estimate of the binding energy was carried out by the linear interaction energy (LIE) method, and a more accurate calculation was carried out by the free energy perturbation (FEP) method in the GROMACS software package. The data obtained during the calculations showed that the PIA and d4T compounds bind to the active site of the protein with the highest affinity among the other studied inhibitors. PIA also binds less strongly to human thymidine phosphorylase. This minimizes the possible side effects of using this compound for therapeutic purposes.

Keywords: molecular docking, pyrimidine-nucleoside phosphorylase, free energy perturbation



УДК 547.782

ЦИКЛООКТАТЕТРАЕН КАК ФОТОСТАБИЛИЗАТОР ФЛУОРОГЕНА БЕЛКА FAST¹

© 2022 г. А. И. Соколов*, **, А. А. Горшкова*, Н. С. Балеева*, **, #, М. С. Баранов*, **

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

**Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова,
Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Поступила в редакцию 11.05.2022 г.

После доработки 22.05.2022 г.

Принята к публикации 17.06.2022 г.

Синтезированы два новых аналога флуорогена N871b, содержащих циклооктатетраен. Изучена фотостабильность флуоресцентных комплексов белка FAST с новыми соединениями при окрашивании живых клеток HeLa Kyoto в условиях конфокальной микроскопии. Показано, что один аналог демонстрирует заметно большую фотостабильность в сравнении с оригинальным флуорогеном N871b. Полученные результаты говорят о высокой перспективности применения циклооктатетраена для модификации красителей на основе арилиден-имидазолонов.

Ключевые слова: имидазолы, флуорогены, флуороген-активирующие белки, фотостабилизаторы

DOI: 10.31857/S0132342322060239

ВВЕДЕНИЕ

Флуоресцентные красители, используемые в современной флуоресцентной микроскопии, характеризуются длинноволновым поглощением и испусканием, имеют небольшой размер и низкую токсичность. Также к важным свойствам флуоресцентной метки относятся яркость и фотостабильность красителя. Последнее имеет особенное значение для применения в микроскопии сверхвысокого разрешения, т.к. в данном случае изучаемый объект подвергается интенсивному облучению.

В связи с этим новым перспективным объектом для исследований стали недавно предложенные так называемые “самовосстанавливающиеся” красители (self-healing dyes) [1–4]. Такие красители состоят из двух фрагментов: флуоресцентного красителя и фотостабилизатора. Последний препятствует формированию возбужденного триплетного состояния флуорофора, которое и приводит к фотообесцвечиванию. Пример фотостабилизатора – циклооктатетраен (COT, от англ. CycloOctaTetraen) (рис. 1). В настоящий момент в большинстве случаев модификация COT-группой применяется для цианиновых красителей [5–8]. Циклооктатетраен, как правило, связан с молекулой красителя либо с помощью простого алкильного линкера, либо амид-

ной или сложноэфирной группой, увеличивающей π -систему сопряжения COT (рис. 1). Причем в зависимости от строения цианинового красителя (например, количества двойных связей) тот или иной тип связи с COT оказывает разный фотостабилизирующий эффект [5, 6].

В данной работе исследовано влияние циклооктатетраена на фотостабильность арилиден-имидазолоновых флуоресцентных красителей. В качестве модельного соединения был выбран синтезированный нами ранее флуороген N871b, который успешно используется в паре с флуороген-активирующим белком FAST для генетически кодируемого флуоресцентного мечения (рис. 2) [9].

Цель настоящей работы – синтез аналогов флуорогена N871b, содержащих COT-группу, и изучение фотостабильности этих соединений при окрашивании живых клеток HeLa Kyoto с использованием метода конфокальной микроскопии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Важное условие химической модификации флуорогена – сохранение его способности формировать флуоресцентный комплекс с белком, поэтому для введения COT-группы необходимо выбрать тот фрагмент молекулы, который в наименьшей степени участвует в процессе формирования комплекса с флуороген-активирующим белком. Для модификации флуорогена N871b мы выбрали группу на атоме азота имидазолона, т.к. согласно полученным нами ранее данным о структуре флуоресцентного

¹ Дополнительные материалы к этой статье доступны по doi 10.31857/S0132342322060239 для авторизованных пользователей.

Сокращения: COT – циклооктатетраен (CycloOctaTetraen).
Автор для связи: (тел.: +7 (926) 704-13-72; эл. почта: nsbaleeva@gmail.com).

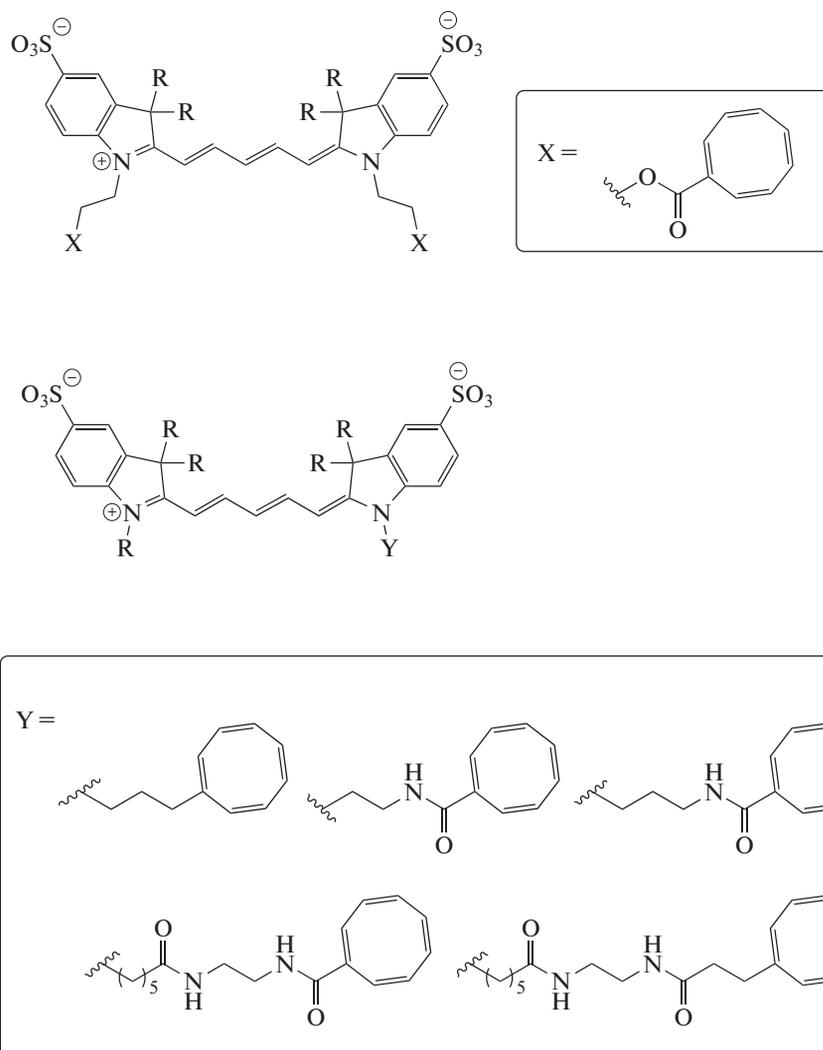


Рис. 1. Применение модификации COT-группой на примере цианинового красителя Су5.

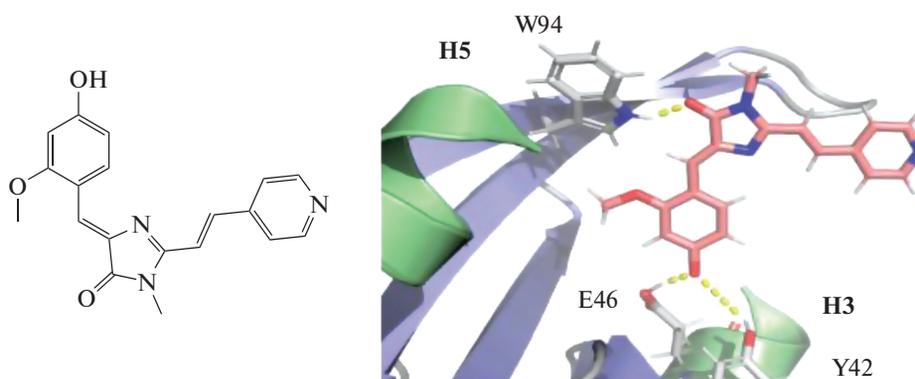


Рис. 2. Строение флуорогена N871b и его связывание с флуороген-активирующим белком FAST. Отмечены водородные связи флуорогена N871b с остатками триптофана (W94), глутаминовой кислоты (E46) и тирозина (Y42).

комплекса флуорогена N871b с белком FAST, этот фрагмент находится вне кармана белка, и его модификация, вероятно, не повлияет на процесс формирования комплекса (рис. 2) [10].

На первом этапе работы был синтезирован аналог флуорогена N871b, содержащий эфирную группу в первом положении имидазолонана (II) (схема 1). Гидролиз последнего позволил получить производ-

ное N871b с кислотной группой (III). Затем при взаимодействии кислоты (III) и защищенного диамина с последующим снятием защитной группы был получен амин (V) (схема 1). Одновременно с этим нами были синтезированы не-

обходимые производные циклооктатетраена (VI) и (IX), содержащие кислотные группы. На финальном этапе с помощью реакции амина (V) с кислотами (VI) и (IX) были получены целевые соединения (X) и (XI) (схема 1).

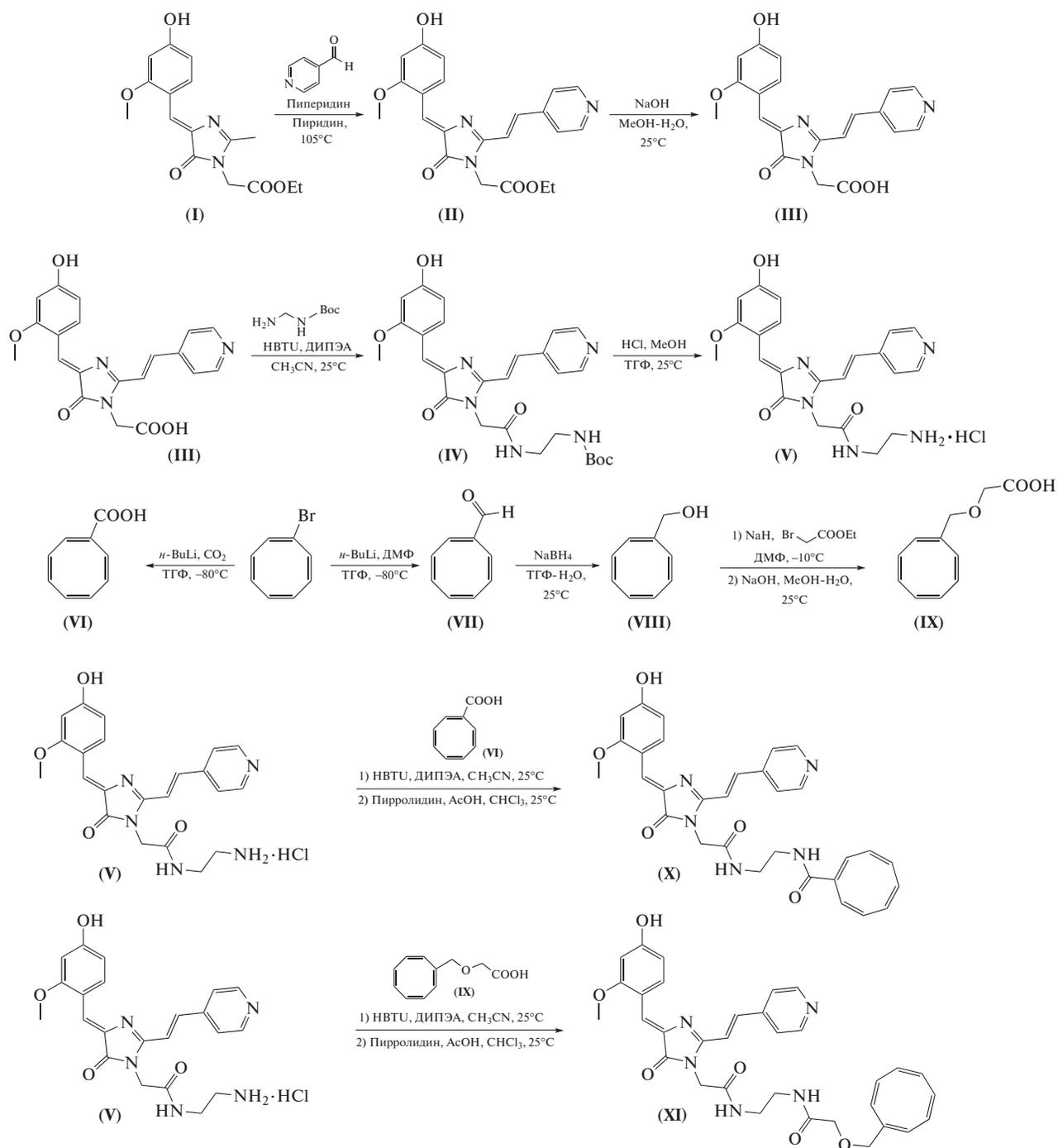


Схема 1. Синтез соединений (III–XI).

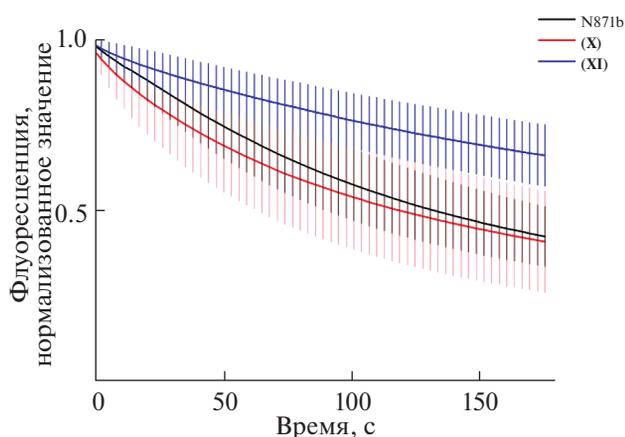


Рис. 3. Кривые фотообесцвечивания флуоресцентного сигнала флуорогена N871b и соединений (X) и (XI) в комплексе с белком FAST в клетках линии HeLa Kyoto, полученные при помощи лазерной сканирующей микроскопии (SD отображается окрашенной областью, $n = 9-10$). Соединения разводили из 1 мМ раствора в DMSO до конечной концентрации 5–10 мкМ.

Затем мы изучили эффективность окрашивания живых клеток соединениями (X) и (XI) в сравнении с оригинальным флуорогеном N871b в условиях конфокальной микроскопии. К клеткам HeLa Kyoto, трансфицированным плазмидой, содержащей ген, кодирующий белок FAST, слитый с белком цитоскелета, были добавлены флуороген N871b и соединения (X) и (XI). При добавлении новых синтезированных соединений (X) и (XI), так же как и при добавлении флуорогена N871b, наблюдалось значимое усиление флуоресценции. Это позволяет заключить, что введение СОТ-группы в молекулу N871b не привело к потере флуорогенных свойств, и новые соединения способны формировать флуоресцентный комплекс с белком FAST. Также было установлено, что при длительном облучении (лазером с длиной волны 543 нм) комплекс соединения (X) обесцвечивается с той же скоростью, что и комплекс белка FAST с оригинальным флуорогеном N871b (рис. 3), в то время как комплекс соединения (XI) в аналогичных условиях продемонстрировал заметно большую фотостабильность (рис. 3).

Таким образом, мы показали, что фотостабильность флуоресцентного комплекса белка FAST с флуорогеном N871b можно увеличить с помощью введения циклооктатетраена в молекулу флуорогена. Вероятно, предложенная нами модификация может быть также использована для синтеза и иных флуоресцентных арилен-имидазолоновых красителей, отличающихся высокой фотостабильностью.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование. Спектры ЯМР (δ , м.д.; J , Гц) регистрировали на спектрометре Avance III NMR (700 МГц; Bruker, США) при 303 К в DMSO- d_6 (внутренний стандарт — Me₄Si). Температуры плавления определяли на приборе SMP30 (Stuart Scientific, Великобритания) и не исправляли. Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на приборе micrOTOF II (Bruker, Германия), ионизация электрораспылением.

Общая методика синтеза соединений (X) и (XI). Соединение (V) (137 мг, 0.3 ммоль), соответствующую кислоту (VI) или (IX) (0.66 ммоль), НВТУ (318 мг, 0.84 ммоль) и ДИПЭА (0.21 мл, 1.23 ммоль) суспензировали в ацетонитриле (10 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 ч в инертной атмосфере. Затем реакционную смесь упаривали, продукт очищали с помощью флеш-хроматографии (элюент — хлороформ/метанол 100 : 7). Полученный продукт растворяли в хлороформе (10 мл), к раствору добавляли пирролидин (37 мл, 0.45 ммоль), полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем к смеси добавляли 50 мкл уксусной кислоты, полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 20 мин. Далее реакционную смесь разбавляли хлороформом (20 мл), промывали водным раствором NaH₂PO₄ (30 мл, pH 6.0). Органические вытяжки высушивали над безводным сульфатом натрия и упаривали. Полученный продукт дополнительно очищали с помощью колоночной хроматографии (градиент — хлороформ/метанол от 100 : 3 до 100 : 7).

Методика синтеза исходных соединений, выходы реакций, температуры плавления и спектральные характеристики синтезированных соединений (I–XI) приведены в дополнительных материалах.

Фотообесцвечивание в условиях флуоресцентной микроскопии. Эксперименты проводили на иммортализованной (рак шейки матки человека) клеточной линии HeLa Kyoto (ATCC). Клетки высевали на чашки диаметром 35 мм со стеклянным дном (SPL Life Sciences, Корея), культивирование проводили в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 100 ед./мл пенициллина, 100 ед./мл стрептомицина (ПанЭко, Россия) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ПанЭко, Россия). Перед трансфекцией проводили визуальную оценку конfluence, трансфекцию проводили при ее достижении 80% от максимальной. Для трансфекции клеточную среду заменяли на 500 мкл Opti-MEM (Gibco, США), через 2 ч к сре-

де добавляли 500 мкл Opti-MEM, содержащей смесь из 3.75 мкл агента Трансфектин (Bio-Rad, США) и 1.5 мкг плазмиды, кодирующей ген белка FAST, слитого с белком цитоскелета виментином (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33336838/>). Через 4–6 ч среду заменяли на DMEM с добавлением пенициллина-стрептомицина и эмбриональной телячьей сыворотки в вышеуказанных концентрациях. На следующий день после трансфекции среду заменяли на раствор Хэнкса с добавлением 20 мМ HEPES. Соединения (X) и (XI) добавляли к клеткам HeLa Kyoto в концентрации 10 мкМ, соединение N871b – в концентрации 5 мкМ (соединения разводили из 1 мМ стокового раствора в ДМСО (ПанЭко, Россия), после чего проводили съемку на конфокальном микроскопе DM IRE2 (Leica, Германия), оборудованном иммерсионным масляным объективом HCX PL APO Lbd.BL 63 × 1.40 и гелий-неоновым (HeNe) лазером (543 нм). В клетках, экспрессирующих конструкцию виментин-FAST, выбирали области интереса размером 7.5 × 7.5 мкм, которые непрерывно сканировали HeNe-лазером (100%) в течение 175 с (2 мин 55 с) ($n = 9–10$ клеток). Полученные изображения обрабатывали и анализировали в программе Fiji ImageJ. Графики, демонстрирующие кривые фотообесцвечивания флуоресцентного сигнала, были получены в OriginPro8.1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированы два новых производных флуорогена N871b, содержащих циклооктатетраен. Установлено, что новые соединения формируют флуоресцентные комплексы с флуороген-активирующим белком FAST при окрашивании живых клеток в условиях конфокальной микроскопии. Показано, что при длительном облучении соединение (XI) демонстрирует большую фотостабильность в сравнении с оригинальным флуорогеном N871b. В связи с чем актуальным направлением для дальнейших исследований представляется изучение влияния циклооктатетраена на фотостабильность других арилиден-имидазолновых флуоресцентных красителей.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-73-10105).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Isselstein M., Zhang L., Glembockyte V., Brix O., Cosa G., Tinnefeld P., Cordes T.* // *J. Phys. Chem. Lett.* 2020. V. 11. P. 4462–4480. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.9b03833>
2. *Van der Velde J.H.M., Uusitalo J.J., Ugen L.-J., Warsza-wik E., Herrmann A., Marrink S.J., Cordes T.* // *Faraday Discuss.* 2015. V. 184. P. 221–235. <https://doi.org/10.1039/c5fd00114e>
3. *Altman R., Zheng Q., Zhou Z., Terry D.S., Warren J.D., Blanchard S.C.* // *Nat. Methods.* 2012. V. 9. P. 428–429. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1988>
4. *Zheng Q., Jockusch S., Zhou Z., Altman R.B., Warren J.D., Turro N.J., Blanchard S.C.* // *J. Phys. Chem. Lett.* 2012. V. 3. P. 2200–2203. <https://doi.org/10.1021/jz300670p>
5. *Pati A.K., El Bakouri O., Jockusch S., Zhou Z., Altman R.B., Fitzgerald G.A., Asher W.B., Terry D.S., Borgia A., Holsey M.D., Batchelder J.E., Abeywickrama C., Huddle B., Rufa D., Javitch J.A., Ottosson H., Blanchard S.C.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020. V. 117. P. 24305–24315. <https://doi.org/10.1073/pnas.2006517117>
6. *Zheng Q., Jockusch S., Zhou Z., Altman R.B., Zhao H., Asher W., Holsey M., Mathiasen S., Geggier P., Javitch J.A., Blanchard S.C.* // *Chem. Sci.* 2017. V. 8. P. 755–762. <https://doi.org/10.1039/C6SC02976K>
7. *Yang Z., Li L., Ling J., Liu T., Huang X., Ying Y., Zhao Y., Zhao Y., Lei K., Chen L., Chen Z.* // *Chem. Sci.* 2020. V. 11. P. 8506–8516. <https://doi.org/10.1039/d0sc02837a>
8. *Altman R., Terry D., Zhou Z., Zheng Q., Geggier P., Kolster R.A., Zhao Y., Javitch J.A., Warren J.D., Blanchard S.C.* // *Nat. Methods.* 2012. V. 9. P. 68–71. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1774>
9. *Povarova N.V., Zaitseva S.O., Baleeva N.S., Smirnov A.Y., Myasnyanko I.N., Zagudaylova M.B., Bozhanova N.G., Gorbachev D.A., Malyshevskaya K.K., Gavrikov A.S., Mishin A.S., Baranov M.S.* // *Chem. A Eur. J.* 2019. V. 25. P. 9592–9596. <https://doi.org/10.1002/chem.201901151>
10. *Mineev K.S., Goncharuk S.A., Goncharuk M.V., Povarova N.V., Sokolov A.I., Baleeva N.S., Smirnov A.Y., Myasnyanko I.N., Ruchkin D.A., Bukhdruker S., Remeeva A., Mishin A., Borshchevskiy V., Gordeliy V., Arseniev A.S., Gorbachev D.A., Gavrikov A.S., Mishin A.S., Baranov M.S.* // *Chem. Sci.* 2021. V. 12. P. 6719–6725. <https://doi.org/10.1039/d1sc01454d>

CycloOctaTetraene as Photostabilizer of Fast Protein Fluorogen

A. I. Sokolov^{*, **}, A. A. Gorshkova^{*}, N. S. Baleeva^{*, **, #}, and M. S. Baranov^{*, **}

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

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

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

We report two new analogues of fluorogen N871b containing a CycloOctaTetraene. We studied the photostability of fluorescent complex of the FAST with new compounds by live cell confocal microscopy. One of the new analogues exhibits better photostability in complex with FAST than the previously published fluorogen N871b. The obtained results indicate that cyclooctatetraene is highly promising for the modification of dyes based on arylidene imidazolones.

Keywords: imidazolones, fluorogens, fluorescence-activating proteins, fluorescence, triplet-state quenchers



УДК 547.782

КЕТОПРОИЗВОДНЫЕ АРИЛИДЕН-ИМИДАЗОЛОНОВ КАК ФЛУОРОГЕННЫЕ КРАСИТЕЛИ¹

© 2022 г. А. И. Соколов*, **, А. А. Горшкова*, Н. С. Балеева*, **, #, М. С. Баранов*, **

*ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10**Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова,
Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Поступила в редакцию 12.04.2022 г.

После доработки 22.04.2022 г.

Принята к публикации 24.04.2022 г.

Синтезированы четыре (*Z*)-2-ацетил-4-бензилиден-1-метил-1*H*-имидазол-5(4*H*)-она, характеризующиеся значительным варьированием интенсивности флуоресценции в различных средах. Установлено, что введение 2-ацетильной группы позволяет значительно сместить положение спектральных максимумов в длинноволновую область. Показано, что полученные кетопроизводные арилиден-имидазолонов могут использоваться для окрашивания эндоплазматического ретикулаума во флуоресцентной микроскопии.

Ключевые слова: арилиден-имидазолы, эндоплазматический ретикулум, флуоресценция

DOI: 10.31857/S0132342322060240

ВВЕДЕНИЕ

Флуоресцентные белки – самый распространенный тип генетически кодируемых флуоресцентных меток. Такие белки способны автокаталитически из собственных аминокислотных остатков формировать внутренние ароматические структуры – хромофоры, которые представляют собой различные арилиден-имидазолы. На сегодняшний день во флуоресцентной микроскопии применяется множество разноцветных флуоресцентных белков, имеющих хромофоры разного строения [1]. Среди них отдельное место занимают белки, содержащие в своем составе хромофоры с ацильной группой во втором положении имидазольного цикла, например, белок AsFP [2]. Наличие такой группы обуславливает значительное батохромное смещение максимумов поглощения и эмиссии этих белков.

Известно, что арилиден-имидазолы в свободном от белка виде флуоресцируют крайне слабо [3]. Это объясняется возможностью безызлучательного сброса энергии возбуждения из-за подвижности арилиденового фрагмента [4]. Однако благодаря таким свойствам арилиден-имидазоло-

ны можно использовать в качестве флуорогенов красителей, например, для окрашивания белков и нуклеиновых кислот, а также отдельных клеточных органелл [5–9].

Ранее было показано, что некоторым арилиден-имидазолам свойственно заметное варьирование интенсивности флуоресценции в разных средах [10–13]. Такое свойство позволило применять эти соединения в роли своего рода флуоресцентных “сенсоров полярности” и использовать для окрашивания эндоплазматического ретикулаума и других органелл. Было установлено, что к подобной группе относятся арилиден-имидазолы, имеющие одновременно два электронно-донорных заместителя в *мета*- и *орто*-положениях арилиденового фрагмента (схема 1, соединения (I)) [11, 14, 15]. Позднее мы показали, что введение во второе положение имидазольного цикла этих соединений стирольных заместителей позволяет сохранить такое варьирование [14, 15]. Введение стирольных групп – важная модификация в химии красителей, которая позволяет увеличить размер π-системы и, как следствие, приводит к батохромному сдвигу спектральных максимумов. Подобные красители особо востребованы во флуоресцентной микроскопии, т.к. длинноволновое излучение наименее токсично для живых тканей.

¹ Дополнительные материалы к этой статье доступны по doi 10.31857/S0132342322060240 для авторизованных пользователей.

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

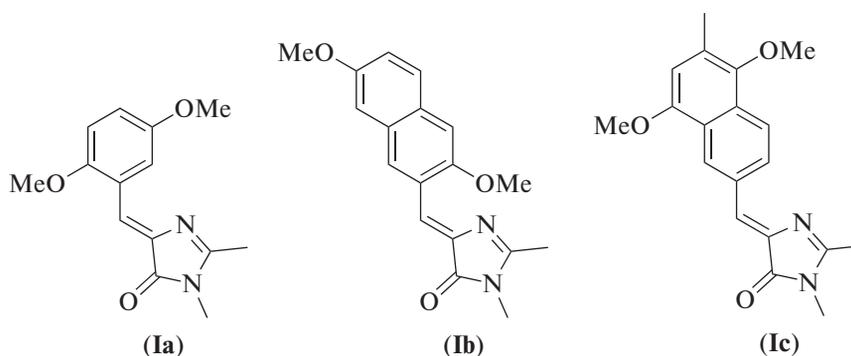


Схема 1. Структура соединений (I).

В настоящей работе изучено влияние другой модификации, которая может привести к смещению максимумов поглощения и испускания в длинноволновую область. Проведенные нами ранее исследования показали, что введение кетогруппы во второе положение имидазолонового кольца разных арилиден-имидазолонов часто приводит к bathochromному сдвигу спектральных максимумов на 50–100 нм [16, 17]. Поэтому целью данной работы стали синтез кетопроизводных арилиден-имидазолонов (I) и изучение влияния кетогруппы в структуре на оптические свойства этих красителей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первой стадии синтеза из различных ароматических альдегидов (II) были получены соответствующие арилимины, из которых без дополнительной очистки с помощью [3+2]циклоприсоединения были синтезированы арилиден-имидазолоны (III) (схема 2). Затем арилиден-имидазолоны (III) под действием диоксида селена были окислены до соответствующих кетопроизводных (IV) (схема 2).

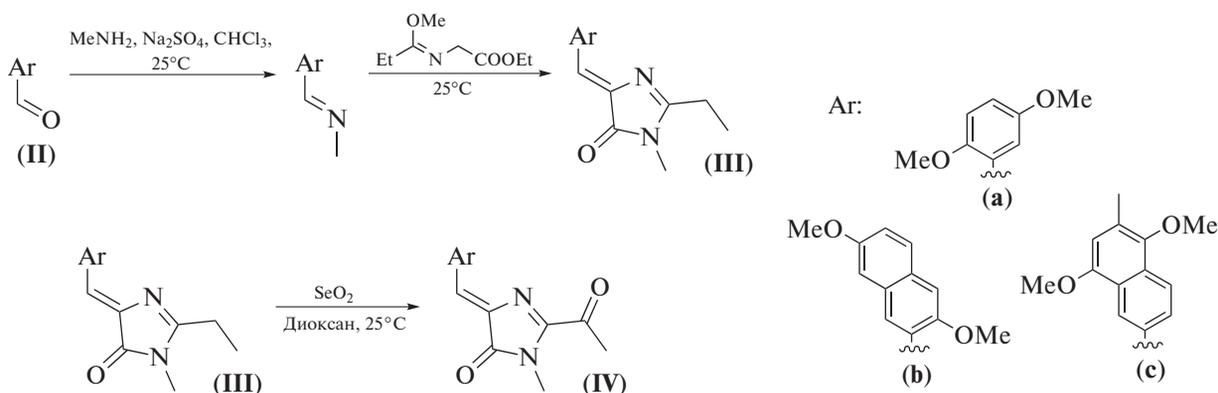


Схема 2. Синтез соединений (III) и (IV).

На следующем этапе работы были изучены оптические свойства полученных кетонов (IV). Установлено, что максимумы абсорбции находятся в области 410–450 нм, а максимумы эмиссии – в области 560–630 нм (табл. 1). Сравнение этих результатов с данными, известными для соединений (I), показывает, что введение кетогруппы приводит к bathochromному сдвигу максимумов на 50–100 нм (отмечено на рис. 1 стрелками) и заметному увеличению стоксового сдвига (разница между максимумами эмиссии и абсорбции) (рис. 1). Выбранная нами модификация также привела к небольшому снижению интенсивности флуоресценции. Так, квантовый выход флуоресценции кетонов (IV) в диоксане составляет 1.2–4.2%, в то

время как соединения (I) флуоресцируют в этом растворителе с квантовым выходом 6–40% [14, 15]. Однако новые производные (IV), так же как и соединения (I), характеризовались выраженным варьированием величины квантового выхода (табл. 1), что говорит о перспективности их использования в роли “сенсоров полярности” для живых систем.

В связи с тем, что квантовый выход соединений (IV) варьируется, на заключительном этапе данной работы мы решили исследовать возможность их использования для окрашивания клеточных культур. Было установлено, что при добавлении растворов кетонов (IV) к клеткам линии

Таблица 1. Оптические свойства соединений (IV) в разных растворителях

Соединение		MeOH	CH ₃ CN	EtOAc	Диоксан
(IVa)	Максимум поглощения, нм	447	444	444	444
	Коэффициент экстинкции, М ⁻¹ см ⁻¹	18000	20500	20500	20500
	Максимум эмиссии, нм	599	603	570	561
	Квантовый выход флуоресценции, %	<0.5	1.9	2.9	3.2
(IVb)	Максимум поглощения, нм	412	413	415	416
	Коэффициент экстинкции, М ⁻¹ см ⁻¹	25500	27500	27500	27000
	Максимум эмиссии, нм	~600	~570	623	612
	Квантовый выход флуоресценции, %	<0.5	<0.5	0.7	1.2
(IVc)	Максимум поглощения, нм	449	448	449	446
	Коэффициент экстинкции, М ⁻¹ см ⁻¹	–	14500	15500	15000
	Максимум эмиссии, нм	~620	~630	620	590
	Квантовый выход флуоресценции, %	<0.5	<0.5	1.2	4.2

Примечание: прочерк – соединение плохо растворимо в данном растворителе.

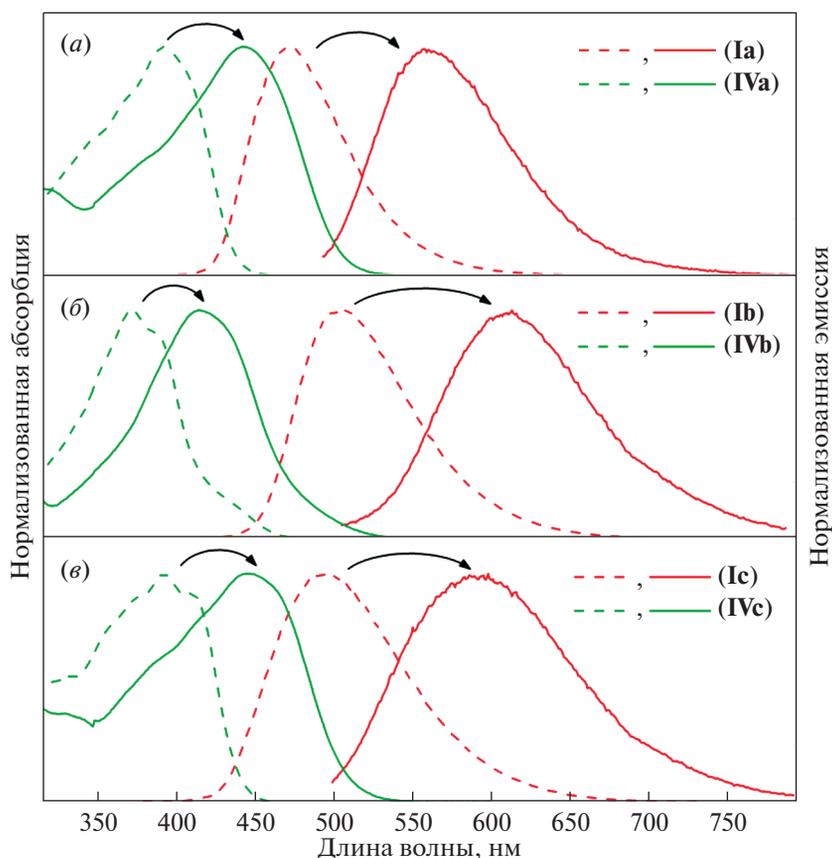


Рис. 1. Спектры поглощения (зеленый) и эмиссии (красный) соединений (I) (пунктир) и кетопроизводных (IV) (сплошная) в диоксане; (а) – соединения (Ia) и (IVa), (б) – соединения (Ib) и (IVb), (в) – соединения (Ic) и (IVc).

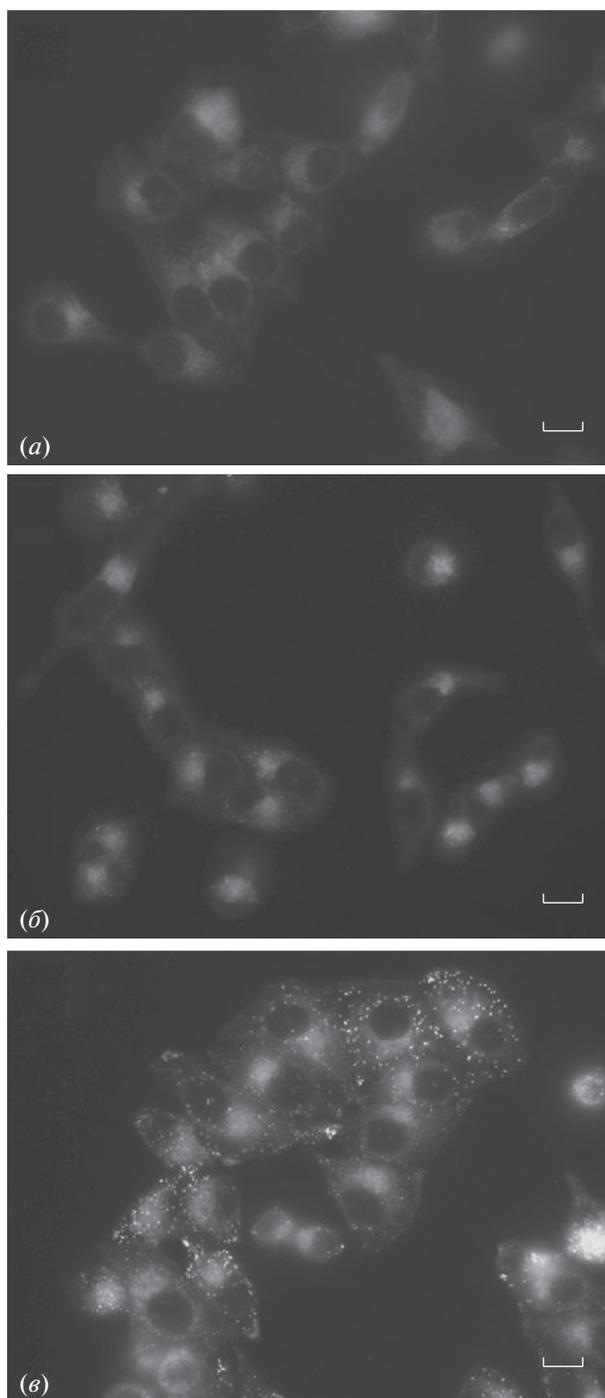


Рис. 2. Окрашивание эндоплазматического ретикулума кетопроизводными (**IV**) в живых клетках линии HeLa Kyoto; (а) – соединение (**IVa**), (б) – соединение (**IVb**), (в) – соединение (**IVc**). Конечная концентрация соединений – 10 мкМ. Масштабный отрезок – 10 мкм.

HeLa Kyoto в конечной концентрации 10 мкМ появляется выраженная флуоресценция, ассоциированная со структурами эндоплазматического ретикулума (рис. 2). Наиболее яркая флуоресценция наблюдалась для производного (**IVc**), однако

окрашивание в этом случае было наименее селективным, т.к. помимо флуоресценции структур эндоплазматического ретикулума наблюдалось формирование ярких флуоресцентных капель, вызванное вероятной агрегацией красителя. Аналогичным поведением характеризовалось производное (**IVb**), хотя формирование агрегатов в этом случае было менее выражено. Вероятно, наличие нафталинового фрагмента в структуре этих двух соединений снижает их растворимость в воде и облегчает формирование агрегатов. Наилучший же результат был достигнут для производного (**IVa**), имеющего наименьший размер.

Таким образом, мы установили, что кетоны (**IV**), как и арилиден-имидазолы (**I**), способны окрашивать эндоплазматический ретикулум и могут найти свое применение во флуоресцентной микроскопии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование. Спектры ЯМР (δ , м.д.; J , Гц) регистрировали на приборах Bruker Fourier 300 (300 МГц; Bruker, США), Bruker Avance III NMR (700 МГц; Bruker, США) и Bruker Avance III NMR (800 МГц; Bruker, США), оснащенных 5-мм криодатчиком TXI, в $DMSO-d_6$ и $CDCl_3$ (внутренний стандарт – Me_4Si). Спектры поглощения в УФ- и видимом диапазоне регистрировали на спектрофотометре Varian Cary 100 Bio (Varian, США), спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (Varian, США). Температуры плавления определяли на приборе SMP30 (Stuart Scientific, Великобритания) и не исправляли. Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на приборе TripleTOF 5600⁺ (AB Sciex, США) с ионизацией методом электроспрея (ESI). Напряжение на капилляре 5.5 кВ в режиме регистрации положительных ионов, 4.5 кВ в режиме регистрации отрицательных ионов. Поток газ-носителя – 15 Arb, газа-распылителя – 25 Arb. Пробы вводили с помощью шприцевого насоса со скоростью потока 20 мкл/мин.

Синтез 2-этил-1-метил-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов (II**).** К раствору ароматического альдегида (5 ммоль, 1 экв.) в хлороформе (50 мл) добавляли 40%-ный водный раствор метиламина (2.2 мл, 25 ммоль, 5 экв.), после чего в колбу вносили безводный сульфат натрия до исчезновения водного слоя в реакционной смеси. Колбу закрывали пробкой и выдерживали при комнатной температуре в течение 96 ч. Далее суспензию отфильтровывали и сушили над безводным сульфатом натрия. Сушитель отфильтровывали, а раствор упаривали при пониженном давлении. К остатку после упаривания добавляли карбоксиимидат (1.13 г, 6.5 ммоль, 1.3 экв.). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение

ние 96 ч. Целевой продукт выделяли и очищали методом флеш-хроматографии (элюент – хлороформ и этанол, 100 : 3).

Синтез 2-этил-1-метил-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов (III). К раствору 2-этил-1-метил-1*H*-имидазол-5(4*H*)-она (0.4 ммоль, 1 экв.) в диоксане (8 мл) добавляли диоксид селена(IV) (88 мг, 0.8 ммоль, 2 экв.). Полученную смесь выдерживали в масляной бане при 100°C в течение 30 мин. Затем смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли этилацетатом (80 мл) и переносили в делительную воронку, где смесь последовательно промывали насыщенным раствором карбоната калия (100 мл) и насыщенным раствором хлорида калия (3 × 100 мл). Органическую фазу отделяли, сушили над безводным сульфатом натрия. Осушитель отфильтровывали, а раствор упаривали при пониженном давлении. Целевые соединения выделяли из остатка после упаривания с помощью флеш-хроматографии (элюент – этилацетат и гексан, 1 : 2).

Выходы реакций, температуры плавления и спектральные характеристики синтезированных соединений (II) и (III) приведены в дополнительных материалах.

Флуоресцентная микроскопия. Скрининг соединений проводили с использованием живых клеточных культур HeLa Kyoto (ATCC). Соединения добавляли к клеткам HeLa Kyoto в концентрациях 1–10 мкМ (соединения разводили из 1 мМ стокового раствора в DMSO). Изображения получали на инвертированном широкопольном флуоресцентном микроскопе BZ-9000 (Keyence, Япония) с объективом Nikon Plan Apo 60× 1.40 Oil (Nikon, США) и набором светофильтров Keyence GFP-B EX 470/40 DM 495 BA 535/50.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированы четыре кетопроизводных арилиден-имидазолонов. Установлено, что введение кетогруппы не приводит к существенным изменениям оптических свойств, и для всех новых соединений, как и для оригинальных арилиден-имидазолонов, характерно варьирование величины квантового выхода флуоресценции при замене растворителя. Продемонстрировано, что синтезированные кетоны перспективны в качестве красителей во флуоресцентной микроскопии, т.к. они способны окрашивать эндоплазматический ретикулум.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации № МК-4173.2022.1.3.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // *Physiol. Rev.* 2010. V. 90. P. 1103–1163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2009>
2. Yampolsky I.V., Remington S.J., Martynov V.I., Potapov V.K., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // *Biochemistry.* 2005. V. 44. P. 5788–5793. <https://doi.org/10.1021/bi0476432>
3. Deng H., Zhu X. // *Mater. Chem. Front.* 2017. V. 1. P. 619–629. <https://doi.org/10.1039/C6QM00148C>
4. Baranov M.S., Lukyanov K.A., Borissova A.O., Shamir J., Kosenkov D., Slipchenko L.V., Tolbert L.M., Yampolsky I.V., Solntsev K.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. V. 134. P. 6025–6032. <https://doi.org/10.1021/ja3010144>
5. Plamont M.A., Billon-Denis E., Maurin S., Gauron C., Pimenta F.M., Specht C.G., Shi J., Quéraud J., Pan B., Rossignol J., Moncoq K., Morellet N., Volovitch M., Le-scop E., Chen Y., Triller A., Vriz S., Le Saux T., Jullien L., Gautier A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. P. 497–502. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513094113>
6. Bozhanova N.G., Baranov M.S., Klementieva N.V., Sarkisyan K.S., Gavrikov A.S., Yampolsky I.V., Zagaynova E.V., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A., Mishin A.S. // *Chem. Sci.* 2017. V. 8. P. 7138–7142. <https://doi.org/10.1039/C7SC01628J>
7. Paige J.S., Wu K.Y., Jaffrey S.R. // *Science.* 2011. V. 333. P. 642–646. <https://doi.org/10.1126/science.1207339>
8. Filonov G.S., Moon J.D., Svensen N., Jaffrey S.R. // *J. Am. Chem. Soc.* 2014. V. 136. P. 16299–308. <https://doi.org/10.1021/ja508478x>
9. Collot M., Kreder R., Tatarets A.L., Patsenker L.D., Mellya Y., Klymchenko A.S. // *Chem. Commun.* 2015. V. 51. P. 17136–17139. <https://doi.org/10.1039/C5CC06094J>
10. Chuang W.-T., Hsieh C.-C., Lai C.-H., Lai C.-H., Shih C.-W., Chen K.-Y., Hung W.-Y., Hsu Y.-H., Chou P.-T. // *J. Org. Chem.* 2011. V. 76. P. 8189–8202. <https://doi.org/10.1021/jo2012384>
11. Deng H., Yu C., Gong L., Zhu X. // *J. Phys. Chem. Lett.* 2016. V. 7. P. 2935–2944. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.6b01251>
12. Ermakova Y.G., Sen T., Bogdanova Y.A., Smirnov A.Y., Baleeva N.S., Krylov A.I., Baranov M.S. // *J. Phys. Chem. Lett.* 2018. V. 9. P. 1958–1963. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.8b00512>

13. Ermakova Y.G., Bogdanova Y.A., Baleeva N.S., Zaitseva S.O., Guglya E.B., Smirnov A.Y., Zagudaylova M.B., Baranov M.S. // *Dye Pigment*. 2019. V. 170. P. 107550. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107550>
14. Smirnov A.Y., Perfilov M.M., Zaitseva E.R., Zagudaylova M.B., Zaitseva S.O., Mishin A.S., Baranov M.S. // *Dye Pigment*. 2020. V. 177. P. 108258. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108258>
15. Perfilov M.M., Zaitseva E.R., Smirnov A.Y., Mikhaylov A.A., Baleeva N.S., Myasnyanko I.N., Mishin A.S., Baranov M.S. // *Dye Pigment*. 2022. V. 198. P. 110033. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.110033>
16. Sokolov A.I., Myasnyanko I.N., Baleeva N.S., Baranov M.S. // *ChemistrySelect*. 2020. V. 5. 7000–7003. <https://doi.org/10.1002/slct.202001782>
17. Zaitseva E.R., Smirnov A.Y., Myasnyanko I.N., Sokolov A.I., Baranov M.S. // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2020. V. 56. P. 116–119. <https://doi.org/10.1007/s10593-020-02634-3>

Keto-Analogues Arylidene-Imidazolones as Fluorogenic Dyes

A. I. Sokolov^{*, **}, A. A. Gorshkova^{*}, N. S. Baleeva^{*, **, #}, and M. S. Baranov^{*, **}

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

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

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

We report a series of (*Z*)-2-acetyl-4-benzyliden-1-methyl-1*H*-imidazol-5(4*H*)-ones with a pronounced solvent-dependent intensity of fluorescence variation. The introduction of the 2-acetyl group allows to shift the absorption and emission maxima to the long-wavelength region. We showed that these compounds can be used for staining of the endoplasmic reticulum in the fluorescent microscopy.

Keywords: arylidene-imidazolones, endoplasmic reticulum, fluorescence