

ISSN 0132-3423

Том 49, Номер 5

Сентябрь - Октябрь 2023



# БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ



[www.sciencejournals.ru](http://www.sciencejournals.ru)



# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

## Том 49, номер 5, 2023

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.

---

---

Конденсаты нуклеопротеина SARS-CoV-2 на вирусной РНК и их низкомолекулярные модуляторы (обзорная статья)

*Ю. И. Светлова, Ю. И. Павлова, А. В. Аралов, А. М. Варижук* 443

Аминокислотные производные фуллерена C<sub>60</sub>: синтез и биомедицинское применение (обзорная статья)

*О. В. Ямскова, Д. В. Курилов, В. А. Волков, М. В. Воронков, И. В. Заварзин* 455

Динамика изменений запасных липидов при восстановлении частично обесцвеченного коралла *Sinularia heterospiculata*

*Т. В. Сикорская, Д. Д. Солодий, Е. В. Маськин* 488

Новый комплекс рибозима с глюкозо-6-фосфатизомеразной активностью и фермента гексокиназы в пекарских дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*

*О. Н. Соловьева* 494

Белковый профиль и аллергенные свойства тропомиозина и других алергокомпонентов в составе водно-солевого экстракта гигантской тигровой креветки (*Penaeus monodon*)

*В. М. Бержец, Г. И. Алаторцева, Л. Н. Нестеренко, С. В. Хлгатын, С. Ю. Петрова, Н. С. Петрова, А. В. Васильева, Л. А. Пищулина, О. Ю. Емельянова* 502

Синтетические трансформации высших терпеноидов. 42. Синтез новых производных 18-нор-4-(карбоксиил)изопимара-7,15-диена и изучение их цитотоксичности на линиях опухолевых клеток MCF7, U-87 MG и DU 145

*М. А. Громова, Ю. В. Харитонов, Т. В. Рыбалова, В. А. Ларионов, Т. С. Голубева, Э. Э. Шульц* 509

Индукция активности антиоксидантной системы соединениями селена в мицелии *Aspergillus niger*

*П. А. Полубояринов, А. В. Кузнецова, И. Я. Моисеева, Н. И. Микуляк, А. П. Каплун* 523

---

## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

Биологический микрочип для определения соматических мутаций в генах изоцитратдегидрогеназ 1 и 2

*В. О. Варачев, Д. А. Гуськов, А. П. Шехтман, Д. В. Рогожин, С. А. Поляков, А. В. Чудинов, А. С. Заседателев, Т. В. Наседкина* 537

Видовая идентификация коронавируса SARS-CoV-2 по консервативному участку E-гена

*С. А. Лапа, А. А. Шингарева, Е. Б. Файзулов, Ю. И. Аммура, В. Е. Шершов, А. В. Чудинов* 543

Альтернативные центры связывания хромофора в нековалентных флуоресцентных комплексах бактериального липокалина

*Е. А. Горячева, И. В. Артемьев, С. Ф. Архипова, А. В. Россохин, А. Р. Гильванов, В. З. Плетнев, Н. В. Плетнева* 548

---

---





УДК 578.22

## КОНДЕНСАТЫ НУКЛЕОПРОТЕИНА SARS-CoV-2 НА ВИРУСНОЙ РНК И ИХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ МОДУЛЯТОРЫ

© 2023 г. Ю. И. Светлова\*, Ю. И. Павлова\*, \*\*, А. В. Аралов\*\*\*, А. М. Варижук\*, \*\*, #

\*ФГБУ “Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины”  
Федерального медико-биологического агентства,  
Россия, 119435 Москва, ул. Малая Пироговская, 1а

\*\*ФГАОУ ВО “Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)”,  
Россия, 141701, Долгопрудный, Институтский переулок, 9

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

Поступила в редакцию 16.11.2022 г.

После доработки 24.11.2022 г.

Принята к публикации 25.11.2022 г.

Феномен разделения фаз “жидкость—жидкость” (LLPS) описан для ряда биополимеров и достаточно полно изучен на примере нескольких белков с неструктурированными фрагментами. К ним относится нуклеокапсидный белок (N-белок) коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома 2. В данном обзоре проанализированы закономерности формирования конденсатов N-белка в присутствии вирусной РНК. Основное внимание уделено типам транзитных контактов внутри конденсатов и фрагментам N-белок/РНК, участвующим в формировании таких контактов; обобщены современные представления о роли конденсатов в жизненном цикле вируса и их влиянии на защитные свойства клетки-хозяина. В заключительной части обзора рассмотрена возможность регуляции формирования вирусных конденсатов с помощью низкомолекулярных соединений — эндогенных и экзогенных модуляторов разделения фаз, что может стать основой нового направления дизайна противовирусных терапевтических агентов.

*Ключевые слова:* разделение фаз, конденсаты, N-белок, SARS-CoV-2, вирусная РНК, низкомолекулярные противовирусные агенты

DOI: 10.31857/S0132342323050081, EDN: BKSUBV

### СОДЕРЖАНИЕ

|   |     |
|---|-----|
| ВВЕДЕНИЕ .....  | 443 |
| РАЗДЕЛЕНИЕ ФАЗ N-БЕЛКА И РНК SARS-CoV-2 <i>in vitro</i> ..... | 444 |
| ПРЕДПОЛАГАЕМАЯ РОЛЬ КОНДЕНСАТОВ N-БЕЛКА В КЛЕТКЕ .....        | 447 |

|   |     |
|---|-----|
| МОДУЛЯТОРЫ КОНДЕНСАТОВ N-БЕЛКА И РНК SARS-CoV-2 ..... | 449 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....                                      | 451 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....                               | 451 |

### ВВЕДЕНИЕ

COVID-19 внесла заметный вклад в социально-экономические потери последних лет. Вирус SARS-CoV-2 продолжает циркулировать в российской популяции, несмотря на программы массовой вакцинации. Активно ведется разработка противовирусных агентов — блокаторов заражения, ингибиторов репликации SARS-CoV-2, индукторов летального мутагенеза и др. [1]. Помимо конвенциональных вирусных мишеней, таких как поверхностные гликопротеины [2], химотрипсин-подобная протеаза [3] или РНК-зависимая РНК-полимераза [4], внимание исследователей все чаще привлекает нуклеокапсидный белок, обеспечивающий упаковку вирусного генома (N-белок) [5]. Упаковка соответствует модели

Сокращения: COVID-19 — коронавирусная инфекция 2019 года; CVL218 — 5-фтор-2-[4-(метиламинометил)фенил]-1-бензофуран-7-карбоксамид (мефупариб); DD — димеризационный домен; G3BP1/2 — белки, связывающие Ras-ГТФаза-активирующий белок; EC<sub>50</sub> — полумаксимальная эффективная концентрация; EGCG — эпигаллокатехин-3-галлат; GCG — галлокатехин-3-галлат; IDR — протяженные неструктурированные участки; LCT — низкая критическая температура; LLPS — разделение фаз “жидкость—жидкость”; MAVS — митохондриальный анти-вирусный сенсор; PJ34 — N-(5,6-дигидро-6-оксо-2-фенантридинил)-2-ацетамид; RBD1 — РНК-связывающий N-концевой домен 1; RBD2 — РНК-связывающий домен 2; SARS-CoV-2 — коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2; SR — фрагмент, богатый остатками серина и аргинина; TRS — сигнал регуляции транскрипции.

# Автор для связи: (тел.: +7 (916) 502-78-32; эл. почта: annavarizhuk@rcpcm.org).

“бусин на нити” и подразумевает наличие множества (~35–40 в случае SARS-CoV-2) морфологически изолированных рибонуклеопротеиновых комплексов на единичной РНК [6].

Исследования в модельных системах показали, что такие комплексы, вероятно, представляют собой продукт созревания биомакромолекулярных конденсатов [7]. Последние формируются по механизму разделения фаз “жидкость–жидкость” (liquid–liquid phase separation, LLPS) [8] подобно стресс-гранулам и иным немембранным органеллам клетки-хозяина [9, 10]. Их стоит отличать от нерастворимых белковых агрегатов (телец включения) [11]. Биологическая роль конденсатов N-белка SARS-CoV-2 не ограничивается инициацией сборки вирусной частицы: они также регулируют репликацию [12] и ряд других процессов, значимых для выживания вируса. Это предполагает возможность разработки терапевтических подходов на основе модуляторов LLPS. Под модуляцией в данном случае стоит понимать изменение динамики разделения фаз или физико-химических характеристик конденсатов.

С 2020 г. было опубликовано множество экспериментальных работ и несколько аналитических обзоров [13–15], посвященных феномену LLPS N-белка SARS-CoV-2. В последнем и наиболее полном обзоре [14] рассмотрены фрагменты N-белка, играющие ключевую роль в стабилизации конденсатов, но не обобщена информация о геномной РНК. В текущем обзоре проанализированы оба компонента, что позволяет выделить более точные детерминанты конденсатов и наметить стратегии рационального дизайна их модуляторов. Кроме того, в текущем обзоре характеристики модельных конденсатов, получаемых в бесклеточных системах, сопоставлены с их предполагаемыми внутриклеточными функциями. В ключевой части обзора рассмотрены известные низкомолекулярные соединения, показавшие LLPS-модулирующую активность в бесклеточных системах *in vitro* или на клеточных линиях.

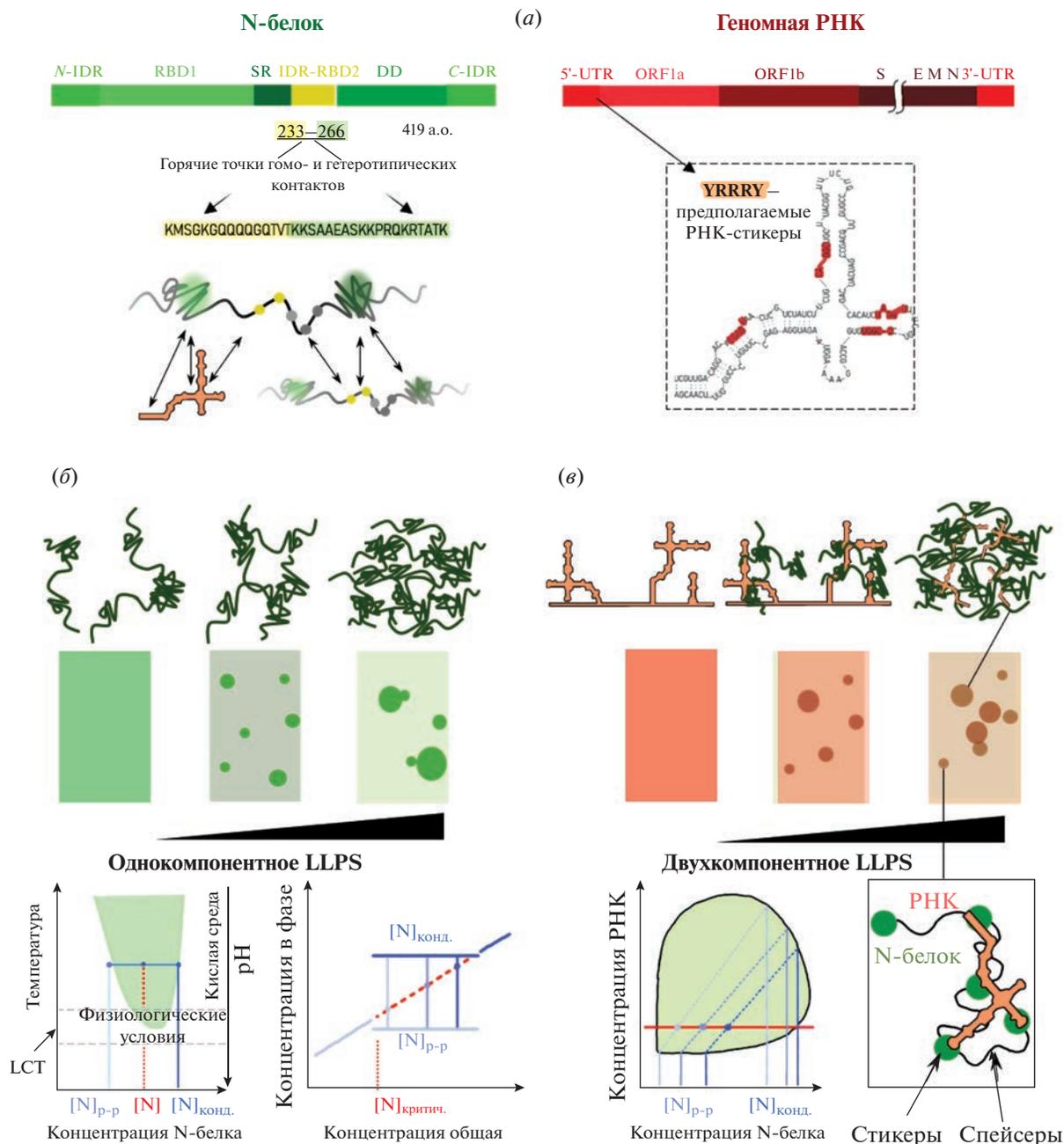
## РАЗДЕЛЕНИЕ ФАЗ N-БЕЛКА И РНК SARS-CoV-2 *in vitro*

Ряд биополимеров (некоторые белки, нуклеиновые кислоты и полисахариды) формирует в водных растворах отдельную, более плотную жидкую фазу. Обособленные скопления биополимеров, морфологически подобные каплям масла в жидкости (биомолекулярные конденсаты), удерживаются гомо- и гетеротипическими нековалентными взаимодействиями, динамичны (внутри них сохраняется диффузия) и способны к слиянию [16, 17]. В общем случае такое разделение фаз (LLPS) реализуется при условии высокого поверхностного натяжения на границе “биополимер–вода” [18]. При физиологических условиях склонность к LLPS

демонстрируют растворы белков с неструктурированными участками (intrinsically disordered regions, IDR) [19]. За счет ассоциации IDR внутри конденсата сосредотачиваются и функциональные (структурированные) домены. Это позволяет направленно активировать биохимические процессы в клетке за счет высокой локальной концентрации ферментов или кофакторов при условии, что они также включаются в конденсаты, или, напротив, временно подавлять функцию белка за счет его изоляции в конденсате [20]. В ряду эукариот выраженный вклад IDR-опосредованной регуляции биохимических процессов и в целом высокое содержание IDR в протеоме характерны для сложных организмов. У простейших и вирусов высокая доля IDR обеспечивает адаптивность при сохранении компактного генома [21]. N-белок SARS-CoV-2 – яркий пример многофункциональных IDR-содержащих белков, вовлеченных в регуляцию функционирования генома и адаптацию вируса к внутриклеточным условиям [14].

Наряду с IDR N-белок содержит два структурированных фрагмента: РНК-связывающий домен 1 (RNA-binding domain 1, RBD1) и C-концевой димеризационный домен (dimerization domain, DD) (рис. 1а). При димеризации белка гомотипические контакты (N-белок–N-белок) обеспечивают экранирование гидрофобной части DD, снижая поверхностное натяжение [22]. В случае нарушения димеризации равновесие смещается в сторону динамичных мультимеров (конденсатов) [23]. Триггером может выступать частичная или полная денатурация DD [24]. Возможность частичной денатурации N-белка объясняет температурную зависимость LLPS, а именно наличие критической температуры (low critical temperature, LCT), ниже которой конденсаты в отсутствие других факторов не образуются (рис. 1б). Примечательно, что определенная в модельных бесклеточных системах LCT N-белка близка к 37°C [24, 25].

Помимо температуры ключевой фактор, влияющий на равновесие мономер–димер–мультимер (конденсат), – общая концентрация N-белка в растворе (рис. 1б). При достижении критической концентрации, варьирующейся по разным оценкам в диапазонах от высокого наномолярного до среднего микромолярного [12, 23], разделение фаз происходит и в отсутствие вирусной РНК. Дальнейшее повышение общей концентрации в системе практически не сказывается на распределении N-белка между основным раствором и конденсатами, но приводит к увеличению количества конденсатов и/или их размера. Подобное поведение типично для разделения фаз в однокомпонентных системах [16]. Более точная имитация вирусных нуклеопротеиновых частиц требует двухкомпонентной модели (N-белок–РНК) (рис. 1в). В таких системах можно выделить



**Рис. 1.** Общие принципы формирования конденсатов N-белка и геномной РНК SARS-CoV-2. (а) – Структурные особенности N-белка и РНК. На левой панели представлена доменная структура N-белка и схематически изображены характерные гомотипические (N-белок–N-белок) и гетеротипические (N-белок–РНК) конденсаты, на правой панели схематически представлены вирусный геном и пример склонного к формированию транзитных контактов с N-белком элемента вторичной структуры геномной РНК (шпилька с несколькими протяженным дуплексными фрагментами и мотивами YRRRY, где Y и R – остатки пиримидинового и пуринового нуклеотидов соответственно) [24, 25]; (б) – конденсаты N-белка. Схематически показано разделение фаз “жидкость–жидкость” (LLPS) в однокомпонентной системе, оно наблюдается при температуре и концентрации N-белка выше критических значений (LCT и  $[N]_{\text{критич.}}$ , соответственно) [24, 25]. Итоговая концентрация белка в растворе ( $[N]_{\text{p-p}}$ ) – ниже исходной (общей) концентрации в системе до LLPS, итоговая концентрация белка в конденсате ( $[N]_{\text{конд.}}$ ) – выше исходной; (в) – конденсаты N-белок–РНК. Схематически показано разделение фаз в двухкомпонентной системе [26]. Итоговые концентрации каждого компонента в растворе и в конденсате зависят от общих концентраций и соотношения компонентов. Стабилизацию конденсатов обеспечивают контакты стикеров белка/РНК, перемежающихся условно инертными гибкими фрагментами – спейсерами.

критические концентрации обоих компонентов [26]. Хотя в широком диапазоне концентраций (от наномолярной до микромолярной) доля конденсатов возрастает с увеличением общего количества каждого компонента, итоговая фазовая диаграмма имеет более сложную форму, которая отражает значимость соотношения N-белок : РНК.

Для понимания роли вирусной РНК в формировании конденсатов N-белка (или, как минимум, снижении критической концентрации N-белка) необходимо рассмотреть специфические и неспецифические взаимодействия N-белок–РНК (рис. 1*б*). Данные о них получены методом, основанным на перекрестной сшивке биополимеров, фрагментации и обратной транскрипции РНК с последующим секвенированием кДНК [27]. Специфическим можно считать узнавание RBD1-доменом N-белка мотивов YRRRY в составе стеблей шпильчатых структур геномной РНК (рис. 1*а*). Мотив YRRRY представляет собой пятизвенный олигонуклеотидный фрагмент, включающий три центральных пуриновых нуклеотидных остатка (R) и фланкирующие их пиримидиновые нуклеотидные остатки (Y) [25]. Примыкающий к RBD1 N-концевой IDR N-белка способен формировать слабые неспецифические контакты с одноцепочечными и, вероятно, двуцепочечными фрагментами РНК [28]. Основное неспецифическое связывание двуцепочечных фрагментов РНК отмечено для центрального IDR N-белка – возможно, при участии примыкающего к нему серин/аргинин-богатого фрагмента (SR) и DD (рис. 1*а*) [24]. На этом основании центральный IDR и фланкирующие его области называют РНК-связывающим доменом 2 (RNA-binding domain 2, RBD2). Предполагается, что взаимодействие IDR с РНК инициирует конформационные изменения DD. Эффект такого взаимодействия аналогичен эффекту частичной термической денатурации DD: экспонирование гидрофобных аминокислотных остатков DD смещает равновесие в сторону динамичных мультимерных ассоциатов [24].

Нуклеопротеиновые конденсаты SARS-CoV-2 в целом соответствуют классической для РНК-белковых систем модели “скаффолд–клиент”. IDR-содержащий “скаффолд” (N-белок) – это основной компонент, а “клиент” (РНК) выполняет регуляторную функцию [29]. Поиск детерминант LLPS традиционно начинают с исследования транзитных взаимодействий скаффолда путем перекрестной сшивки конденсатов с последующей фрагментацией и масс-спектрометрическим анализом фрагментов [7]. Детерминанты LLPS можно определить как уникальное распределение “горячих точек” гомо/гетеротипических контактов (стикеров) среди условно инертных, т.е. не формирующих контакты, фрагментов (спейсеров) (рис. 1*б*) [30]. Последние, хотя и не участвуют в стабилизации конденсатов напрямую, определяют

гидродинамический объем IDR, интерфазу IDR–растворитель и соотношение контактов IDR–IDR против контактов IDR–растворитель. Если следовать теории гомополимеров, часть положений которой справедлива для небольших IDR-содержащих белков, ключевой для LLPS параметр спейсеров – это соотношение разветвленных и неразветвленных аминокислот [31]. Оно определяет гибкость спейсеров, вероятность контактов между стикерами и общий гидродинамический объем молекулы. Гибкость спейсеров и доступность стикеров регулируются на уровне посттрансляционных модификаций белка. В случае SARS-CoV-2 основной модификацией выступает фосфорилирование сериновых остатков в N-IDR, центральном IDR и фланкирующем его SR [32, 33].

Ключевые стикеры N-белка SARS-CoV-2 сосредоточены в центральном IDR [7]. По-видимому, это положительно заряженные и ароматические аминокислотные остатки, участвующие, соответственно, в электростатических гетеротипических (N-белок–РНК взаимодействиях) и гомотипических (N-белок–N-белок) взаимодействиях типа “ $\pi$ -катион” [34] и “ $\pi$ - $\pi$ ” [35]. Вероятные стикеры – положительно заряженные и ароматические аминокислотные остатки фланкирующих центральный IDR SR и DD (стикеры последнего скрыты в структурированном DD в составе димера N-белка) [7, 36]. Помимо отдельных аминокислотных остатков внутри IDR, к стикерам с долей условности можно отнести оба домена N-белка, поскольку наряду с транзитным неспецифическим связыванием через случайные контакты “ $\pi$ -катион” и “ $\pi$ - $\pi$ ” в составе конденсатов реализуется специфическое связывание RBD1–РНК, и не исключено частичное сохранение димеризации за счет структурированного DD. Дополнительные контакты N-белок–N-белок могут реализовываться за счет транзитных спиральных структур в центральном IDR. Характерная для ряда поздних вариантов SARS-CoV-2 мутация в центральном IDR (G215C) повышает устойчивость таких спиралей и вероятность контактов N-белок–N-белок (по-видимому, за счет дисульфидных связей). Показано, что эта мутация способствует LLPS [37]. Таким образом, хотя первостепенно наличие IDR, структурированные фрагменты, обеспечивающие мультивалентность скаффолда, благоприятствуют образованию конденсатов.

Пассивная роль, традиционно отводимая РНК в модели “скаффолд–клиент”, не соответствует действительности, если принять тезис о специфичности стикеров RBD1 к шпилькам и мотивам YRRRY в РНК [24]. Распределение таких мотивов в геноме вируса определяет положение конденсатов на молекуле РНК [7].

Как и большинство “клиентов”, РНК регулирует чувствительность конденсатов к внешним

условиям (стимулам) [28]. Внешние условия (рН и концентрация солей) определяют сравнительную значимость контактов N-белок–N-белок и N-белок–РНК [38]. Низкая ионная сила раствора повышает вклад электростатических взаимодействий (гетеротипических контактов положительно заряженных сахарофосфатным остовом РНК) и снижает вклад гидрофобных взаимодействий (гомотипических контактов DD). При этом может увеличиваться и вклад взаимного отталкивания между молекулами РНК в конденсате. Электростатические гетеротипические взаимодействия N-белок–РНК существенны для LLPS в слабнокислой и нейтральной средах. При дальнейшем повышении рН часть основных аминокислот N-белка депротонируется (теоретическая  $pI$  10.07 [39]), и возрастает роль гомотипических взаимодействий гидрофобных участков. Обобщая результаты физико-химических исследований разделения фаз N-белок–РНК SARS-CoV-2 в модельных системах, можно отметить максимум разделения фаз в слабнокислой среде с пониженной концентрацией солей при повышенной (>37°C) температуре. Конденсаты с оптимизированным соотношением N-белок : РНК устойчивы и в физиологических условиях [21, 22].

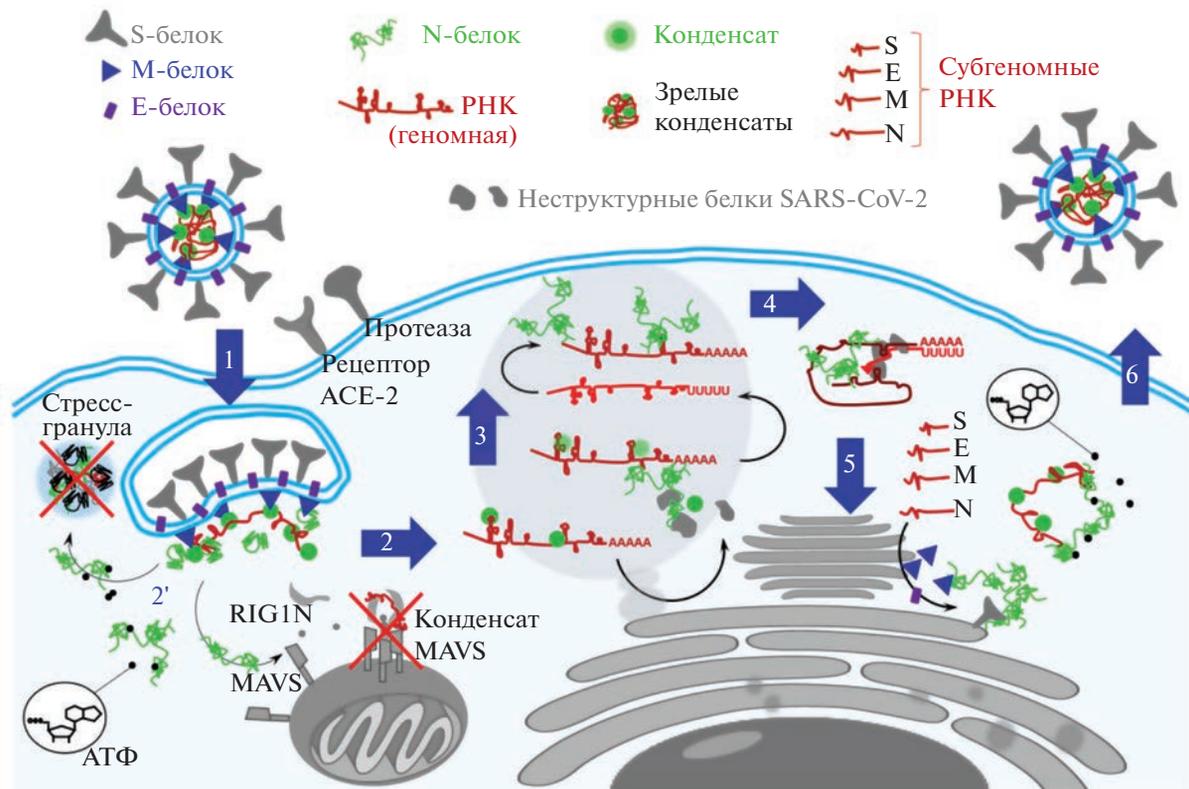
#### ПРЕДПОЛАГАЕМАЯ РОЛЬ КОНДЕНСАТОВ N-БЕЛКА В КЛЕТКЕ

Роль конденсатов N-белок–РНК проявляется на различных этапах жизненного цикла вируса – от упаковки/распаковки до репликации генома и трансляции субгеномных РНК (рис. 2). Изначально распаковка нуклеокапсида обеспечивается LLPS-модулирующей активностью эндогенных гидротропов [40]. Солюбилизация способствует перераспределению N-белка и локальному экспонированию геномной РНК. Это необходимо для осуществления трансляции открытых рамок считывания ORF1ab и репликации плюс-цепи путем транскрипции минус-цепи. Компоненты репликационно-транскрипционного комплекса формируют конденсаты с N-белком [12], что позволяет поддерживать их высокую локальную концентрацию. Перераспределение N-белка после частичной солюбилизации завершается кластеризацией на 5'-конце РНК, поскольку эта область генома богата шпилечными фрагментами с YRRRY-мотивами, для которых отмечено повышенное сродство к RBD1 N-белка [24]. Кластеры N-белка ограничивают трансляцию ORF1ab, открывая возможность транскрипции и трансляции 3'-концевых субгеномных РНК. Среди них наиболее широко представлена в клетке субгеномная РНК, кодирующая N-белок [41]. Это связывают с особенностями регулирующих транскрипцию последовательностей (transcription regulatory sequence,

TRS) непосредственно перед открытой рамкой считывания (TRS body) и в 5'-концевом участке генома (TRS leader). Все они содержат узнаваемые RBD1 мотивы YRRRY, но именно в TRS субгеномной РНК, кодирующей N-белок, количество таких мотивов максимально [24]. Предполагается, что молекулы N-белка, сформировавшие благодаря RBD1-домену комплексы с сайтами геномной РНК TRS leader и TRS body, димеризуются при участии DD или формируют конденсаты за счет неспецифических гомотипических контактов IDR–IDR. Оба варианта в теории способствуют сближению TRS и слиянию “leader–body” [42]. Аналогичным образом может происходить сближение 5'- и 3'-концов РНК при циклизации генома [43], обеспечивающей корректную стехиометрию нуклеокапсида (одна молекула РНК на вирусную частицу).

Чередование в геноме богатых YRRRY-мотивами шпилечных фрагментов и одноцепочечных неструктурированных участков задает распределение конденсатов, соответствующее модели “бусин на нити” [7]. Наличие “бусин” (рибонуклеопротеиновых комплексов) внутри вирусной частицы установлено методом криоэлектронной томографии [44]. Хотя точный механизм сборки вирусной частицы еще предстоит прояснить, выявлена его завершающая стадия – формирование оболочки из декорированной гликопротеинами мембраны со встроенным в мембрану M-белком. M-белок проявляет способность формировать конденсаты с N-белком, обособленные от конденсатов N-белок–РНК или включающие их в качестве дополнительного внутреннего компартмента [7, 45]. На данный момент не очевидно, служит ли конденсация N-белок–M-белок на поверхности эндоплазматического ретикулума (с последующим включением РНК) триггером упаковки вируса или же на первом этапе происходит разделение фаз N-белок–РНК в цитоплазме, и полученные конденсаты оборачиваются в липидную оболочку с заякоренными в ней мембранным, оболочечным и структурными белками. Так или иначе, упаковка происходит с участием разделения фаз.

Помимо регуляторной роли в жизненном цикле вируса, стоит отметить вклад LLPS N-белок–РНК в противодействие вируса хозяину. N-белок нарушает функционирование ассоциированных с процессингом РНК немембранных органелл человека, выступая партнером или конкурентом соответствующих белков-скаффолдов (FUS, hnRNP A2 и TDP-43) [46]. Кроме того, он позволяет вирусу уклоняться от иммунной системы хозяина, действуя на митохондриальный антивирусный сенсор (mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS) [23] и скаффолды стресс-гранул G3BP1/2 [47, 48]. Образование стресс-гранул можно представить как клеточный ответ на попадание в нее



**Рис. 2.** Предполагаемая роль фазовых переходов N-белка в клетке. 1 – После проникновения вирусной частицы в клетку распаковка вируса сопровождается частичной сольюбилизацией N-белка при участии внутриклеточного гидродропа АТФ [40]; 2 – частичная сольюбилизация необходима для частичного экспонирования РНК и синтеза неструктурных белков, включая компоненты транскрипционно-репликационного аппарата; 2' – экспонирование фрагментов вирусной РНК может активировать систему внутриклеточной защиты, т.е. инициировать сборку стресс-гранул для изоляции патогена, либо выработку цитокинов по механизму, инициируемому самоассоциацией сигнального белка MAVS при его активации цитозольным рецептором RIGIN. N-белок разрушает стресс-гранулы и ассоциаты MAVS [23], что позволяет вирусу обойти систему защиты хозяина [47, 48]; 3 – N-белок способствует сборке транскрипционно-репликационного аппарата – также по механизму разделения фаз [12]; 4 – преимущественная локализация N-белка в участках генома, богатых шпильками и специфическими мотивами связывания, способствует сближению этих участков, в том числе в ходе прерывистой транскрипции [42]; 5 – результат прерывистой транскрипции – субгеномные РНК, кодирующие структурные белки вируса, в первую очередь N- и M-белки; 6 – после трансляции субгеномных РНК не исключено выделение в отдельную фазу M-белка и формирование конденсатов M-белок–N-белок [45]. При накоплении N-белка (в условиях его локального избытка) АТФ способствует конденсации N-белка на РНК, что может инициировать циклизацию РНК и дальнейшую компактизацию при сборке вирусной частицы [7].

патогена вирусной или иной природы. Оно позволяет физически изолировать патоген в отдельном компартменте. В случае коронавиральной инфекции данный защитный механизм не реализуется: наблюдается снижение числа гранул или их полное растворение [47]. Сходным образом (через aberrации фазовых переходов) осуществляется блокирование сигнального каскада, обеспечивающего повышенную экспрессию интерферонов I типа зараженными клетками [23]. Каскад включает активацию прион-подобного MAVS цитозольным рецептором патогенов RIGIN. В норме такая активация завершается самоассоциацией MAVS и разделением фаз, однако в присутствии конденсатов N-белка конденсаты MAVS не формируются, передача сигнала подавляется [49].

Примечательно, что при высоких концентрациях N-белок активирует сигнальный путь, опосредованный фактором NF-κB и регулирующий выделение провоспалительных цитокинов [50]. Итоговый эффект согласуется с клинической картиной тяжелого течения коронавиральной инфекции – подавлением врожденного иммунитета с последующей гиперактивацией [51].

Таким образом, фазовые переходы N-белка и его воздействие на конденсаты клетки-хозяина в значительной степени определяют выживание вируса. Управление фазовыми переходами открывает новые перспективы в противовирусной терапии. Биосовместимые низкомолекулярные регуляторы LLPS представляются подходящей основой для создания соответствующих препаратов. Ре-

зультаты подбора и рационального дизайна таких соединений рассмотрены в следующем разделе обзора.

### МОДУЛЯТОРЫ КОНДЕНСАТОВ N-БЕЛКА И РНК SARS-CoV-2

Основной эндогенный модулятор конденсатов – аденозинтрифосфат (АТФ) (рис. 3а) [15, 39, 52]. За счет сочетания ароматического (нуклеиновое основание) и гидрофильного (трифосфат) фрагментов АТФ способствует солюбилизации белков с экспонированными в раствор гидрофобными участками [53]. Хотя это соединение наиболее известно как “аккумулятор энергии” для биохимических процессов, именно гидротропные свойства объясняют необходимость поддержания его высокой внутриклеточной концентрации (2–12 мМ в зависимости от типа клеток) [54]. Вместе с тем отрицательно заряженный (трифосфатный) фрагмент повышает вероятность случайных электростатических гетеротипических взаимодействий при условии накопления белка-скаффолда, что может инициировать разделение фаз [53, 55]. Нередко наблюдается двухфазная зависимость LLPS от соотношения N-белок : АТФ [15, 40]. В бесклеточной модели фазовых переходов N-белок–РНК SARS-CoV-2 при соотношении ~1 : 1000 (на начальных этапах заражения) преобладает растворение конденсатов. При увеличении количества N-белка и соотношении N-белок : АТФ ≈ 200 : 1 LLPS усиливается, а при дальнейшем накоплении N-белка – снова снижается [40]. Эти наблюдения соответствуют предполагаемой роли АТФ в распаковке вирусной частицы и упаковке нуклеокапсида после синтеза дополнительных молекул N-белка.

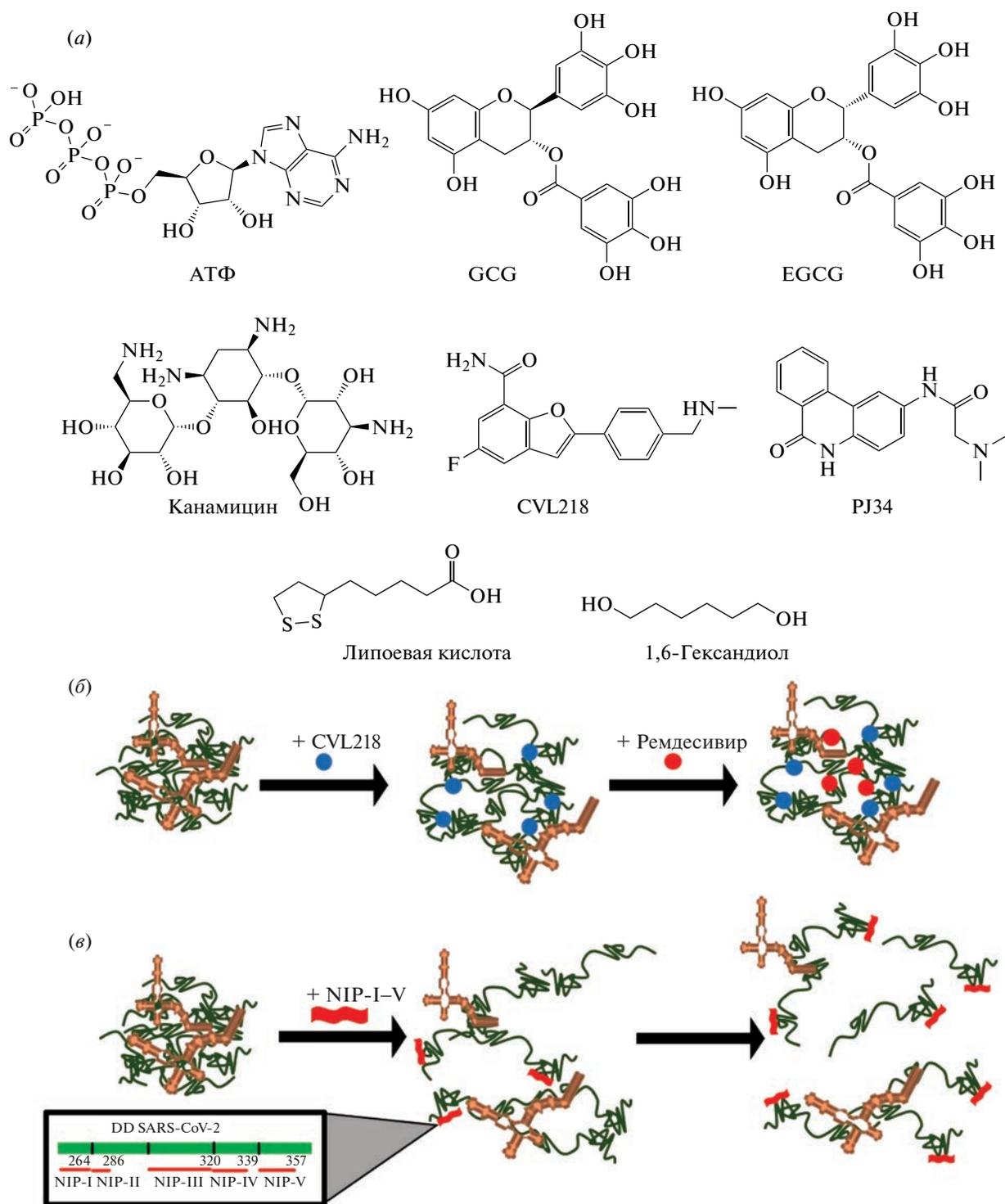
Для прояснения молекулярных основ LLPS-модулирующей активности АТФ требуются дополнительные исследования. При дизайне экзогенных модуляторов на основе аналогов АТФ особенно актуален вопрос влияния АТФ на контакты N-белок–РНК. Оптимальный модулятор должен обладать избирательностью к вирусным конденсатам, т.е. не затрагивать немембранные органеллы клетки хозяина. Универсальные гидротропы в этом плане малоперспективны. Некоторой избирательности можно ожидать от конкурентного ингибитора специфических гетеротипических контактов в вирусных конденсатах. Анализ взаимодействий N-белок–АТФ методами ЯМР-спектроскопии с привлечением молекулярного моделирования выявил два наиболее вероятных сайта связывания АТФ в RBD1 ( $K_d \sim 3.0$  мМ) и RBD2 ( $K_d \sim 1.5$  мМ) N-белка [45]. В обоих сайтах расположение аргининовых и лизиновых остатков предполагает комбинацию электростатических взаимодействий с трифосфатом АТФ и взаимодействий “катион-π” с пуриновым фрагментом.

Константы связывания допускают конкуренцию с РНК ( $K_d = 8.0$  мкМ) [56] лишь за счет большого избытка АТФ.

Доступные на данный момент экзогенные модуляторы вирусных конденсатов были получены преимущественно путем скрининга соединений с показанной ранее противовирусной активностью, т.е. в рамках прояснения механизма или попытки перепрофилирования существующих препаратов с широким спектром действия. Яркий пример – низкомолекулярные ингибиторы поли(АДФ-рибозо)полимеразы 1 (PARP1) CVL218 и PJ34 (рис. 3а) [57]. Изначально интерес к их возможной роли в модуляции LLPS SARS-CoV-2 был обусловлен способностью проникать в легочную ткань и подтвержденным сродством к N-белку ( $K_d = 4.7$  и  $696$  мкМ для CVL218 и PJ34 соответственно). Оба соединения меняют физические свойства конденсатов – снижают их плотность и тем самым облегчают доступ другим терапевтическим агентам к РНК и репликативному/транскрипционному аппарату. Облегчение доступа к компонентам конденсатов было продемонстрировано с использованием ремдесивира (пролекарственное нуклеозидное производное, метаболизируемое в клетке до аналога АТФ) (рис. 3б). Данный ингибитор репликации показал двухкратное снижение эффективной концентрации  $EC_{50}$  в присутствии модулятора LLPS CVL218 [57]. Эти результаты стимулируют дальнейшую разработку стратегий комбинированной противовирусной терапии.

Еще один эффективный модулятор вирусных конденсатов – флавоноид галлокатехин-3-галлат (GCG) (рис. 3а) [58]. Данное природное соединение наиболее известно как антиоксидант, он проявляет умеренную ингибиторную активность в отношении SARS-CoV-2 (константы ингибирования в среднем/высоком микромолярном диапазоне концентраций, в зависимости от схемы введения), обладает выраженным сродством к N-белку и эффективно подавляет образование конденсатов в клетке. LLPS-модулирующая способность до некоторой степени проявляется и у гомологов GCG, таких как эпигаллокатехин-3-галлат (EGCG) (наиболее эффективный ингибитор SARS-CoV-2 катехинового ряда) (рис. 3а), но не коррелирует с противовирусной активностью [58].

Флавоноиды – не единственные антиоксиданты, оказывающие влияние на вирусные и эндогенные конденсаты. Универсальный ингибитор опосредующих LLPS гидрофобных взаимодействий – липоевая кислота (рис. 3а) [59]. Помимо конденсатов N-белок–РНК SARS-CoV-2 [60] липоевая кислота может влиять на стресс-гранулы и иные немембранные органеллы [61]. То же касается модельного универсального ингибитора разделения фаз – 1,6-гександиола (рис. 3а) [25]. Это



**Рис. 3.** Модуляторы LLPS и примеры их действия на конденсаты N-белок–РНК. (а) – Известные низкомолекулярные модуляторы конденсатов N-белок–РНК [15, 40, 57–59]; (б) – пример модуляции физических свойств конденсатов как основа возможного подхода к комбинированной противовирусной терапии. Низкомолекулярное соединение CVL218, известное как ингибитор PARP1, способствует разрыхлению конденсатов N-белок–РНК (предположительно с включенными в них компонентами транскрипционно-репликационного аппарата). Снижение плотности конденсатов открывает ингибитору репликации (ремдесивиру) доступ к мишени [57]; (в) – пример потенциально селективных ингибиторов вирусных конденсатов на основе миметиков стикеров N-белка [23]. Миметики представляют собой ретроинвертированные пептиды, имитирующие фрагменты DD N-белка. Предполагается, что данные миметики ингибируют значимые для разделения фаз гомотипические контакты.

соединение широко используется в фундаментальных исследованиях, но не имеет перспектив применения в клинике ввиду выраженного цитотоксического действия [62]. Наряду с неспецифическим блокированием гидрофобных контактов возможно неспецифическое подавление электростатических взаимодействий РНК–белок в конденсатах. По такому принципу действуют антибиотики группы аминогликозидов, в частности канамицин (рис. 3а) [25]. Как и прочие представленные в данном разделе модуляторы, отобранные полуэмпирически, они не обладают избирательностью к конденсатам SARS-CoV-2 [63].

На данный момент известен один пример успешного рационального дизайна ингибиторов LLPS, предположительно специфичных к SARS-CoV-2. Ингибиторы представляют собой ретроинвертированные пептиды – миметики боковых участков DD N-белка, полученные из неприродных D-аминокислотных остатков (для защиты от протеолиза) в инвертированной последовательности (для обеспечения расположения боковых групп, идентичного природному прототипу). В целях повышения эффективности внутриклеточного транспорта к ретроинвертированным пептидам добавляют направляющую последовательность ТАТ-белка вируса иммунодефицита человека. Принцип действия итоговых пептидных модуляторов LLPS сводится к блокированию гомотипических контактов N-белка за счет конкурентного связывания с DD (рис. 3в). Подавление димеризации смещает равновесие в сторону конденсатов. Примечательно, что наиболее активный ретроинвертированный пептид не только подавлял образование конденсатов N-белок–РНК SARS-CoV-2, но и восстанавливал внутриклеточные сигнальные пути системы врожденного иммунитета, что удалось отследить при заражении экспрессирующих N-белок клеток сторонним вирусом в присутствии/в отсутствие пептидного блокатора LLPS [23].

Помимо ингибиторов LLPS N-белка интерес представляют противовирусные соединения – активаторы LLPS. В их число входят 5'-норкарбоциклические аналоги нуклеозидов, некоторые представители класса флексимеров (модифицированные нуклеозиды, в которых основание разделено на два гетероциклических фрагмента, соединенных простой связью С–С) и периллен-содержащие нуклеозидные и нуклеозидные производные [64]. Теоретически, индуцируемое данными соединениями смещение равновесия между мономерами/димерами N-белка и конденсатами в сторону последних может нарушать распаковку нуклеокапсида на первой стадии инфекции, однако этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Таким образом, показано, что модуляция свойств вирусных конденсатов вносит вклад в общую противовирусную активность препаратов.

Это открывает возможность разработки новой эффективной стратегии борьбы с SARS-CoV-2.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прогресс в исследовании феномена LLPS и особенностей конденсатов N-белка и РНК SARS-CoV-2 создал предпосылки для подавления вирусной инфекции с помощью модуляторов LLPS. Стимулом к изучению конденсатов послужили данные об их вероятном участии в нескольких этапах цикла размножения вируса SARS-CoV-2, включая транскрипцию, репликацию и сборку вирусной частицы. Важным аргументом в пользу терапевтической значимости конденсатов стали свидетельства их способности подавлять защитные функции клетки-хозяина за счет блокирования MAVS-опосредованной передачи сигнала и формирования стресс-гранул.

В настоящее время активно ведется разработка модуляторов вирусных конденсатов, и наиболее перспективным направлением представляется рациональный дизайн модуляторов с учетом горячих точек транзитных контактов в конденсатах и специфических взаимодействий N-белок–РНК. Прояснение особенностей пространственной организации N-белка и РНК SARS-CoV-2 способствовало первым успехам в этом направлении.

Хотя сравнительная значимость отдельных элементов первичной и вторичной структуры N-белка и РНК для устойчивости конденсатов остается спорным вопросом и может определяться внешними условиями, все ключевые типы контактов уже описаны. Это открывает возможности создания модуляторов LLPS, избирательно действующих на вирусные конденсаты.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента Российской Федерации № МД-5000.2022.3, а также Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1049).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aleem A., Akbar Samad A.B., Slenker A.K. // Emerging Variants of SARS-CoV-2 and Novel Therapeutics Against Coronavirus (COVID-19). In: StatPearls.

- Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34033342/>
2. Huang Y., Yang C., Xu X., Xu W., Liu S. // *Acta Pharmacol. Sin.* 2020. V. 41. P. 1141–1149. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>
  3. Ullrich S., Nitsche C. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2020. V. 30. P. 127377. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127377>
  4. Uengwetwanit T., Chutiwitoonchai N., Wichapong K., Karoonuthaisiri N. // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2022. V. 20. P. 882–890. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.02.001>
  5. Bai Z., Cao Y., Liu W., Li J. // *Viruses.* 2022. V. 13. P. 1115. <https://doi.org/10.3390/v13061115>
  6. Yao H., Song Y., Chen Y., Wu N., Xu J., Sun C., Zhang J., Weng T., Zhang Z., Wu Z., Cheng L., Shi D., Lu X., Lei J., Crispin M., Shi Y., Li L., Li S. // *Cell.* 2020. V. 183. P. 730–738.E13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.018>
  7. Lu S., Ye Q., Singh D., Cao Y., Diedrich J.K., Yates III J.R., Villa E., Cleveland D.W., Corbett K.D. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. P. 502. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20768-y>
  8. Cubuk J., Alston J.J., Incicco J.J., Singh S., Stuchell-Breton M.D., Ward M.D., Zimmerman M.I., Vithani N., Griffith D., Wagoner J.A., Bowman G.R., Hall K.B., Soranno A., Holehouse A.S. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. P. 1936. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21953-3>
  9. Wang B., Zhang L., Dai T., Qin Z., Lu H., Zhang L., Zhou F. // *Signal Transduct. Target. Ther.* 2021. V. 6. P. 290. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00678-1>
  10. Li H., Ernst C., Kolonko-Adamska M., Man J., Parissi V., Wai-Lung Ng B. // *Trends Microbiol.* 2022. V. 30. P. 1217–1231. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.06.005>
  11. Bäuerlein F.J.B., Fernández-Busnadiego R., Baumeister W. // *Trends Cell. Biol.* 2020. V. 30. P. 951–966. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.08.007>
  12. Savastano A., Ibáñez de Opakua A., Rankovic M., Zweckstetter M. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. P. 6041. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19843-1>
  13. Cascarina S.M., Ross E.D. // *FASEB J.* 2020. V. 34. P. 9832–9842. <https://doi.org/10.1096/fj.202001351>
  14. Cascarina S.M., Ross E.D. // *J. Biol. Chem.* 2022. V. 298. P. 101677. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101677>
  15. Dang M., Song J. // *Biophys. Rev.* 2022. V. 14. P. 709–715. <https://doi.org/10.1007/s12551-022-00957-3>
  16. Alberti S., Gladfelter A., Mittag T. // *Cell.* 2019. V. 176. P. 419–434. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.035>
  17. Abyzov A., Blackledge M., Zweckstetter M. // *Chem. Rev.* 2022. V. 122. P. 6719–6748. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00774>
  18. Titus A.R., Ferreira L.A., Belgovskiy A.I., Kooijman E.E., Mann E.K., Mann J.A., Meyer W.V., Smart A.E., Uversky V.N., Zaslavsky B.Y. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2020. V. 22. P. 4574–4580. <https://doi.org/10.1039/C9CP05810A>
  19. Jo Y., Jang J., Song D., Park H., Jung Y. // *Chem. Sci.* 2022. V. 13. P. 522–530. <https://doi.org/10.1039/D1SC05672G>
  20. O'Flynn B.G., Mittag T. // *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2021. V. 69. P. 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.12.012>
  21. Brocca S., Grandori R., Longhi S., Uversky V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 9045. <https://doi.org/10.3390/ijms21239045>
  22. Zhou R., Zeng R., von Brunn A., Lei J. // *Mol. Biomed.* 2020. V. 1. P. 2. <https://doi.org/10.1186/s43556-020-00001-4>
  23. Wang S., Dai T., Qin Z., Pan T., Chu F., Lou L., Zhang L., Yang B., Huang H., Lu H., Zhou F. // *Nat. Cell. Biol.* 2021. V. 23. P. 718–732. <https://doi.org/10.1038/s41556-021-00710-0>
  24. Roden C.A., Dai Y., Giannetti C.A., Seim I., Lee M., Sealson R., McLaughlin G.A., Boerneke M.A., Iserman C., Wey S.A., Ekena J.L., Troyanskaya O.G., Weeks K.M., You L., Chilkoti A., Gladfelter A.S. // *Nucleic Acids Res.* 2022. V. 50. P. 8168–8192. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac596>
  25. Iserman C., Roden C.A., Boerneke M.A., Sealson R.S.G., McLaughlin G.A., Jungreis I., Fritch E.J., Hou Y.J., Ekena J., Weidmann C.A., Theesfeld C.L., Kellis M., Troyanskaya O.G., Baric R.S., Sheahan T.P., Weeks K.M., Gladfelter A.S. // *Mol. Cell.* 2020. V. 80. P. 1078–1091.E6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.11.041>
  26. Riback J.A., Zhu L., Ferrolino M.C., Tolbert M., Mirtrea D.M., Sanders D.W., Wei M.-T., Kriwacki R.W., Brangwynne C.P. // *Nature.* 2020. V. 581. P. 209–214. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2256-2>
  27. Weidmann C.A., Mustoe A.M., Jariwala P.B., Calabrese J.M., Weeks K.M. // *Nat. Biotechnol.* 2021. V. 39. P. 347–356. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0709-7>
  28. Zachrdla M., Savastano A., Ibáñez de Opakua A., Cima-Omori M.S., Zweckstetter M. // *Protein Sci.* 2022. V. 31. P. e4409. <https://doi.org/10.1002/pro.4409>
  29. Banani S.F., Rice A.M., Peeples W.B., Lin Y., Jain S., Parker R., Rosen M.K. // *Cell.* 2016. V. 166. P. 651–663. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.010>
  30. Choi J.-M., Holehouse A.S., Pappu R.V. // *Annu. Rev. Biophys.* 2020. V. 49. P. 107–133. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-121219-081629>
  31. Lin Y.-H., Brady J.P., Chan H.S., Ghosh K. // *J. Chem. Phys.* 2020. V. 152. P. 045102. <https://doi.org/10.1063/1.5139661>
  32. Supekar N.T., Shajahan A., Gleinich A.S., Rouhani D.S., Heiss C., Chapla D.G., Moremen K.W., Azadi P. // *Glycobiology.* 2021. V. 31. P. 1080–1092. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwab044>
  33. Wu J., Zhong Y., Liu X., Lu X., Zeng W., Wu C., Xing F., Cao L., Zheng F., Hou P., Peng H., Li C., Guo D. // *J. Mol. Cell. Biol.* 2022. V. 14. P. mjac003. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjac003>
  34. Wang J., Choi J.-M., Holehouse A.S., Lee H.O., Zhang X., Jahnel M., Maharana S., Lemaitre R., Pozniakovskiy A.,

- Drechsel D., Poser I., Pappu R.V., Alberti S., Hyman A.A.* // Cell. 2018. V. 174. P. 688–699. E16.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.006>
35. *Vernon R.M., Chong P.A., Tsang B., Kim T.H., Bah A., Farber P., Lin H., Forman-Kay J.D.* // eLife. 2018. V. 7. P. e31486.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.31486>
36. *Caruso I.P., dos Santos Almeida V., do Amaral M.J., de Andrade G.C., de Araújo G.R., de Araújo T.S., de Azevedo J.M., Barbosa G.M., Bartkevichi L., Bezerra P.R., dos Santos Cabral K.M., de Lourenço I.O., Malizia-Motta C.L.F., de Luna Marques A., Mebus-Antunes N.C., Neves-Martins T.C., de Sá J.M., Sanches K., Santana-Silva M.C., Vasconcelos A.A., da Silva Almeida M., de Anorim G.C., Anobom C.D., da Poian A.T., Gomes-Neto F., Pinheiro A.S., Almeida F.C.L.* // Int. J. Biol. Macromol. 2022. V. 203. P. 466–480.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.121>
37. *Zhao H., Nguyen A., Wu D., Li Y., Hassan S.A., Chen J., Shroff H., Piszczek G., Schuck P.* // PNAS Nexus. 2022. V. 1. P. pgac049.  
<https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgac049>
38. *Bogunia M., Makowski M.* // J. Phys. Chem. B. 2020. V. 124. P. 10326–10336.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c06399>
39. *Gao T., Gao Y., Liu X., Nie Z., Sun H., Lin K., Peng H., Wang S.* // BMC Microbiol. 2021. V. 21. P. 58.  
<https://doi.org/10.1186/s12866-021-02107-3>
40. *Dang M., Li Y., Song J.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2021. V. 541. P. 50–55.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.01.018>
41. *Kim D., Lee J.-Y., Yang J.-S., Kim J.W., Kim V.N., Chang H.* // Cell. 2020. V. 181. P. 914–921. E10.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.011>
42. *Malone B., Urakova N., Snijder E.J., Campbell E.A.* // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2022. V. 23. P. 21–39.  
<https://doi.org/10.1038/s41580-021-00432-z>
43. *Ziv O., Price J., Shalamova L., Kamenova T., Goodfellow I., Weber F., Miska E.A.* // Mol. Cell. 2022. V. 80. P. 1067–1077. E5.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.11.004>
44. *Klein S., Cortese M., Winter S.L., Wachsmuth-Melm M., Neufeldt C.J., Cerikan B., Stanifer M.L., Boulant S., Bartenschlager R., Chlanda P.* // Nat. Commun. 2020. V. 11. P. 5885.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-19619-7>
45. *Zhang Z., Nomura N., Muramoto Y., Ekimoto T., Uemura T., Liu K., Yui M., Kono N., Aoki J., Ikeguchi M., Noda T., Iwata S., Ohto U., Shimizu T.* // Nat. Commun. 2022. V. 13. P. 4399.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-32019-3>
46. *Perdikari T.M., Murthy A.C., Ryan V.H., Watters S., Naik M.T., Fawzi N.L.* // EMBO J. 2020. V. 39. P. e106478.  
<https://doi.org/10.15252/embj.2020106478>
47. *Luo L., Li Z., Zhao T., Ju X., Ma P., Jin B., Zhou Y., He S., Huang J., Xu X., Zou Y., Li P., Liang A., Liu J., Chi T., Huang X., Ding Q., Jin Z., Huang C., Zhang Y.* // Sci. Bull. (Beijing). 2021. V. 66. P. 1194–1204.  
<https://doi.org/10.1016/j.scib.2021.01.013>
48. *Wang W., Chen J., Yu X., Lan H.Y.* // Int. J. Biol. Sci. 2022. V. 18. P. 4704–4713.  
<https://doi.org/10.7150/ijbs.72663>
49. *Oh S.J., Shin O.S.* // Cells. 2021. V. 10. P. 530.  
<https://doi.org/10.3390/cells10030530>
50. *Wu Y., Ma L., Cai S., Zhuang Z., Zhao Z., Jin S., Xie W., Zhou L., Zhang L., Zhao J., Cui J.* // Signal Transduct. Target. Ther. 2021. V. 6. P. 167.  
<https://doi.org/10.1038/s41392-021-00575-7>
51. *Tay M.Z., Poh C.M., Rénia L., MacAry P.A., Ng L.F.P.* // Nat. Rev. Immunol. 2020. V. 20. P. 363–374.  
<https://doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>
52. *Dang M., Song J.* // Protein Sci. 2022. V. 31. P. 345–356.  
<https://doi.org/10.1002/pro.4221>
53. *Patel A., Malinowska L., Saha S., Wang J., Alberti S., Krishnan Y., Hyman A.A.* // Science. 2017. V. 356. P. 753–756.  
<https://doi.org/10.1126/science.aaf6846>
54. *Song J.* // Protein Sci. 2021. V. 30. P. 1277–1293.  
<https://doi.org/10.1002/pro.4079>
55. *Kang J., Lim L., Lu Y., Song J.* // PLoS Biol. 2019. V. 17. P. 1–33.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000327>
56. *Dinesh D.C., Chalupska D., Silhan J., Koutna E., Nencika R., Veverka V., Boura E.* // PLoS Pathog. 2020. V. 16. P. 1–16.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009100>
57. *Zhao D., Xu W., Zhang X., Wang X., Ge Y., Yuan E., Xiong Y., Wu S., Li S., Wu N., Tian T., Feng X., Shu H., Lang P., Li J., Zhu F., Shen X., Li H., Li P., Zeng J.* // Protein Cell. 2021. V. 12. P. 734–740.  
<https://doi.org/10.1007/s13238-021-00832-z>
58. *Zhao M., Yu Y., Sun L.-M., Xing J.-Q., Li T., Zhu Y., Wang M., Yu Y., Xue W., Xia T., Cai H., Han Q.-Y., Yin X., Li W.-H., Li A.-L., Cui J., Yuan Z., Zhang R., Zhou T., Zhang X.-M., Li T.* // Nat. Commun. 2021. V. 12. P. 2114.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-22297-8>
59. *Gorąca A., Huk-Kolega H., Piechota A., Kleniewska P., Ciejka E., Skibska B.* // Pharmacol. Rep. 2011. V. 63. P. 849–858.  
[https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(11\)70600-4](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(11)70600-4)
60. *Gordon D.E., Jang G.M., Bouhaddou M., Xu J., Obernier K., White K.M., O’Meara M.J., Rezelj V.V., Guo J.Z., Swaney D.L., Tummino T.A., Hüntenhain R., Kaake R.M., Richards A.L., Tutuncuoglu B., Foussard H., Batra J., Haas K., Modak M., Kim M., Haas P., Polacco B.J., Braberg H., Fabius J.M., Eckhardt M., Soucheray M., Bennett M.J., Cakir M., McGregor M.J., Li Q., Meyer B., Roesch F., Vallet T., Mac Kain A., Miorin L., Moreno E., Naing Z.Z.C., Zhou Y., Peng S., Shi Y., Zhang Z., Shen W., Kirby I.T., Melnyk J.E., Chorbaj J.S., Lou K., Dai S.A., Barrio-Hernandez I., Memon D., Hernandez-Armenta C., Lyu J., Mathy C.J.P., Perica T., Pilla K.B., Ganesan S.J., Saltzberg D.J., Rakesh R., Liu X., Rosenthal S.B., Calviello L., Venkataramanan S., Liboy-Lugo J., Lin Y., Huang X.P., Liu Y., Wankowicz S.A., Bohn M., Safari M., Ugur F.S., Koh C., Savar N.S., Tran Q.D., Shengjuler D., Fletcher S.J., O’Neal M.C., Cai Y., Chang J.C.J., Broadhurst D.J., Klippsten S., Sharp P.P., Wenzell N.A., Kuzuglu-Ozturk D., Wang H.Y., Trenker R., Young J.M., Cavero D.A., Hiatt J., Roth T.L., Rathore U., Subramani-*

- an A., Noack J., Hubert M., Stroud R.M., Frankel A.D., Rosenberg O.S., Verba K.A., Agard D.A., Ott M., Emerman M., Jura N., von Zastrow M., Verdin E., Ashworth A., Schwartz O., d'Enfert C., Mukherjee S., Jacobson M., Malik H.S., Fujimori D.G., Ideker T., Craik C.S., Floor S.N., Fraser J.S., Gross J.D., Sali A., Roth B.L., Ruggero D., Taunton J., Kortemme T., Beltrao P., Vignuzzi M., García-Sastre A., Shokat K.M., Shoichet B.K., Krogan N.J. // *Nature*. 2020. V. 583. P. 459–468. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2286-9>
61. Wheeler R.J., Lee H.O., Poser I., Pal A., Doeleman T., Kishigami S., Kour S., Anderson E.N., Marrone L., Murthy A.C., Jahnle M., Zhang X., Boczek E., Fritsch A., Fawzi N.L., Sternecker J., Pandey U., David D.C., Davis B.G., Baldwin A.J., Hermann A., Bickle M., Alberti S., Hyman A.A. // *bioRxiv*. 2019. <https://doi.org/10.1101/721001>
62. Itoh Y., Iida S., Tamura S., Nagashima R., Shiraki K., Goto T., Hibino K., Ide S., Maeshima K. // *Life Sci. Alliance*. 2021. V. 4. P. e202001005. <https://doi.org/10.26508/lsa.202001005>
63. Blount K.F., Zhao F., Hermann T., Tor Y. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 9818–9829. <https://doi.org/10.1021/ja050918w>
64. Svetlova J., Knizhnik E., Manuvera V., Severov V., Shirokov D., Graftskaia E., Bobrovsky P., Matyugina E., Khandazhinskaya A., Kozlovskaya L., Miropolskaya N., Aralov A., Khodarovich Y., Tsvetkov V., Kochetkov S., Lazarev V., Varizhuk A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 15281. <https://doi.org/10.3390/ijms232315281>

## Condensates of SARS-CoV-2 Nucleoprotein on Viral RNA and Their Small Molecule Modulators

J. I. Svetlova\*, Iu. I. Pavlova\*, \*\*, A. V. Aralov\*\*\*, and A. M. Varizhuk\*, \*\*, #

#Phone: +7 (916) 502-78-32; e-mail: [annavarizhuk@rcpcm.org](mailto:annavarizhuk@rcpcm.org)

\*Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, ul. Malaya Pirogovskaya 1a, Moscow, 119435 Russia

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

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

Several types of biopolymers undergo liquid-liquid phase separation (form condensates) in aqueous solutions, and this phenomenon has been characterized in detail for proteins with intrinsically disordered regions. One example of such proteins is the nucleocapsid (N) protein of the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. In this review, we analyzed available data on N-protein separation in the presence of viral RNA. Particular attention was paid to transient contacts within the condensates and the N-protein/RNA fragments that form these contacts. We also discussed the presumed role of the condensates in the SARS-CoV-2 life cycle and summarized their influence on the host protective machinery. Finally, we commented on the possibility of regulating the viral condensates using synthetic or native small molecules (phase separation modulators), which can provide a new option in the design of antiviral agents.

*Keywords:* phase separation, condensates, N-protein, SARS-CoV-2, viral RNA, small molecule antivirals



УДК 544.165

## АМИНОКИСЛОТНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ФУЛЛЕРЕНА C<sub>60</sub>: СИНТЕЗ И БИМЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

© 2023 г. О. В. Ямскава\*, Д. В. Курилов\*\*, В. А. Волков\*\*\*, #,  
М. В. Воронков\*\*\*, И. В. Заварзин\*\*

\*Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН,  
Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 28

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

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

Поступила в редакцию 22.12.2022 г.

После доработки 28.12.2022 г.

Принята к публикации 29.12.2022 г.

Водорастворимые формы фуллерена C<sub>60</sub> обладают многими уникальными физико-химическими и биологическими свойствами, что делает перспективными и многообещающими исследования по созданию на их основе различных препаратов для медицины и ветеринарии. Особенную актуальность приобретают работы по синтезу и изучению производных фуллерена с аддендами биогенного характера, в частности аминокислотами и пептидами. Обзор посвящен описанию различных подходов к синтезу аминокислотных производных фуллерена C<sub>60</sub> и перспектив их биомедицинского применения.

*Ключевые слова:* фуллерен, аминокислотные производные, органический синтез, водорастворимые производные, аминокислотные и пептидные производные фуллерена, физико-химические свойства, физико-химические методы анализа, биологическая активность, биомедицинское применение

DOI: 10.31857/S013234232305010X, EDN: UIKENS

### СОДЕРЖАНИЕ

|  |     |
|--|-----|
| ВВЕДЕНИЕ .....   | 455 |
| ТИПЫ РЕАКЦИЙ В ОРГАНИЧЕСКОЙ<br>ХИМИИ ФУЛЛЕРЕНА C <sub>60</sub> .....                     | 456 |
| ПОЛУЧЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ<br>ФУЛЛЕРЕНА C <sub>60</sub> С АМИНОКИСЛОТАМИ<br>И ПЕПТИДАМИ ..... | 456 |
| Реакции [2 + 1]-циклоприсоединения .....   | 456 |
| Реакции [2 + 3]-циклоприсоединения .....   | 459 |
| Реакции [2 + 4]-циклоприсоединения .....   | 462 |
| Реакции радикального присоединения .....   | 465 |
| Реакции нуклеофильного присоединения .....   | 466 |
| Альтернативные методы синтеза .....  | 468 |

|   |     |
|---|-----|
| ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА<br>РАСТВОРОВ [60]ФУЛЛЕРЕНОВЫХ<br>ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ<br>И ПЕПТИДОВ ..... | 469 |
| БИМЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ<br>ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНА .....   | 472 |
| Антиоксидантные свойства .....  | 472 |
| Противоопухолевое действие .....  | 474 |
| Противовирусная и антибактериальная<br>активности .....   | 475 |
| Иммуногенные эффекты .....  | 476 |
| Нейротропная активность .....   | 477 |
| Системы направленной доставки<br>лекарственных веществ. Тераностика .....                               | 478 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....  | 479 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....   | 480 |

### ВВЕДЕНИЕ

Перспективы эффективного использования фуллеренов и их производных в биомедицинской области и сельском хозяйстве в значительной степени определяются возможностью получения во-

Сокращения: АПФ – аминокислотное или пептидное производное фуллерена; АФК – активные формы кислорода; ГПФ – гибридные производные фуллерена; МДА – малоновый диальдегид; НДИ – нафталиндиимидные группы; ПОЛ – перекисное окисление липидов; ФДТ – фотодинамическая терапия; ФС – фотосенсибилизатор; ЦМВ – цитомегаловирус; ЦМВИ – цитомегаловирусная инфекция; ЭМФ – эндоэдральный металлофуллерен; НуFn (или ВДФ) – водная дисперсия фуллерена C<sub>60</sub>; МАО-А – моноаминоксидаза А; МАО-В – моноаминоксидаза В.

# Автор для связи: (эл. почта: vl.volkov@mail.ru).

дорастворимых форм этих соединений. Высокая гидрофобность фуллеренов в сочетании с тенденцией к образованию агрегатов затрудняет их непосредственное биомедицинское использование. Так, задача создания водорастворимых форм фуллерена позволяет решать ее в трех направлениях: 1) получением водной дисперсии (коллоидного раствора) фуллерена (ВДФ), 2) получением комплексов фуллерена с гидрофильными соединениями, 3) введением в фуллереновый кор гидрофильных групп и структурных фрагментов. В рамках настоящего обзора обсуждаются синтетические подходы к модификациям фуллерена, приводящие к получению фуллеренсодержащих аминокислотных и пептидных производных. Синтез таких производных фуллерена можно рассматривать как потенциальную возможность для создания его водорастворимой формы. Кроме того, в обзоре рассматриваются физико-химические факторы, обеспечивающие свойства биологической активности фуллеренсодержащих аминокислотных и пептидных производных, описываются возможности их эффективного биомедицинского применения. Так, описаны мембранотропные, антиоксидантные и фотосенсибилизирующие свойства этих соединений, обсуждаются полученные результаты по проявлению ими противовирусной, антибактериальной, нейротропной и иммуногенной активностей, а также перспективы их использования для фотодинамической противоопухолевой терапии и в системах направленной доставки лекарственных веществ. Следует отметить, что для полноты картины, обрисовывающей горизонты и возможности биомедицинского применения фуллереновых производных, в обзоре некоторое внимание уделено свойствам биологической активности и биомедицинскому применению ряда других важных в практическом отношении фуллереновых производных.

## ТИПЫ РЕАКЦИЙ В ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ФУЛЛЕРЕНА C<sub>60</sub>

В силу того, что фуллерен C<sub>60</sub> имеет более высокую симметрию и более доступен, чем C<sub>70</sub>, а также обладает схожими физическими характеристиками (сродство к электрону и др.), он стал привлекательным объектом для химических превращений. Из всех фуллеренов именно C<sub>60</sub> широко используется в качестве “строительного блока” для получения различного типа производных [1, 2].

Важное направление функционализации C<sub>60</sub> — экзоэдральное присоединение к фуллереновому кору. Осуществить экзоэдральное ковалентное присоединение к фуллерену возможно для различных классов соединений. Для фуллерена C<sub>60</sub> изучены следующие типы реакций:

- 1) нуклеофильного присоединения;
- 2) радикального присоединения;
- 3) [2 + 1]-, [2 + 2]-, [2 + 3]-, [2 + 4]-, [2 + 5]-, [2 + 6]- и [2 + 8]-циклоприсоединения;
- 4) полициклоприсоединения;
- 5) электрофильного присоединения;
- 6) электрохимические реакции (окисления и восстановления);
- 7) участие в процессах полимеризации.

## ПОЛУЧЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНА C<sub>60</sub> С АМИНОКИСЛОТАМИ И ПЕПТИДАМИ

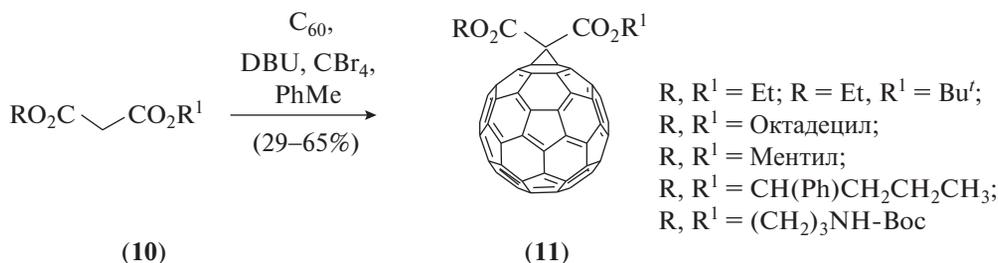
Фуллерен C<sub>60</sub> — электронодефицитный полиен, проявляющий склонность к реакциям радикального, нуклеофильного и циклоприсоединения [3]. Среди разнообразных реакций, доступных для дериватизации фуллерена C<sub>60</sub>, именно реакции циклоприсоединения являются наиболее многочисленными. В силу своей электронной природы фуллерен C<sub>60</sub> способен принимать участие в реакциях [2 + n]-циклоприсоединения, причем наиболее характерны случаи, когда n = 1–4. Электронодефицитная фуллереновая система C<sub>60</sub> представляет собой отличный диенофил и диплярофил, экзоэдральные реакции с которой приводят к получению широкого ряда стабильных циклоаддуктов [4–7].

### Реакции [2 + 1]-циклоприсоединения

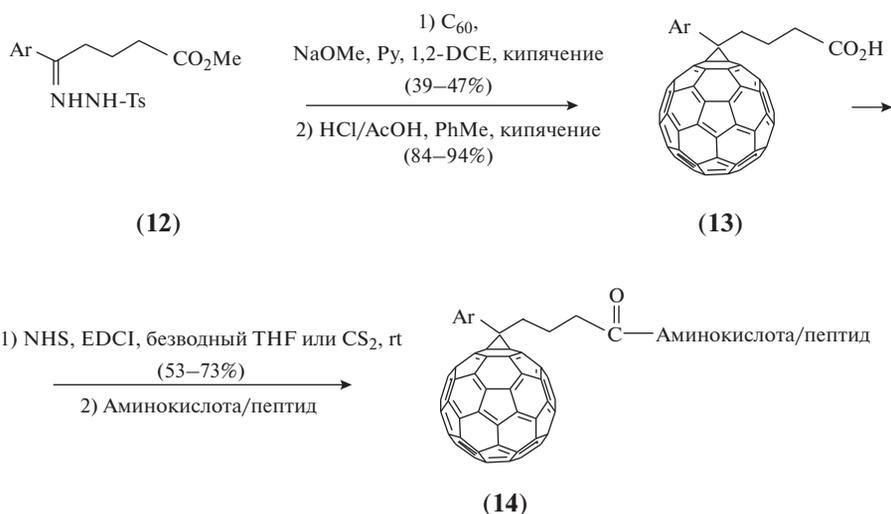
Присоединение к фуллерену C<sub>60</sub> карбена или карбеноида, генерированного из [4-*tert*-бутоксикарбонилфенил]дiazометана (1), с последующим удалением защитной группы в полученном эфире (2) — пример получения фуллеренового производного, хорошо подходящего для дальнейшей пептидной функционализации (рис. 1). Конденсация деблокированной по карбоксильной группе карбоновой кислоты с пентапептидом H-(L-Ala-Aib)<sub>2</sub>-L-Ala-OMe позволила Prato et al. [8] получить первое пептидное производное фуллерена (3).

Алкилдиазоацетаты оказались эффективными для получения другого универсального синтона — метано[60]фуллеренилкарбоновой кислоты (5) (рис. 2) [9, 10]. Так, реакцией с деблокированной карбоновой кислотой (5) (полученной из диазоацетатов (4a) и (4b) циклоприсоединением к фуллерену C<sub>60</sub> и последующим удалением сложноэфирной группы) была осуществлена конденсация (по методу активированных эфиров, в присутствии DCC и HOBT) с метиловым эфиром L-фенилаланина и пентапептидом H-Thr-Thr-Asn-Tyr-Thr-OH, в результате которой получены соответствующие аминокислотное (6) [9] и олигопептидное (7) [10] производные фуллерена C<sub>60</sub>. Примечательно, что олигопептид (7) явился первым примером водо-





**Рис. 4.** Реакция циклоприсоединения к фуллерену  $\text{C}_{60}$  по Бингелю–Хиршу. Взаимодействие фуллерена  $\text{C}_{60}$  с производными малоновой кислоты.



**Рис. 5.** Реакция циклоприсоединения к фуллерену  $\text{C}_{60}$  диазосоединений, генерируемых из гидразонов.

и их дальнейшей функционализации по карбоксильной группе (рис. 4).

В частности, посредством модифицированной реакции Бингеля–Хирша при использовании эфира 2-броммалоновой кислоты синтезировано производное фуллерена  $\text{C}_{60}$  с полиглицидилнитратом ( $\text{C}_{60}$ -PGN) [21]. На основе реакции Бингеля–Хирша также синтезированы аддукты фуллерена  $\text{C}_{60}$  с малонамидными производными L-аланина и ряда других природных и непротеиногенных аминокислот с выходом целевого продукта 20–26% [22].

Одним из методов генерирования нестабильных диазосоединений *in situ* может служить использование стабильных гидразонов и их производных (рис. 5). Полагают, что процесс циклопропанирования протекает через первоначальное 1,3-диполярное циклоприсоединение диазосоединения к фуллерену  $\text{C}_{60}$  с последующей экструзией азота из образовавшегося пиразолинового интермедиата [23]. В результате реакции возможно образование смеси [6,6]-закрытого (фуллеренового) и [5,6]-открытого (фуллероидного) аддуктов. Так, синтезированы различные аминокислот-

ные и пептидные производные (14) посредством конденсации (по методу активированных эфиров) с соответствующими аминокислотами и пептидами метано[60]фуллеренового производного карбоновой кислоты (13), полученного из тозилгидразона (12) [24].

Аналогично карбенам ведут себя в реакциях циклоприсоединения к фуллерену  $\text{C}_{60}$  и их азотистые аналоги – нитрены, генерируемые *in situ*, например, термическим разложением азидов [25]. Так, разработан эффективный метод диполярного присоединения к фуллерену  $\text{C}_{60}$  защищенных азидоаминокислот, таких как, например, производное фенилаланина (15) или соответствующее производное лизина. В процессе реакции образуются хроматографически разделяемые смеси производных фуллерена [26] –  $\text{C}_{60}$ -азириндин- $\alpha$ -Вос-Phe-OH (16a) или  $\text{C}_{60}$ -азириндин- $\alpha$ -Вос-Lys-OH ([6,6]-структуры), а также  $\text{C}_{60}$ -аза- $\alpha$ -Вос-Phe-OH (16b) или  $\text{C}_{60}$ -аза- $\alpha$ -Вос-Lys-OH ([5,6]-структуры) (рис. 6, приведен пример для производного фенилаланина).

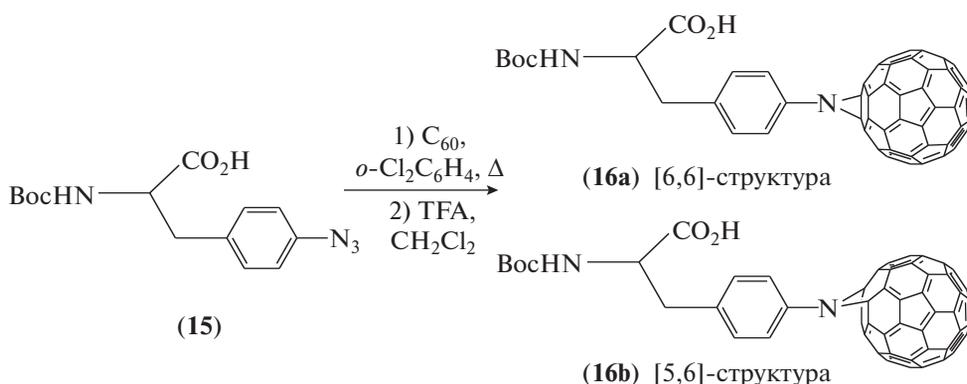


Рис. 6. Реакция циклоприсоединения к фуллерену C<sub>60</sub> нитренов, генерируемых при термоллизе азидов.

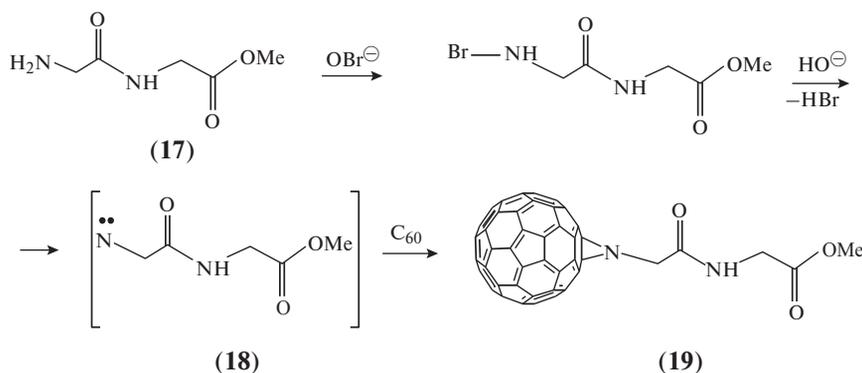


Рис. 7. Реакция циклоприсоединения к фуллерену C<sub>60</sub> нитрена, генерируемого в окислительном процессе из дипептида.

Разработан эффективный метод циклоприсоединения органических азидов к фуллерену под действием стехиометрических количеств Cu(OTf)<sub>2</sub> с получением индивидуальных азиридинофуллеренов, в частности азиридино[60]фуллерена с остатком метилового эфира масляной кислоты [27].

Продемонстрирована также возможность окислительного генерирования нитрена (18) из дипептида – метилового эфира глицилглицина (17). Такой подход позволил синтезировать фуллеренидный дипептид (19) (рис. 7) [28].

#### Реакции [2 + 3]-циклоприсоединения

Один из наиболее перспективных путей аннелирования к молекуле фуллерена C<sub>60</sub> пятичленных гетероциклических фрагментов связан с использованием реакций [2 + 3]-циклоприсоединения разнообразных 1,3-диполей. В работе [29] обобщены данные по реакциям 1,3-диполярного присоединения к фуллерену C<sub>60</sub>. Впервые о способности электронодефицитного полиена C<sub>60</sub> выступать в роли 1,3-диполярофила сообщено в 1991 г. на Симпозиуме по химии больших углеродных кластеров [30]. Среди успешных методологий функционализации наиболее широкое

применение получил подход с использованием 1,3-диполярного циклоприсоединения к фуллерену азометинилидов, приводящий к образованию фуллеропирролидинов [7]. Наиболее эффективный метод генерирования азометинилидов заключается в декарбоксилации иммониевых солей, образующихся при конденсации α-аминокислот с альдегидами. Этот метод в литературе называется реакцией Прато [3]. Классический пример реализации такого подхода – реакция между N-метилглицином (саркозином, (20)), формальдегидом и фуллереном C<sub>60</sub> в среде кипящего толуола, которая через циклоприсоединение промежуточного азометинида (21) приводит к образованию N-метилированного фуллеропирролидина (22) (рис. 8) [7, 31].

Основные преимущества этой реакции состоят в следующем:

1) происходит образование индивидуальных [6,6]-закрытых изомеров;

2) возможно осуществление взаимодействия с широким рядом α-аминокислот, а также альдегидов или кетонов;

3) два заместителя могут быть введены в пирролидиновый цикл фуллеренового производного (23) одновременно [7, 31], как это показано на рис. 9.

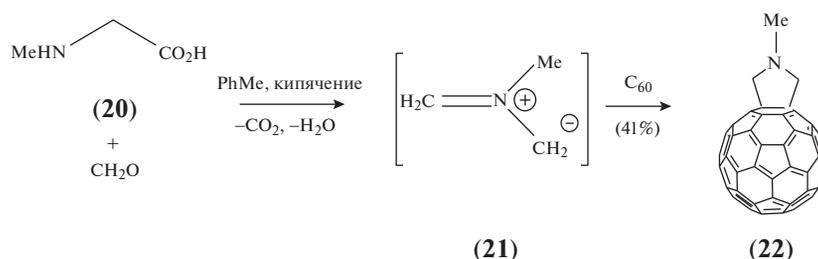


Рис. 8. Реакция циклоприсоединения к фуллерену  $C_{60}$  *N*-метилглицина (саркозина) при генерировании азометинида (реакция Прато). Получение *N*-метилированного 2,5-незамещенного фуллеропирролидина.

Использование для аналогичного генерирования 1,3-диполей вместо саркозина *N*-незамещенных аминокислот (**24**) приводит к получению *N*-незамещенных фуллеропирролидинов (**25**), функционализация которых по атому азота открывает новые синтетические возможности, причем в реакции Прато, как и в других реакциях 1,3-дипольного циклоприсоединения, оказалось эффективным применение микроволнового излучения (рис. 10) [32].

Важно отметить, что при участии неэтерифицированных аминокислот реакция Прато сопровождается декарбоксилированием. Так, получен целый ряд различным образом замещенных фуллеропирролидинов [33–36].

Изучены реакции фуллерена  $C_{60}$  с аминокислотами в среде *o*-дихлорбензола при отсутствии альдегида [35, 36]. Такой подход оказался эффективным, например, для синтеза *N*-незамещенных, но симметрично 2,5-дизамещенных (остатками аминокислот), а также 2,5-незамещенных (в реакции с Gly) фуллеропирролидинов (**26**) (рис. 11).

Исследованы также реакции фуллерена  $C_{60}$  с *N*-алкилглицинами в присутствии и при отсутствии альдегидов, проводившиеся без растворителя в условиях высокоскоростного вибрационного измельчения. При этом *N*-алкилированные 2-замещенные и незамещенные фуллеропирролидины получены с умеренными выходами (18–30%). Предложен механизм этой реакции, включающий процесс электронного переноса [37].

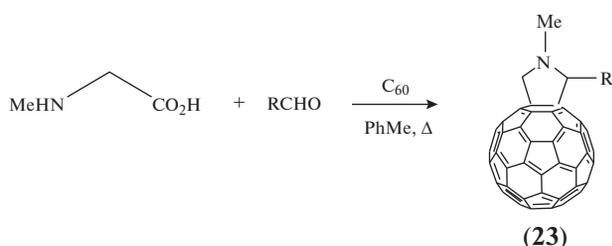


Рис. 9. Реакция циклоприсоединения к фуллерену  $C_{60}$  аминокислот (по Прато). Получение *N*-метилированных 2-замещенных фуллеропирролидинов.

Водорастворимые [60]фуллеропирролидины (**28**) в виде аммонийных солей получены посредством *N*-метилирования иодистым метилом соответствующих *N*-моноалкилированных фуллеропирролидинов (**27**) (рис. 12) [38].

По реакции Прато получены 2,5-незамещенный фуллеропирролидин (**29**), непосредственно функционализированный аминокислотой (рис. 13а) [39], а также фуллеропирролидины (**30**) и (**31**), в которых возможно осуществлять дальнейшее наращивание пептидной цепи, связанной с пирролидиновым циклом через спейсер [40–42] (рис. 13б и 13в).

Разработан синтез класса ортогональнозащищенных бисфуллеропирролидиновых аминокислот (**32**) посредством двух [2 + 3]-циклоприсоединений азометинилов к фуллерену  $C_{60}$  (рис. 14). Так, производное (**32**) можно рассматривать как модель пептидомиметика, в котором фуллереновый кор встроен в структуру пептида [43].

Ацилирование NH-фуллеропирролидина, например, Вос-защищенным глицилглициновым ангидридом, позволило получить соответствующее аминокислотное производное (**33**) и использовать его в дальнейшем пептидном синтезе (рис. 15) [44].

Синтез  $\alpha$ -замещенных фуллерениламиноакилот (**37**) – фуллеропролинов (FPr) – возможно осуществить посредством присоединения азометинилов к фуллерену  $C_{60}$  [7, 45, 46]. Интермедиат (**36**) – азометиниловый ирид – может быть генерирован двумя альтернативными путями: с одной стороны – при использовании таутомеризации

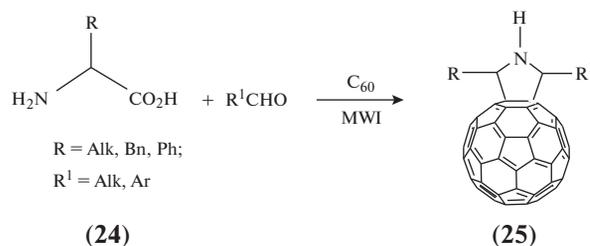
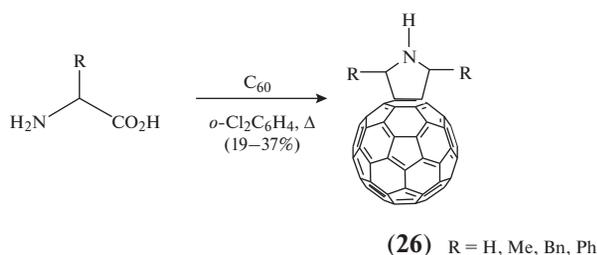


Рис. 10. Реакция циклоприсоединения к фуллерену  $C_{60}$  аминокислот (по Прато). Получение *N*-незамещенных, но 2,5-дизамещенных фуллеропирролидинов.



**Рис. 11.** Реакция циклоприсоединения к фуллерену C<sub>60</sub> аминокислот (по Прато). Получение *N*-незамещенных, но 2,5-симметрично дизамещенных или 2,5-незамещенных фуллеропирролидинов.

иминиевой соли, образуемой в процессе конденсации эфира  $\alpha$ -аминокислоты (**34a**) с альдегидом (**35**), а с другой стороны – посредством термического раскрытия цикла азиридина (**34b**) (рис. 16).

Вышеупомянутые реакции циклоприсоединения сделали доступным значительное число производных FPr с использованием различных комбинаций эфиров  $\alpha$ -аминокислот и альдегидов. Фуллеропронины в этом случае могут быть получены как с незащищенной аминогруппой пирролидинового фрагмента (**38a**) [47], так и с защищенной аминогруппой (**38b**) [48], причем последующее наращивание пептидной цепи возможно реализовать как с *C*-, так и с *N*-конца (рис. 17). Однако следует отметить, что производное FPr с незащищенной аминогруппой (**38a**) не удается выделить в кристаллическом виде, т.к. оно весьма лабильно [46] и относительно устойчиво только в разбавленных растворах.

Присоединение к фуллерену C<sub>60</sub> азиридина (**39**) в условиях термолита позволило получить *N*-защищенный фуллеропронин (**40**) (рис. 18). При обработке аддукта (**40**) посредством TFA образуется соль вторичного амина (**41**), последующая реакция которой с уксусным ангидридом приводит к получению *N*-ацетилированного производного (**42**) [48].

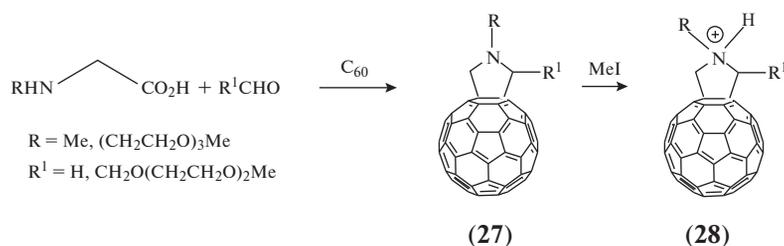
В результате реакции гидрохлоридов эфиров  $\alpha$ -аминокислот и сероуглерода CS<sub>2</sub> с фуллереном C<sub>60</sub> в присутствии триэтиламина получены произ-

водные тиолактама (**43**) как основного продукта реакции (рис. 19) [49]. Тиолактаманная группировка в соединении (**43**) чувствительна к влаге и легко подвергается гидролизу, приводящему к получению соответствующих лактамов.

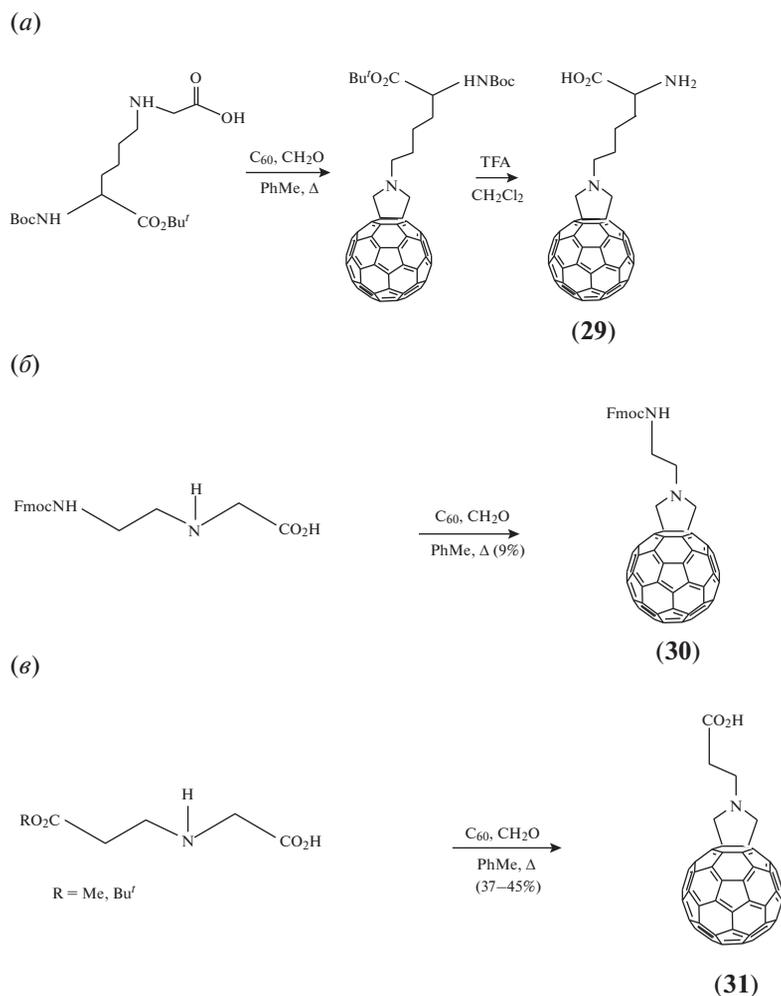
Тандемная ретрореакция Бингеля–Хирша, осуществляемая при присоединении к фуллерену C<sub>60</sub> дифенилиминоглицинатов (**44**) с последующей обработкой NaCNBH<sub>3</sub> в присутствии BF<sub>3</sub>/Et<sub>2</sub>O в среде дихлорметана, приводит к получению 1,2-аддуктов (**46**) (рис. 20). Первоначально предполагали, что на первой стадии в результате [2 + 1]-циклоприсоединения образуется соответствующий метано[60]фуллерен (**45a**) [50, 51], однако в дальнейшем – в результате более детальных исследований с использованием метода ЯМР – было выяснено, что имеет место [2 + 3]-циклоприсоединение с образованием аддукта (**45b**), содержащего аннелированный к фуллерену дигидропирроловый, а не циклопропановый фрагмент [52]. Обработка циклического аддукта (**45b**) посредством NaCNBH<sub>3</sub> и BF<sub>3</sub>/Et<sub>2</sub>O способствует восстановительной дециклизации, приводящей к получению *N*-бензгидрил[60]фуллеренилглицината (**46**), который в процессе деблокирования аминогруппы и дальнейшего *N*-ацетилирования превращается в устойчивый фуллеренилглицинат (**47**) [52].

Кеталь метиленициклопропанона (**48**) нашел эффективное применение в качестве синтона в реакции присоединения к фуллерену C<sub>60</sub> [53]. Фуллереновое циклопентильное производное (**49a**) (после хроматографической очистки от побочного продукта (**49b**)), использовано для дальнейшей конденсации с аминокислотой для получения целевого производного (**50**) (рис. 21) [54].

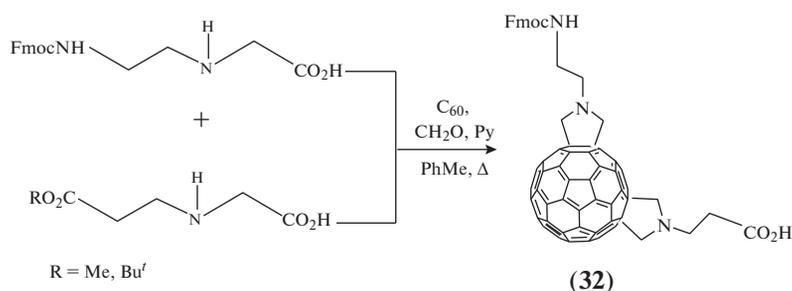
Исследованы реакции фуллерена C<sub>60</sub> с бензилхлоридами и аминокислотами в среде хлорбензола и ДМСО. Так, получены фуллеропирролидины, несущие мотивы PhCH– от бензилхлорида, образующиеся через расщепление связи углерод–хлор. Изучены реакции и с другими галогенидами, такими как аллилхлорид, циннамилхлорид, пропаргилбромид, этилбромид и прочими. Показано, что использование смеси растворителей



**Рис. 12.** Реакция циклоприсоединения к фуллерену C<sub>60</sub> аминокислот (по Прато) с получением фуллеропирролидинов в виде аммонийных солей.



**Рис. 13.** Реакция циклоприсоединения аминокислот или пептидов к фуллерену  $C_{60}$  (по Прато) с получением *N*-функционализированных 2,5-незамещенных фуллеропирролидинов, связанных непосредственно с аминокислотой (a) или через спейсер: с возможностью наращивания цепи с *N*- (b) или *C*- (c) конца.



**Рис. 14.** Реакция циклоприсоединения к фуллерену  $C_{60}$  аминокислот или пептидов (по Прато) с получением ортогональнозащищенных бисфуллеропирролидиновых аминокислот.

хлорбензол—ДМСО вместо хлорбензола существенно улучшает эффективность реакции [55].

#### Реакции [2 + 4]-циклоприсоединения

Расширяет арсенал методов получения фуллеренсодержащих синтонов реакция [2 + 4]-цикло-

присоединения (реакция Дильса—Альдера). Так, вторичный спирт (53) может быть получен посредством циклоприсоединения 2-[(триметилсилил)окси]-1,3-бутадиена (51) к фуллерену  $C_{60}$  при кипячении в растворе толуола с последующим гидролизом и дальнейшим восстановлением соответствующего, аннелированного к фуллерену

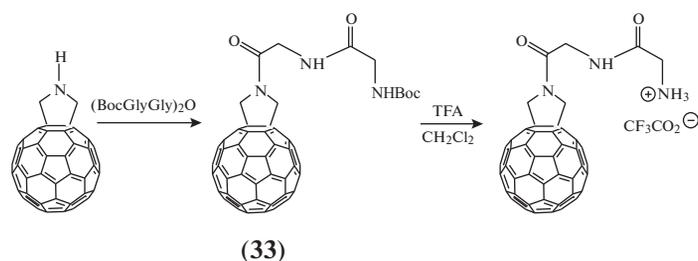


Рис. 15. Реакция ацилирования NH-[60]фуллеропирролидина Вос-защищенным глицилглициновым ангидридом.

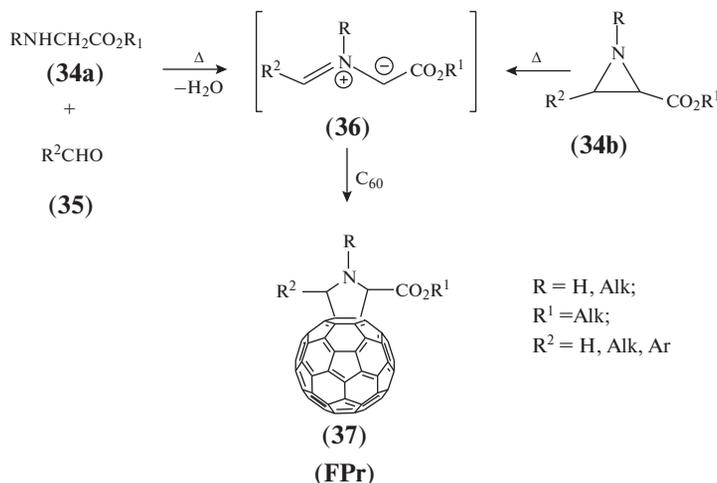


Рис. 16. Реакция присоединения азометиновых илидов к фуллерену C<sub>60</sub>, приводящая к получению α-замещенных фуллерениламино кислот (фуллеропролинов, FPr).

циклического кетона (52) диизобутиламмоний-гидридом (DIBAL-H) [56]. Конденсация синтона (53) с *N*-защищенными α-аминокислотами при участии реагентов DCC и DMAP позволяет с высокими выходами получать соответствующие этерифицированные аминокислотные производные (54) (рис. 22).

С другой стороны, наряду с этерифицированными производными, получены производные аминокислот, замещенные фуллеренсодержащим фрагментом, связь с которым осуществляется через периферический атом азота. Так, конденсацией кетона (56) с эфиром *N*<sup>α</sup>-защищенного *n*-аминофе-

нилаланина (55) получен соответствующий имин (57). После гидридного восстановления связи C=N фуллереновое производное (58) вводили в последующие реакции пептидного синтеза (рис. 23) [57].

Реакция Дильса–Альдера с успехом использована и для синтеза дикарбааналога цистина. Так, конденсация диена (59) с фуллереном C<sub>60</sub> при кипячении в толуоле позволила получить стабильный циклоаддукт (60) (рис. 24) [58].

Термолиз сульфона (61) (получаемого конденсацией 4-хлорпиримидина с соответствующей α-аминокислотой), осуществляемый в присут-

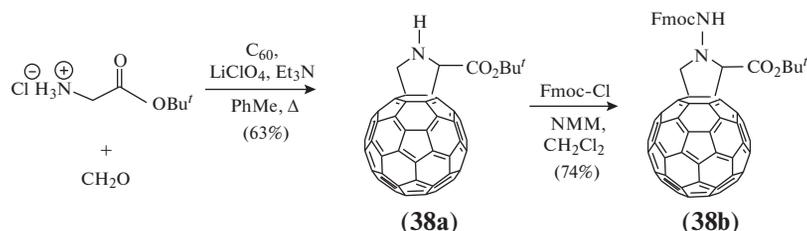


Рис. 17. Реакция циклоприсоединения к фуллерену C<sub>60</sub> аминокислот (по Прато). Получение фуллеропролинов с незащищенной или защищенной аминогруппой пирролидинового фрагмента.

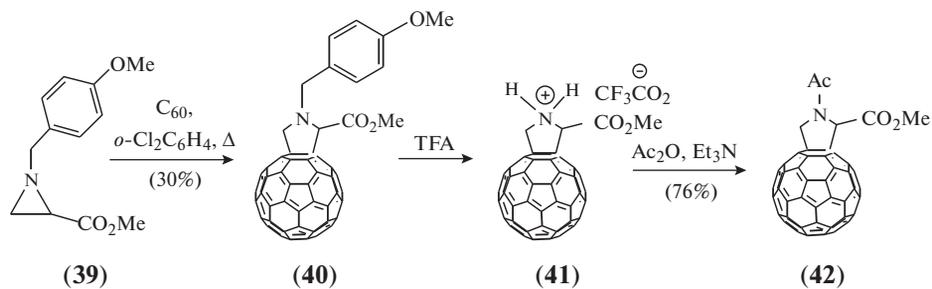


Рис. 18. Получение фуллеропропинов при присоединении к фуллерену  $C_{60}$  азиридиновых производных в условиях термолита.

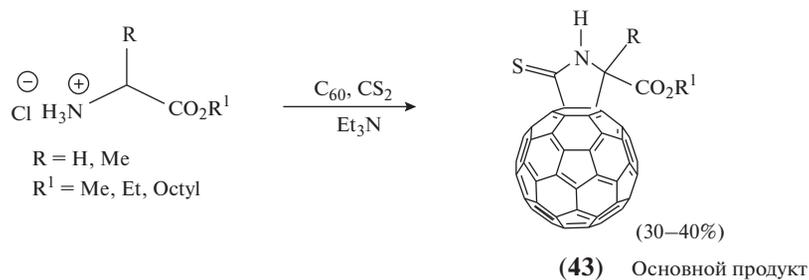


Рис. 19. Реакция получения тиолактамных фуллереновых производных при циклоприсоединении к фуллерену  $C_{60}$  эфиров  $\alpha$ -аминокислот в присутствии сероуглерода.

ствии фуллерена  $C_{60}$  в растворе 1,2,4-трихлорбензола в инертной атмосфере по реакции Дильса–Альдера, протекающей через промежуточное пиримидин-*o*-хинодиметановое производное аминокислоты, приводит к образованию соответствующего фуллеренсодержащего аминокислот-

ного производного (62), содержащего аннелированные циклогексановый и пиримидиновый циклы, играющие роль спейсеров (рис. 25) [59].

Сообщается о синтезе бензаннелированных фуллеренсодержащих аминокислотных производных (64), несущих индановый структурный фраг-

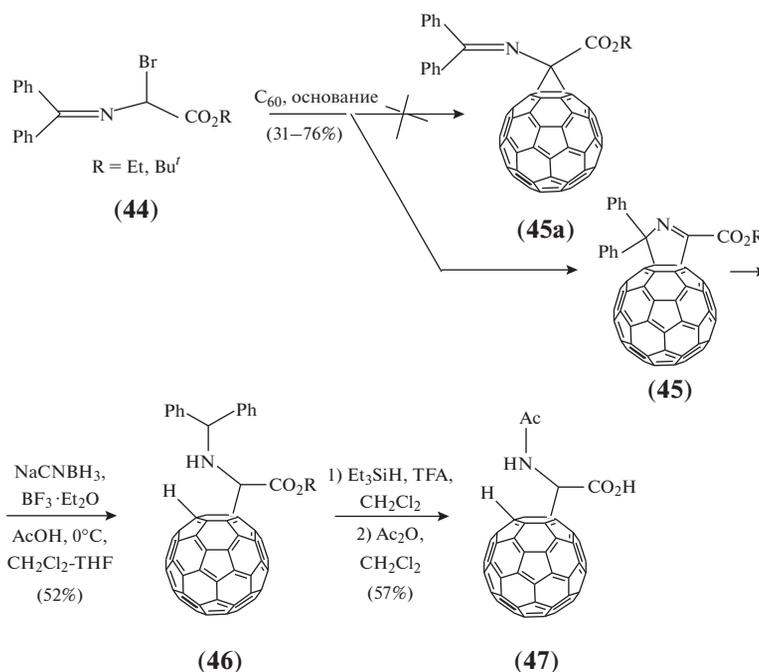


Рис. 20. Тандемная ретрореакция Бингеля–Хирша присоединения к фуллерену  $C_{60}$  дифенилиминоглицилатов.

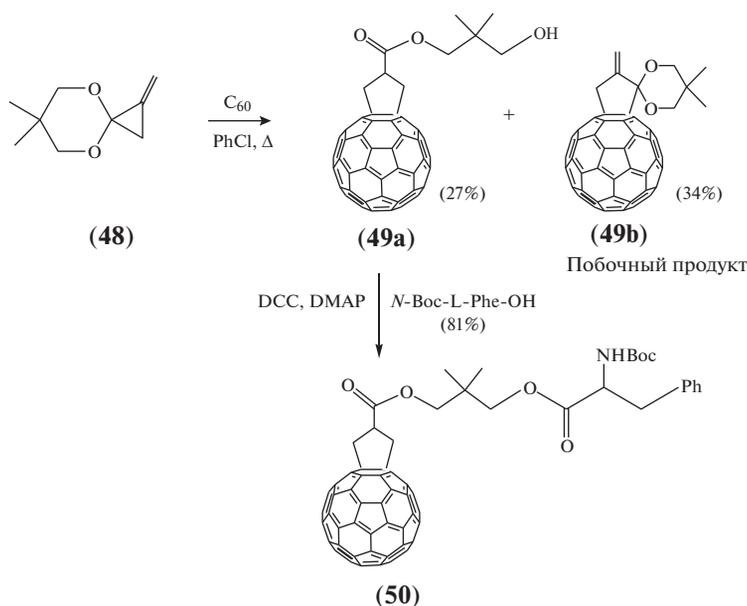


Рис. 21. Реакция циклоприсоединения к фуллерену C<sub>60</sub> кетала метиленициклопропанона.

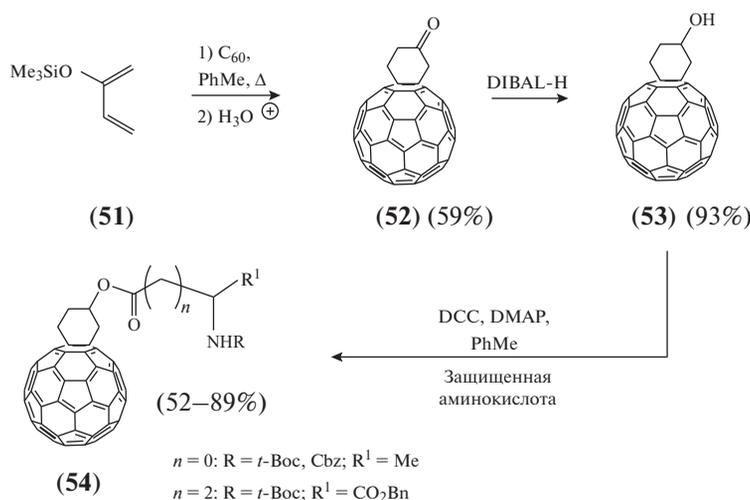


Рис. 22. Реакция циклоприсоединения (по Дильсу–Альдеру) с участием аннелированного к фуллерену C<sub>60</sub> циклического кетона и производного 1,3-бутадиена.

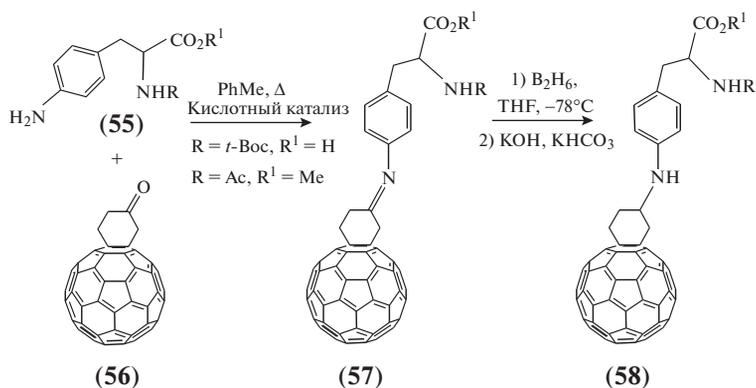
мент и получаемых с использованием сульфитного производного (63), выступающего в роли активного диенового компонента (рис. 26) [60].

#### Реакции радикального присоединения

Реакции фотолиза представляют собой альтернативный метод для получения фуллереносодержащих аминокислотных производных. Производные FPr образуются в результате фотолиза эфиров α-аминокислот [61–64]. Присутствие кислорода в реакционной среде, по-видимому, способствует ускорению фотореакции. Например, в результате

фотохимической реакции при конденсации фуллерена C<sub>60</sub> с *N*-замещенными эфирами глицина (65a) и (65b) получены (с выходами до 35%) соответствующие ряды [60]фуллеропирролидинов (66) и (67), в которых представлены 2,5-симметрично дизамещенные аддукты (рис. 27) [61].

В числе других примеров реакций радикального присоединения α-аминокислот к фуллерену C<sub>60</sub> можно упомянуть процессы, сопровождающиеся фотолитическим декарбоксилированием и приводящие к образованию 1,2-аддуктов [48, 65]. Так, фотохимическая реакция конденсации фуллерена C<sub>60</sub> с пиперидинуксусной и морфолинук-



**Рис. 23.** Получение замещенных [60]фуллеренсодержащим фрагментом производных аминокислот, связанных через периферическую аминогруппу.

сусной кислотами в смеси метанола и толуола приводит к декарбоксилированию с образованием 1,2-аддуктов (69) — соответствующих пиперидиновых (68a) и морфолиновых (68b) производных. Однако осуществление в тех же условиях фотохимической реакции фуллерена  $\text{C}_{60}$  с метиловыми эфирами пиперидинуксусной (70a) и морфолинуксусной (70b) кислот приводит к получению соответствующих фуллеропирролидиновых производных (71) (рис. 28) [65].

#### Реакции нуклеофильного присоединения

Благодаря высокой нуклеофильности первичные и вторичные алифатические амины легко присоединяются к электронодефицитному фуллерену  $\text{C}_{60}$ . Хотя присоединение первичных и вторичных аминов — один из первых описанных процессов модификации фуллерена, он значительно сложнее, чем присоединение C-нуклеофилов, а состав продуктов присоединения зависит от условий проведения реакции. Процесс присоединения аминов к фуллерену  $\text{C}_{60}$  многостадийный. Сначала имеет место одноэлектронный перенос от амина (72) к молекуле  $\text{C}_{60}$ . На следующем этапе происходит рекомбинация аммонийного катион-радикала (72a) и фуллеренового анион-радикала (73), приводящая к образованию

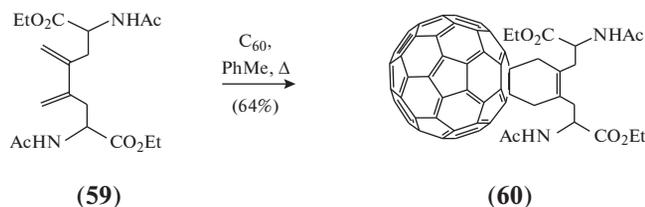
биполярного интермедиата (74). На заключительном этапе осуществляется перенос протона от азота к атому углерода фуллерена с образованием продукта присоединения (75) (рис. 29) [30, 66–68].

Впервые о присоединении аминокислот и дипептидов (76) к фуллерену  $\text{C}_{60}$  с образованием соответствующих моноаддуктов (77) сообщили В.С. Романова и соавт. (рис. 30) [69]. Показано, что реакция протекает при смешивании раствора фуллерена  $\text{C}_{60}$  и аминокислоты или дипептида при 50–100°C. Состав полученных аддуктов фуллерена  $\text{C}_{60}$  и аминокислоты или дипептида (АДФ) изучен методом аминокислотного анализа, проведенного после деструкции синтезированных соединений при нагревании в присутствии 6 н. HCl. Результаты анализа показали удовлетворительное соответствие стехиометрическому соотношению  $\text{C}_{60}$  : аминокислота (или дипептид) = 1 : 1 [69–71]. Обсуждаемый синтетический подход открыл широкие перспективы для получения водорастворимых физиологически активных производных фуллерена на основе аминокислотных (пептидных) аддуктов.

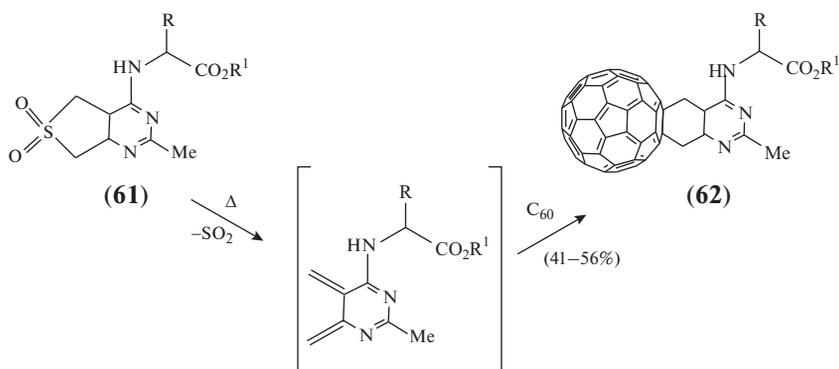
Эффективным физико-химическим методом доказательства строения полученных аминокислотных моноаддуктов фуллерена  $\text{C}_{60}$  оказалась спектроскопия твердотельного ЯМР [72].

Сообщалось также о получении аминокислотных производных (моноаддуктов) фуллерена  $\text{C}_{60}$  в присутствии ониевых солей, таких как тетрабутиламмонийбутоксид  $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{OBu}^-$  или тетраэтилфосфонийхлорид  $\text{Et}_4\text{P}^+\text{Cl}^-$  [73, 74], краун-эфира 18-краун-6 [75], а также полиэтиленгликоля (PEG-400) [74, 76].

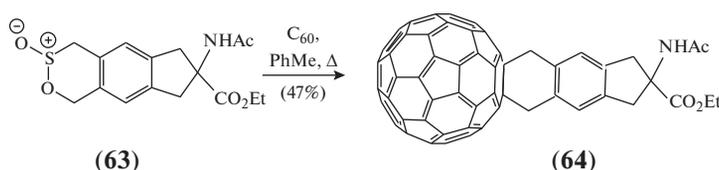
С другой стороны, имеются данные о том, что при реакции фуллерена  $\text{C}_{60}$  с аминокислотами в основной среде образуются только полиаддукты фуллерена, содержащие, кроме остатков аминокислот, гидроксильные и, вероятно, карбонильные группы. Продукты реакции выделены хрома-



**Рис. 24.** Реакция циклоприсоединения (по Дильсуэ–Альдеру), приводящая к получению [60]фуллеренсодержащего циклоаддукта — дикарбааналога цистина.



**Рис. 25.** Реакция циклоприсоединения (по Дильсу–Альдеру) к фуллерену C<sub>60</sub> производного сульфона, приводящая к получению фуллеренового аминокислотного производного, содержащего в качестве спейсеров аннелированные циклогексанный и пиримидиновый циклы.



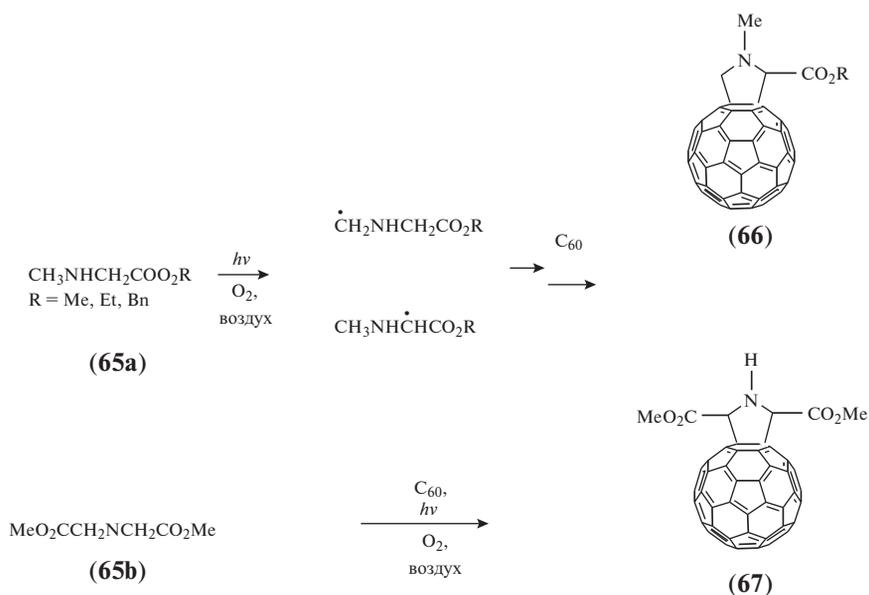
**Рис. 26.** Реакция циклоприсоединения (по Дильсу–Альдеру) к фуллерену C<sub>60</sub> сульфинового производного, приводящая к получению бензаннелированных фуллереносодержащих аминокислотных производных с индановой основой.

тографически и охарактеризованы посредством ЯМР, а также методами рентгеновской фотоэлектронной (РФЭ), УФ- и ИК-спектроскопий [77].

Примеры синтезов, дополняющие вышеизложенные методы получения АПФ (в частности, посредством образования связи углерод–азот при

присоединении *N*-нуклеофилов к фуллереновому кору), представлены в литературных источниках [78–80].

Предложен подход к дальнейшей модификации аминокислотных производных фуллерена [79, 81]. Существенно расширить разнообразие



**Рис. 27.** Реакция образования фуллеропрوليновых производных при радикальном присоединении к фуллерену C<sub>60</sub> эфиров α-аминокислот (в условиях их фотолиза).

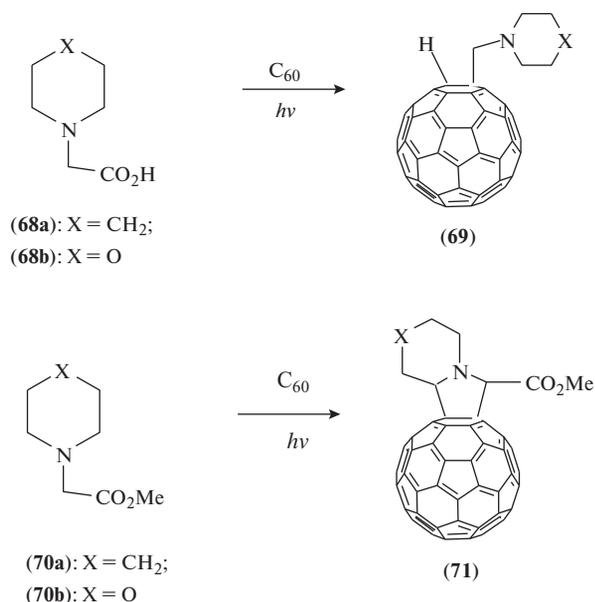


Рис. 28. Фотохимические реакции конденсации фуллерена C<sub>60</sub> с пиперидинуксусной и морфолинуксусной кислотами.

АПФ оказалось возможным при создании на основе фуллерена гибридных структур, таких как соединения (79), получаемых за счет присоединения к АПФ (78) второго адденда (ADDEND-2) посредством замещения атома водорода, введенного в структуру фуллерена в процессе предшествующего присоединения аминокислоты (ADDEND-1) (рис. 31). Такие гибридные производные фуллерена (ГПФ) или гибридные соединения фуллеренов (ГСФ) открыли возможность создания широкого набора биосовместимых соединений с помощью комбинаций двух различных аддендов, один из которых, представленный фрагментом аминокислоты, придает фуллереновому ядру водорастворимость и мембранотропность, а второй — привносит дополнительные свойства биологической активности, в том числе усиление антиоксидантной активности, способность донировать оксид азота, выступать фотосенсибилизатором или ингибировать ключевые ферменты. Например, на основе

этого подхода было синтезировано ГПФ, представляющее собой аддукт фуллеренил-ε-аминокапроновой кислоты с комплексом кобальт–витамин В<sub>12</sub> (CN-Cbl-B<sub>12</sub>-C(O)OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C<sub>60</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>COOCH<sub>3</sub>) [82].

На основании квантово-химических расчетных данных [83] сделан вывод о том, что присоединение α-аминокислот или пептидов к фуллерену C<sub>60</sub> происходит по двойной связи шестичленных циклов полиеновой системы с образованием 1,2-изомеров. Присоединенный к фуллереновому кору в аддукте атом водорода склонен к дальнейшему замещению [84], однако его замена на второй заместитель может быть стерически затруднена в вицинальных положениях 1 и 2, и такая ситуация способствует образованию изомерного 1,4-аддукта. Строение второго заместителя влияет не только на химические свойства получаемых соединений, но и на площадь контакта фуллеренового остова с водой и как следствие — на механизм сольватации [85].

#### Альтернативные методы синтеза

Следует также упомянуть и об альтернативных способах синтеза аминокислотных производных фуллерена C<sub>60</sub>. Так, Rh-катализируемое сочетание (по типу реакции Сузуки–Мияуры) фуллерена C<sub>60</sub> с производным бороновой кислоты (80), защищенным по амино- и карбоксильной группам фенилаланина, позволила получить арилированный 1,2-аддукт (81) (рис. 32) [86].

Описан метод связывания аминокислотных и пептидных производных с фуллереном C<sub>60</sub> при использовании гидрофосфинирования со вторичным фосфинбораном. Так, электрохимический процесс гидрофосфинирования фуллерена C<sub>60</sub> с втор-фосфин-борановыми производными (82) в условиях межфазного катализа в результате образования связи фосфор–углерод приводит к получению соответствующих фуллереновых аминокислотных и дипептидных производных (83), содержащих фосфинборановый линкер (рис. 33) [87].

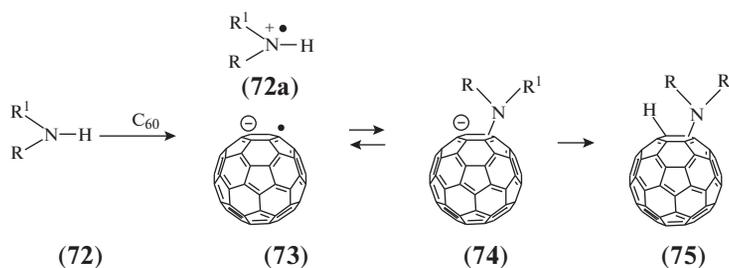
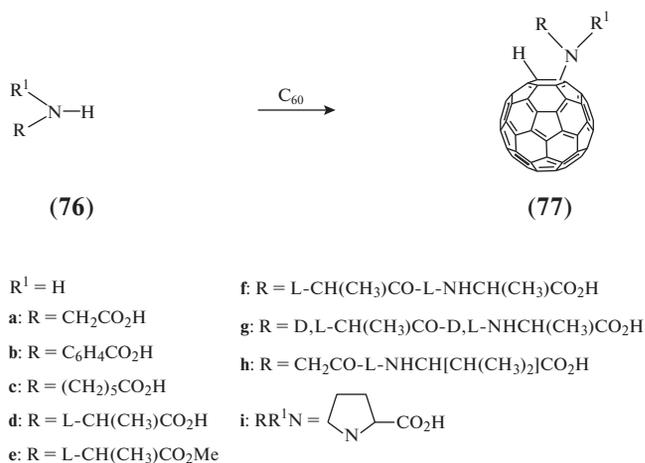


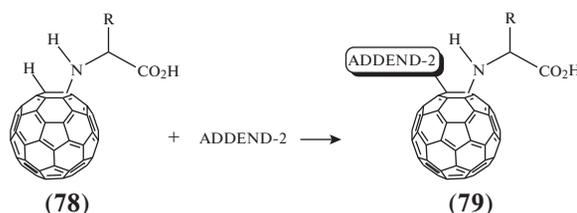
Рис. 29. Реакция нуклеофильного присоединения аминов к фуллерену C<sub>60</sub>.

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РАСТВОРОВ [60]ФУЛЛЕРЕНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ И ПЕПТИДОВ**

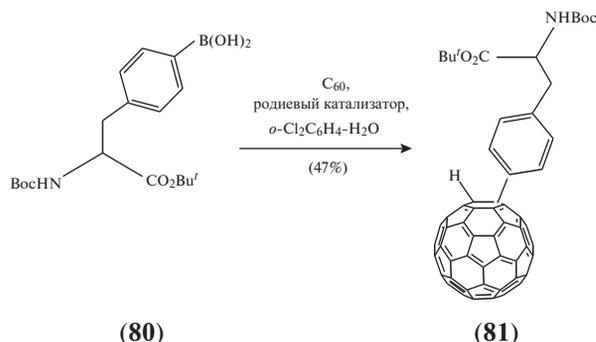
Фуллерены и их производные в дисперсных системах способны к образованию ассоциатов. Самоорганизующиеся ассоциаты производных фуллера C<sub>60</sub> – *N*-(моногофуллеренил)-производных аминокислот и пептидов (АПФ) – как в водных [71, 88–91], так и в неводных [90–92] растворах исследовались методом электронной микроскопии. Изучены *N*-(моногофуллеренил)-L-аланин (H-C<sub>60</sub>-L-Ala-OH), *N*-(моногофуллеренил)-L-аланил-L-аланин (H-C<sub>60</sub>-L-Ala-L-Ala-OH) и *N*-(моногофуллеренил)глицил-L-валин (H-C<sub>60</sub>-Gly-L-Val-OH). Способность АПФ к самоорганизации, т.е. к образованию ассоциатов, появляется в силу присутствия в молекуле гидрофобного (фуллеренового) фрагмента [88], в то время как гидрофильный (аминокислота или дипептид) фрагмент способствует термодинамической стабильности образующихся коллоидных частиц. Первоначально методом электронной микроскопии было установлено, что аминокислотные и дипептидные производные в водных растворах образуют анизодиметрические мицеллы с размерами в пределах 0.5–10 мкм [88]. Однако более поздние исследования, осуществленные на основе диффузионного метода [89] и метода динамического рассеяния света [93], показали, что реальные размеры ассоциатов, хотя и могут достигать значений сотен нанометров и даже нескольких микрометров, но обычно находятся в диапазоне от единиц до нескольких десятков нанометров. В работе Белавцевой с соавт. [89] отмечено, что в ряде случаев в исследуемых объектах наблюдается изменение размеров ассоциатов при изменении концентрации раствора, однако у некоторых объектов изменение концентрации в диапазоне концентраций 75–150 мг/л не приводило к изменению коэффициента диффузии и, соответственно, размеров ассоциатов. Также в работе В.А. Волкова и соавт. [93] во флуоресцентной системе продемонстрировано, что антирадикальная активность, связанная отрицательной линейной взаимосвязью со средним размером наночастиц, находится в линейной зависимости от концентрации добавляемых соединений в диапазоне 10<sup>-7</sup>–10<sup>-6</sup> М, что указывает на сохранение размерных характеристик наночастиц при разбавлении раствора. Выдвинуто предположение о том, что в водных растворах АПФ самоорганизуются таким образом, что на поверхности мицелл находятся гидрофильные аминокислотные или пептидные фрагменты, а гидрофобная (фуллереновая) часть расположена внутри мицеллы. Сама мицелла может быть наполнена растворителем или представлять собой конгломерат аминокислотных (или пеп-



**Рис. 30.** Реакция нуклеофильного присоединения аминокислот и дипептидов к фуллерену C<sub>60</sub>.

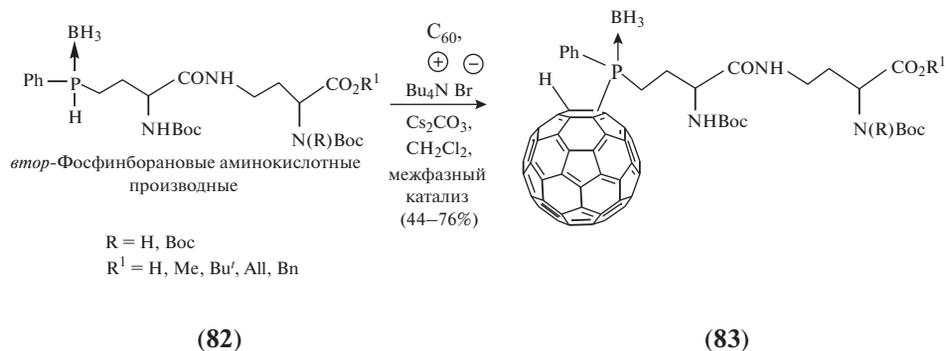


**Рис. 31.** Получение гибридных производных фуллера C<sub>60</sub> на основе последовательного взаимодействия с двумя различными аддендами.



**Рис. 32.** Rh-катализируемое сочетание (по типу реакции Сузуки–Мияуры) фуллера C<sub>60</sub> с аминокислотным производным бороновой кислоты.

тидных) производных фуллера, в котором либо содержится небольшое количество растворителя, либо вовсе не содержится растворитель [89]. Методом электронной микроскопии установлено, что нерастворимые в воде АПФ (но растворимые в ДМСО и пиридине) также способны образовывать в растворах мицеллоподобные частицы, однако их строение отличается от строения ассоциатов в водных растворах: они плотнее и имеют бо-



**Рис. 33.** Связывание аминокислотных и пептидных производных с фуллереном  $C_{60}$  в электрохимическом процессе его гидрофосфинирования *втор*-фосфин-борановыми производными.

лее сферическую форму [92, 94]. Кроме того, удалось проследить структурообразование ассоциатов водонерастворимых АПФ в органических растворителях. На первом этапе происходит самосборка мицеллоподобных структур. Сначала образуются ассоциаты пластин произвольной формы, затем формируются мицеллоподобные структуры овальной формы с рыхлоупакованными пластинами. Далее пластины плотно упаковываются, количество растворителя и пустот в мицеллоподобной структуре уменьшается, и образуются компактные частицы овальной формы с гладкой поверхностью. Наряду с процессом структурирования, с течением времени в растворах наблюдается разрушение мицеллоподобных структур [90, 94].

Исследования диффузии АПФ (моно-, а также дзамещенных производных, в том числе их эфиров) в разбавленных водных растворах позволили установить, что эти соединения могут находиться в растворе как в виде изолированных молекул, так и в виде ассоциатов. Кроме того, показано, что степень ассоциации зависит от природы аминокислоты (дипептида), т.е. от гидрофильно-гидрофобного баланса молекулы, а также концентрации, pH раствора и его ионной силы. При этом в определенных случаях ассоциация отсутствует, и растворы являются истинными [85, 95–100].

Методом сканирующей дифференциальной калориметрии измерены концентрационные зависимости теплоемкости водных растворов некоторых АПФ при 298 К [101]. Показано, что теплоемкость растворенных в воде АПФ, таких как  $H-C_{60}-L-Arg-OH$ ,  $H-C_{60}-L-Ala-L-Ala-OH$  и  $H-C_{60}-Gly-L-Val-OH$ , слабо зависит от концентрации. Однако зависимости теплоемкости водных растворов АПФ, таких как  $H-C_{60}-L-Ser-OH$  и  $H-C_{60}-L-Ala-OH$ , описываются кривыми с экстремумами. Вычисленные значения вкладов гидратации в теплоемкость растворенных производных [60] фуллерена имеют как положительные, так и отрицательные значения. Следует отметить, что в случае отрицательных значений вкладов

гидратации преобладает гидрофильная гидратация. В ассоциатах АПФ ослабление гидрофобной гидратации, по-видимому, связано с тем, что фуллереновый фрагмент молекулы становится менее доступным для молекул воды. В то же время известно, что в составе фрагмента  $H-C_{60}$  алкильных фуллереновых производных атом водорода обладает протонной подвижностью [84] и образует водородные связи с водой, которые также образуются и с полярными группами самого заместителя [102]. По мере уменьшения гидрофобной гидратации доля гидрофильной гидратации увеличивается, и вклад гидратации в теплоемкость становится величиной, принимающей отрицательные значения. Возможно, что в этом случае имеет место конкуренция между процессами гидрофильной гидратации и гидрофобных взаимодействий с фуллереновым фрагментом.

Моноаддукты АПФ (в том числе их эфиры) изучены методом ИК-спектроскопии. Спектральные характеристики АПФ в области  $4000-400\text{ см}^{-1}$  сильно отличаются от таковых для исходных веществ. Так, в спектрах всех полученных соединений отсутствуют полосы поглощения исходного фуллерена  $C_{60}$  при  $1429, 1181, 577, 528\text{ см}^{-1}$  и присутствуют полосы поглощения аминокислотных или дипептидных остатков, в большинстве случаев находящихся в цвиттер-ионной форме. Характерная особенность спектральных характеристик этих производных – присутствие в спектрах группы, состоящей из трех полос:  $\sim 1108\text{ см}^{-1}$  (высокой интенсивности),  $960$  и  $840\text{ см}^{-1}$  (средней интенсивности), а также  $1250\text{ см}^{-1}$  (слабой интенсивности) [69, 71, 103].

С привлечением полуэмпирического квантово-химического метода, основанного на частичном пренебрежении дифференциальным перекрытием, исследованы структура и электронные УФ-спектры изомеров аминокислотных производных фуллерена  $C_{60}$ . Показано, что аддук-

ты-изомеры обладают C<sub>s</sub>-симметрией, и [6,6]-изомеры более устойчивы, чем [5,6]-изомеры [104].

Изучены спектры кругового дихроизма (КД) растворимых в воде солей продуктов взаимодействия фуллерена C<sub>60</sub> с оптически активными энантиомерами L-аланина и L-валина [105]. Характер полученных спектров однозначно указывает на сохранение стереохимии исходной аминокислоты в этих продуктах, т.е. на индукцию оптической активности аминокислотных фрагментов, ковалентно присоединенных к ахиральной сфере фуллеренового полиэдра. При сравнении спектров КД пептидных производных фуллерена C<sub>60</sub> продемонстрировано влияние строения пептидной цепи на величину асимметрической индукции. Например, спектральные характеристики (в водной среде) для пары аддуктов H-C<sub>60</sub>-L-Ala-OK и H-C<sub>60</sub>-Gly-L-Ala-OK (калиевые соли), в которой у дипептидного производного оптически активный фрагмент L-аланина отделен от каркаса фуллерена остатком глицина, показывают, что наблюдаются сдвиг полосы поглощения ( $\lambda_{\text{max}}$ ) в коротковолновую область спектра (530–490 нм) и резкое снижение значений величины молярного дихроизма, причем замена в пептидном фрагменте оптически активного L-аланина на глицин (как в аддукте H-C<sub>60</sub>-Gly-Gly-OK) приводит к исчезновению в спектре максимумов, характеризующих эффект Коттона [106].

Представлены расчетные данные значений констант ионизации pK<sub>a</sub> диссоциирующих групп аминокислотного производного фуллерена C<sub>60</sub> на примере аддукта H-C<sub>60</sub>-L-Ala-OH в водной среде. Полученные значения pK<sub>a</sub> указывают на то, что при физиологических значениях pH в указанном аддукте группа  $\alpha$ -NH нейтральна. Группа –COOH имеет более высокую кислотность (pK<sub>a</sub> = 4.2) в сравнении с группой –SH (pK<sub>a</sub> = 5.8) в фуллереновом фрагменте. С одной стороны, отмечается, что в аддукте наряду с цвиттер-ионом, содержащим заряженные группы –NH<sub>2</sub><sup>+</sup> и –COO<sup>–</sup>, образование цвиттер-иона с заряженными группами –NH<sub>2</sub><sup>+</sup> и C<sub>60</sub><sup>–</sup> маловероятно, и такую альтернативу можно не принимать во внимание при анализе путей переноса протона. С другой стороны, проведенные расчеты свидетельствуют о том, что присоединенный к фуллерену протон в моноаддуктах АПФ достаточно подвижен и в водных средах (при физиологических значениях pH) может легко отрываться. В последнем случае фуллереновый каркас несет отрицательный заряд. Возможность существования подобного ионизированного состояния необходимо учитывать при изучении распределения этих соединений между биологическими средами и их связывания с биологическими мишенями [107].

Изучены водные растворы аддукта H-C<sub>60</sub>-L-Arg-OH, и получены физико-химические данные, касающиеся зависимости его растворимости от температуры, плотности и электропроводности раствора от концентрации, а также значения величин K<sub>d</sub> и рефракции [108].

Методами флуориметрии и динамического светорассеяния показано, что наночастицы монозамещенных АПФ в водном растворе проявляют антирадикальные свойства [109], определяющее влияние на которые оказывает размер наночастиц, причем между этими параметрами наблюдается отрицательная корреляционная связь. Высказано предположение о том, что указанный эффект, вероятно, обусловлен стерическим фактором: при увеличении размеров наночастиц уменьшается величина отношения площади поверхности наночастицы к ее объему. Молекулы, заключенные внутри этого объема, оказываются труднодоступными для взаимодействия с радикалами, и соответствующее АПФ показывает меньшее значение величины относительной антирадикальной активности (ОАА). Результаты данных исследований, как и более ранние работы [110], подтверждают, что строение аминокислотного заместителя не оказывает существенного влияния на антирадикальные свойства АПФ. Показано [93], что механизм антиоксидантного действия аминокислотных производных фуллерена не связан с отдачей электрона либо переносом атома водорода. Эти соединения не обладают антипероксидной активностью и, по-видимому, ковалентно присоединяют радикалы по двойным связям.

Среди широкого ряда синтезированных к настоящему времени производных фуллерена C<sub>60</sub> выделяются ГПФ, содержащие, помимо аминокислотного или пептидного, дополнительный, например, малеимидный фрагмент. Оригинальную методику синтеза этих соединений предложили Жмак с соавт. [75]. Присутствие в аддуктах ГПФ малеимидной группы, способной ковалентно присоединять белки или нуклеиновые кислоты, позволяет использовать такие производные в качестве носителей лекарственных препаратов, а также в иммунологических тестах [111]. Кроме того, ГПФ можно применять в качестве эффективных модификаторов поверхности твердых тел для улучшения биосовместимости материалов биомедицинского назначения. Принципиальная возможность такой функциональности ГПФ обусловлена их способностью прочно адсорбироваться на твердой поверхности за счет аминокислотного остатка, регулировать гидрофобность поверхности материала благодаря своему бифильному строению, а также предотвращать (за счет фуллеренового кора) повреждение поверхности этого материала свободными радикалами. ГПФ, такие как Maleimide-C<sub>60</sub>-Gly-L-Val-OH (a), Maleimide-C<sub>60</sub>-

L-Val-L-Val-OH (б) и Maleimide-C<sub>60</sub>-L-Val-L-Val-L-Val-OH (в), охарактеризованы методом ИК-спектроскопии [112, 113]. В спектрах всех исследованных малеимидных ГПФ наблюдаются характеристические полосы, соответствующие валентным колебаниям фуллеренового каркаса (~527 см<sup>-1</sup>) и деформационным колебаниям амидной группы (1530, 1512 и 1515 см<sup>-1</sup> для вышеуказанных соединений (а), (б) и (в) соответственно). В спектрах присутствуют также полосы скелетных колебаний изопропильных групп L-валина (~1100–1200 см<sup>-1</sup>) и валентных колебаний двойной связи, сопряженной с карбонильной группой (~1630 см<sup>-1</sup>), относящиеся к малеимидному фрагменту. Посредством тензиометрического исследования также установлено, что уже при очень малых концентрациях водные растворы всех изучаемых малеимидных ГПФ являются коллоидными, и, кроме того, несмотря на отсутствие поверхностной активности на границе “раствор–воздух”, производные фуллерена C<sub>60</sub>, содержащие малеимидный и пептидные адденды, эффективно адсорбируются на границе “твердое тело–раствор” и при нейтральных рН ведут себя как ионогенные ПАВ [112, 113].

Сообщается о способности самоорганизующихся спиральных супрамолекулярных нанополостей, образованных аминокислотами, функционализированными нафталиндиимидными группами (НДИ), выступать в роли рецепторов для фуллеренов C<sub>60</sub> [114] или C<sub>70</sub> [115]. Например, полости НДИ, содержащие остатки лизина, формируют с фуллереном C<sub>60</sub> комплексы “хозяин–гость”, или комплексы включения (инклюзионные комплексы), а также смешанные комплексы включения в присутствии различных ионных пар при добавлении тетрабутиламмонийгалогенидов. Отмечено, что образование смешанных комплексов включения зависит от размера ионных пар [114]. Это объясняет природу полостей НДИ, которые, например, осуществляя инклюзию C<sub>60</sub> в среде СНCl<sub>3</sub>, увеличивают его растворимость в 16 раз. Спиральные супрамолекулярные нанополости НДИ – селективные рецепторы для ионных пар, причем селективность зависит от соответствия размера ионной пары размеру нанополости. Оптическая активность “гостя” проявляется в дисперсии вращения при  $\lambda \sim 593\text{--}660$  нм.

Описано механохимическое инкапсулирование фуллеренов C<sub>60</sub> или C<sub>70</sub> в “контейнеры”, состоящие из аминокислотных или пептидных производных, ковалентно связанных с резорцин[4]-ареновыми структурными фрагментами через арилгидразоновые линкеры, и представляющие собой самоорганизующиеся за счет водородных связей “бочкообразные” структуры [116]. Капсулы имеют полость размером ~800 Å и показывают хорошую кинетическую стабильность. При этом они сохраняют свой динамический характер, что

позволяет эффективно осуществлять комплексообразование в растворе с объемными молекулами-“гостями”, такими как C<sub>60</sub> или C<sub>70</sub>.

Nashizume et al. [117] представили результаты экспериментов, касающиеся адсорбции аминокислот и олигопептидов на поверхности фуллеренового кора C<sub>60</sub> и фуллереновых нанотрубок.

Нековалентное взаимодействие аминокислот с фуллереном C<sub>60</sub> изучено квантово-химическими методами в рамках теории функционала плотности [118, 119].

## БИОМЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНА

В основе биологической активности фуллерена лежат, в первую очередь, три его важных свойства: 1) липофильность, определяющая его адгезивность к белкам, липидам и мембранотропные свойства; 2) электроакцепторная активность, способствующая взаимодействию со свободными радикалами; 3) способность к фотовозбуждению, при котором в возбужденном состоянии происходит передача энергии молекуле обычного, триплетного, кислорода (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>) и конвертация его в обладающий более высокой энергией синглетный (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) кислород.

### Антиоксидантные свойства

Результаты многочисленных экспериментов показали, что фуллерены и их производные проявляют антиоксидантные свойства не только в модельных химических системах, но и в экспериментах *in vivo*. Антиоксидантные свойства фуллеренов обусловлены наличием обширной системы частично сопряженных двойных связей, взаимодействующей с неспаренными электронами свободных радикалов [120, 121] и, вероятно, их способностью влиять на физико-химические свойства биологических мембран.

Эксперименты *in vivo* показали, что водная дисперсия фуллерена C<sub>60</sub> (HyFn), приготовленная без использования органических растворителей, не только не обладает острой токсичностью для подопытных животных, но и защищает их печень от повреждения свободными радикалами [122].

Методами иммунофлуоресцентного анализа и радиоактивных меток показано, что, например, малоновое производное фуллерена C<sub>60</sub>[C(COOH)<sub>2</sub>]<sub>2</sub> способно проникать через клеточную мембрану и локализоваться преимущественно в мембранных фракциях клетки, в частности в мембранах митохондрий [123–125]. Поскольку именно в этих клеточных компартментах генерируется основная масса свободных радикалов и активных форм кислорода (АФК) в организме, то указанные выше производные представляются перспективны-

ми претендентами на роль антиоксидантных препаратов [126–128].

Фуллерены как акцепторы радикалов *in vitro* проявляют протекторную способность в отношении различных токсинов, способных вызывать апоптотические повреждения [129–133], что было исследовано на различных типах клеток, таких как, например, нейроны [128, 134] или эпителиальные клетки [135]. Водорастворимые производные фуллерена применяли также для защиты клеток от УФ-излучения [136].

Известно, что перекисное окисление липидов (ПОЛ) играет важную роль во многих физиологических процессах как в норме, так и при различных патологиях [137]. Нарушение антиоксидантного гомеостаза приводит к развитию оксидативного стресса, провоцирующего воспалительные, нейродегенеративные и онкологические заболевания, а также преждевременное старение организма [138]. Например, при болезни Альцгеймера ПОЛ является одним из преобладающих процессов, сопровождающих это заболевание [139]. Накопление продуктов ПОЛ приводит к изменению каталитической активности митохондриальных ферментов – моноаминоксидазы А (МАО-А) и моноаминоксидазы В (МАО-В), осуществляющих дезаминирование биогенных аминов [140].

Изучена стереоспецифическая избирательность влияния энантиомеров производных АПФ на основе L- и D-аргинина на процесс перекисного окисления липидов и активность МАО-А в митохондриях клеток головного мозга крыс. Показано, что H-C<sub>60</sub>-L-Arg-OH достоверно влияет на перекисное окисление липидов, ингибируя образование малонового диальдегида (МДА), тогда как H-C<sub>60</sub>-D-Arg-OH практически не оказывает воздействия на этот процесс [141, 142].

Методом динамического светорассеяния исследованы водные растворы ГПФ – Maleimide-C<sub>60</sub>-Gly-L-Val-OH, Maleimide-C<sub>60</sub>-L-Val-L-Val-OH и Maleimide-C<sub>60</sub>-L-Val-L-Val-L-Val-OH. Методом хемилюминесценции изучено влияние упомянутых ГПФ на процесс ПОЛ в водной среде. Показано, что коллоидная растворимость в воде, определяющая антиоксидантную активность производных ГПФ в процессе ПОЛ, зависит от химического строения аддендов, присоединенных к фуллерену C<sub>60</sub> [143].

Исследованы три амфифильных полизамещенных АПФ, такие как H<sub>7</sub>-C<sub>60</sub>-(β-Ala-OH)<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>-C<sub>60</sub>-(Arg-OH)<sub>8</sub> и H<sub>5</sub>-C<sub>60</sub>-(Cystine-OH)<sub>5</sub>. Показано, что они способны к самоагрегации с образованием сферических структур, превращающихся за счет водородных связей в многослойные везикулы (в случае аргинина и цистина). Обнаружено также влияние морфологии агрегатов АПФ на их за-

щитное действие при апоптозе клеток, индуцированном действием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [144].

Исследованы антиоксидантные свойства ряда ГПФ по их влиянию на процесс ПОЛ. Оказалось, что антиоксидантные свойства усиливаются по мере введения в ГПФ нитрогрупп. Однако наибольший эффект продемонстрирован при использовании бинарного антиоксиданта на основе ГПФ с присоединенным к нему карнозином [111]. Так, в частности, Файнгольд и соавт. [110] провели сравнительное исследование ГПФ, таких как HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C<sub>60</sub>-L-Pro-OMe (а), O<sub>2</sub>NOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C<sub>60</sub>-L-Pro-OMe (б), O<sub>2</sub>NOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C<sub>60</sub>-L-Pro-ONO<sub>2</sub> (в) и Карнозин-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C<sub>60</sub>-L-Pro-OMe (г). Антиоксидантную активность исследовали по изменению интенсивности ПОЛ биологических мембран гепатоцитов в присутствии указанных ГПФ. Интенсивность ПОЛ оценивали по содержанию МДА *in vivo*. Показано, что под влиянием ГПФ в значительной степени замедляется накопление МДА. При этом наиболее эффективным действием обладает ГПФ (г), которое подавляет ПОЛ в 4 раза интенсивнее по сравнению с остальными производными (а)–(в). Этот эффект объясняется тем, что, с одной стороны, углеродный сфероид фуллерена C<sub>60</sub> выступает как акцептор свободных радикалов, а с другой стороны, карнозиновый адденд катализирует распад пероксидов и усиливает антиоксидантные свойства ГПФ. В то же время Волков и соавт. [93] на примере N-моногофуллеренил-D-аланина показали, что моноаминокислотные производные фуллерена не обладают свойствами катализаторов распада перекиси водорода.

Котельникова и соавт. [145] изучили антиоксидантные свойства ГПФ Карнозин-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C<sub>60</sub>-Pro-OMe в сравнении с АПФ H-C<sub>60</sub>-ABA-ONa (натриевой солью производного γ-аминомасляной кислоты) и H-C<sub>60</sub>-ACA-ONa (натриевой солью производного ε-аминокапроновой кислоты). Обнаружено, что все изученные водорастворимые АПФ снижают скорость накопления МДА в митохондриях и ингибируют процесс ПОЛ, однако наиболее эффективно как антиоксидант проявляет себя ГПФ Карнозин-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C<sub>60</sub>-Pro-OMe.

Изучена стереоселективность антиоксидантной активности АПФ на примере энантиомерных пар, таких как H-C<sub>60</sub>-L-Arg-OH и H-C<sub>60</sub>-D-Arg-OH, H-C<sub>60</sub>-L-Ser-OH и H-C<sub>60</sub>-D-Ser-OH, H-C<sub>60</sub>-L-Ala-OH и H-C<sub>60</sub>-D-Ala-OH, а также H-C<sub>60</sub>-L-Ala-L-Ala-OH и H-C<sub>60</sub>-D-Ala-D-Ala-OH [140, 145]. Показано, что L-энантиомеры аминокислотных производных фуллерена снижают концентрацию МДА в липидах митохондрий, в то время как D-энантиомеры не оказывают влияния на кинетику накопления МДА. Интересно отме-

тить, что АПФ, содержащие L-энантимеры аминокислот, — являются более эффективными активаторами MAO-A, тогда как АПФ с D-энантиомерами значительно активнее активируют MAO-B [146].

Изучена антиоксидантная активность ГПФ на основе метилового эфира L-пролина, в структуру которого в качестве второго адденда введен 2-метил-5-бензил-8-хлор-2,3,4,5-тетрагидро-1*H*-пиридо-[4,3-*b*]индол (БД-2), относящийся к классу  $\gamma$ -карболинов [147–149]. В экспериментах *in vitro* получены оценки влияния ГПФ, такого как (БД-2)-C<sub>60</sub>-L-Pro-ОМе (в концентрации  $2 \times 10^{-5}$  М), на процесс ПОЛ, а также на каталитическую активность ферментов MAO-B и MAO-A. Показано, что ГПФ (БД-2)-C<sub>60</sub>-L-Pro-ОМе уменьшает концентрацию МДА в гомогенатах головного мозга крыс. При этом и сам  $\gamma$ -карболин (БД-2), и моноаддукт Н-C<sub>60</sub>-L-Pro-ОМе (без второго адденда) обладают антиоксидантной активностью. Однако эффективность ГПФ в процессе ПОЛ оказалась выше.

#### Противоопухолевое действие

Многочисленные эксперименты показали, что фуллерены — эффективные фотосенсибилизаторы (ФС), конвертирующие кислород из триплетного (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>) в синглетное (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) состояние [150]. Это свойство молекул фуллеренов позволяет использовать их в фотодинамической терапии (ФДТ) [151–154]. ФДТ представляет собой метод локальной активации светом доставляемого в опухоль ФС, что в присутствии тканевого кислорода приводит к протеканию фотохимических реакций, воздействующих на опухолевые клетки. При введении в организм молекул ФС они селективно накапливаются в клетках опухоли, и последующее облучение их светом низкоэнергетического лазера с соответствующей длиной волны приводит к генерации свободных радикалов и синглетного кислорода, разрушающих опухоль.

Одно из ограничений ФДТ — небольшая глубина проникновения света сквозь биологическую ткань вследствие использования относительно коротковолновой части спектра (~600–680 нм). Фуллерены и его производные проявляют сильное поглощение в УФ-диапазоне и более слабое (но все же значимое) — в видимой области и ближнем ИК-диапазоне. При облучении светом фуллерены легко переходят в возбужденное состояние и могут использоваться как эффективные ФС [155–157]. Ассоциаты фуллерена накапливаются преимущественно в клетках опухоли вследствие повышенной проницаемости кровеносных сосудов, питающих опухоль. Например, фотооблучение локального опухолевого участка кожи, обработанного фуллереном C<sub>60</sub>, модифицированным ПЭГ, приводит к некрозу опухоли без повреждения нормальной ткани [158, 159].

Фуллерены имеют свойства ФС не только в “свободном состоянии”, но и в составе сложных комплексов. Так, было показано, что немодифицированный фуллерен C<sub>60</sub> проявляет эти свойства при включении как в липосомы с катионной поверхностью, так и в простые липосомы [160].

Однако необходимо отметить, что применение фуллерена для ФДТ в качестве генератора синглетного кислорода наталкивается на существенные сложности из-за его чрезвычайно низкой растворимости в воде, в то время как распространенная водорастворимая полигидроксилированная фуллереновая форма C<sub>60</sub>(ОН)<sub>24</sub> имеет низкую эффективность генерации синглетной формы кислорода по сравнению с исходным (немодифицированным) фуллереном C<sub>60</sub> [161]. В то же время путем конъюгации *N*-моноаминокислотных производных фуллерена C<sub>60</sub> с красителем пиррофенфорбидом *a* удалось создать высокоэффективные ФС, хорошо растворимые в воде [162]. Фотохимическая активность полученных соединений, рассчитанная по отношению к одному кванту поглощенного света, до 10 раз превышала активность широко распространенного ФС, такого как хлорин. Между тем отмечается, что фототоксичность исследуемых соединений по отношению к клеточной линии HeLa оказалась ниже, чем у хлорина, поскольку полученные конъюгаты усиливают фотодинамические реакции I типа (генерация супероксида), в то время как клетки преимущественно повреждаются по механизму II типа (генерация синглетного кислорода). Несмотря на это, данные соединения могут представлять интерес в качестве недорогих ФС I типа, высокоэффективных для лечения гипоксических опухолей.

Противоопухолевая активность была также продемонстрирована на примерах использования олигомерных аддуктов АПФ с  $\epsilon$ -аминокапроновой кислотой [163, 164]. Изучена противоопухолевая активность полизамещенных производных фуллерена C<sub>60</sub>, полученных посредством реакции C<sub>60</sub>Cl<sub>6</sub> с *трет*-бутиловыми эфирами аминокислот и тиокислот [165]. Обнаружено, что исследуемые соединения проявляют противоопухолевую активность в отношении раковых клеток легкого человека и при этом не оказывают токсического воздействия на эндотелиальные клетки. Отмечено, что механизм противоопухолевого действия, в зависимости от структуры производного фуллерена C<sub>60</sub>, может быть реализован двумя путями: 1) индуцированием дисфункции митохондрий и аутофагии; 2) индукцией генерации активных форм кислорода и апоптоза.

Наноагрегаты водорастворимых производных фуллеренов — АПФ H<sub>m</sub>-C<sub>60</sub>-[L-Phe-OK]<sub>n</sub>, а также аддукты на основе кислот:  $\beta$ -тиопропионовой X<sub>m</sub>-C<sub>60</sub>-[S-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COOK]<sub>n</sub>,  $\gamma$ -фенилмасляной X<sub>m</sub>-C<sub>60</sub>-[C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-COOK]<sub>n</sub> и X<sub>m</sub>-C<sub>70</sub>-

[C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-COOK]<sub>n</sub>, β-фенилоксипропионо-вой X<sub>m</sub>-C<sub>60</sub>-[C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COOK]<sub>n</sub>, иминодиуксусной X<sub>m</sub>-C<sub>60</sub>-[N=(CH<sub>2</sub>COOK)<sub>2</sub>]<sub>n</sub>, где X = H или Cl, m = 0 или 1; n = 5 или 8 – были предложены для снижения токсичности и усиления терапевтического действия противоопухолевого препарата, такого как рубоксил [166]. Отмечено, что фуллереновые наноагрегаты в растворах находятся в равновесии с соответствующими мономерными формами, и поэтому в таких системах производные фуллеренов могут проявлять как индивидуальные свойства отдельных молекул (например, связывание с молекулярными мишенями), так и свойства, присущие наночастицам, заключающиеся в их способности проникать через различные биологические барьеры и транспортировать другие химические вещества.

Kuzuma et al. [167] показали, что противоопухолевый эффект препаратов может быть усилен путем присоединения действующих соединений к наночастицам фуллеренов. В частности, осуществлено взаимодействие между фуллереном C<sub>70</sub> и алкалоидсодержащим препаратом на основе берберины, а при помощи различных физико-химических методов проведен структурно-морфологический анализ полученного комплекса.

Эндоэдральные металлофуллерены (ЭМФ, M<sub>m</sub>@C<sub>n</sub>, где M = Gd, La, Y и др.) – это класс углеродных наноматериалов, перспективных для практического применения в смежных областях химии, биологии и фармакологии [168–171]. Наиболее очевидна возможность использования ЭМФ в биологии в качестве спиновых меток [168, 172, 173]. Биомедицинские исследования направлены на применение ЭМФ, содержащих радиоактивные нуклиды, в качестве радиопрепаратов [168, 174].

Было показано, что на основе ЭМФ могут быть созданы противоопухолевые препараты. Так, полигидроксилированный эндоэдральный фуллерен Gd@C<sub>60</sub>(OH)<sub>22</sub> образует в физиологическом растворе частицы размером ~22 нм. Такие частицы проявляют высокую противоопухолевую активность *in vivo*, не оказывая токсического действия. Нетоксичность кардинально отличает эти соединения от большинства известных противоопухолевых препаратов, для которых характерно именно цитотоксическое действие [168]. Сообщается и об использовании ЭМФ в радиоиммунотерапии [175].

#### Противовирусная и антибактериальная активности

Трис-малоновое производное фуллерена C<sub>60</sub> – C<sub>60</sub>[C(COOH)<sub>2</sub>]<sub>3</sub> – оказалось способным при концентрации 10 мкМ ингибировать вирус Денге-2 при освещении, т.е. за счет генерации АФК по

фотохимическому механизму, однако это соединение при концентрации 40 мкМ полностью подавляло репликацию вируса даже в полной темноте. В отношении данного экспериментального факта было выдвинуто предположение о том, что инактивация вируса по светонезависимому механизму происходит на стадии сорбции в результате гидрофобного взаимодействия трис-малонового производного фуллерена C<sub>60</sub> с липидной оболочкой вируса [176, 177]. Биологическая активность трис-малонового производного фуллерена C<sub>60</sub> также была изучена на 20 видах бактерий. В частности, указанное соединение (при концентрации 50 мг/л) ингибировало рост всех грамм-положительных видов бактерий, тогда как рост грамотрицательных бактерий не подавлялся даже его 10-кратной дозой. Следует отметить, что высокая антибактериальная активность в случае грамположительных бактерий опосредована механизмом нарушения целостности клеточной мембраны [178].

Производное фуллерена C<sub>70</sub> с восемью остатками этилендиамина C<sub>70</sub>(EDA)<sub>8</sub> эффективно ингибировало рост устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий *E. coli* и *S. aureus*, при этом не оказывая токсического действия по отношению к эпидермальным кератиноцитам человека [179]. Минимальная ингибирующая концентрация полученного соединения при этом составляла 39.2 мкМ в случае *E. coli* и 14.1 мкМ в случае *S. aureus*, что оказалось более чем в 10 раз эффективнее по сравнению с полигидроксилированным фуллереном C<sub>70</sub>(OH)<sub>18</sub>. На основании данных электронной и флуоресцентной микроскопии, изменений значений ζ-потенциалов клеток *E. coli*, а также изометрической титрационной калориметрии авторами выдвинуто предположение, что механизм антибактериального действия C<sub>70</sub>(EDA)<sub>8</sub> связан с зарядом, который несут присоединяемые к фуллерену аминные группы. Структура C<sub>70</sub>(EDA)<sub>8</sub> позволяет присоединиться к отрицательно заряженной внешней мембране клетки *E. coli* за счет положительно заряженных аминогрупп и, в то же время, взаимодействовать с внутренней мембраной за счет гидрофобной части молекулы. Напротив, клетки млекопитающих мало взаимодействуют с C<sub>70</sub>(EDA)<sub>8</sub>. Отрицательные заряды бактерий распределяются в основном снаружи бактериальной мембраны, тогда как отрицательный заряд у клеток млекопитающих локализуется преимущественно внутри клеточной мембраны.

Дикатионные N,N-диметилзамещенные фуллеро[60]пирролидины активно ингибировали обратную транскриптазу вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и РНК-полимеразу вируса гепатита С (НСV). Причем в сравнении с указанными выше катионными производными цвиттер-ионные N-незамещенные фуллеро[60]пирролидины с карбок-

сильной, а также алкильной или фенильной группами в гетероциклическом фрагменте продемонстрировали увеличение активности в отношении ингибирования обратной транскриптазы HIV [180, 181].

Монокатионные *N,N*-дизамещенные [60]фуллеропирролидины показали результативность *in vitro* по антибактериальной активности в отношении ингибирования роста штаммов *Mycobacterium avium* и *M. tuberculosis* [38]. Сообщается также, что моно- и поликатионные *N,N*-диметилзамещенные [60]фуллеропирролидины оказались эффективными как антимикробные ФС широкого спектра действия [182].

Различные виды противовирусной активности (ВИЧ, герпес, грипп H1N1) продемонстрированы при использовании олигоаддуктов АПФ с  $\epsilon$ -аминокапроновой кислотой [163, 164].

Изучено противовирусное действие АПФ, такого как декагидрат *трис*-аддукта [60]фуллерена и  $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты,  $H_3-C_{60}-[NH(CH_2)_5COOH]_3 \cdot 10H_2O$  (гидрат ФТАК), проявляемое в отношении респираторно-синцитиального вируса [183]. Проведенные исследования *in vitro* показали, что гидрат ФТАК (в культуре эпителиальных клеток аденокарциномы гортани человека HEp-2) обладает специфической противовирусной активностью, которая повышается с увеличением концентрации вещества и понижается с увеличением дозы вируса.

Испытаны водорастворимые АПФ для ингибирования специфических вирусных ферментов – протеазы и обратной транскриптазы ВИЧ – в литической и хронической инфекциях клеточных культур. Отмечается, что активность АПФ, таких как, например,  $H-C_{60}-ABA-ONa$  (а),  $H-C_{60}-ACA-ONa$  (б),  $H-C_{60}-Gly-ONa$  (в), а также  $H-C_{60}-L-Ala-L-Ala-ONa$  (г) и  $H-C_{60}-DL-Ala-DL-Ala-ONa$  (д), сравнима с показанной в случае литической инфекции клеточных культур для нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ азидотимидина. Субстанции обладают также выраженным вирулицидным эффектом. Кроме того, показано, что производные (а) и (б) конкурентно (селективно) ингибируют рекомбинантную протеазу ВИЧ и неконкурентно (неселективно) ингибируют рекомбинантную обратную транскриптазу ВИЧ [184, 185].

Исследована противовирусная активность АПФ, таких как гидраты олигоаддуктов,  $H_6-C_{60}-(Gly-ONa)_6 \cdot 10H_2O$  (а),  $H_8-C_{60}-(L-Lys-ONa)_4 \cdot 10H_2O$  (б),  $H_5-C_{60}-[(Gly-ONa)_3(L-Lys-ONa)_2] \cdot 10H_2O$  (в виде композита) (в),  $H_7-C_{60}-[(Gly-ONa)_3(L-Asp-ONa)_2(L-Asp-ONa)] \cdot 10H_2O$  (в виде композита) (г), проявляемая в отношении высоковирулентного штамма вируса А/Н5N1 птичьего гриппа *in vitro* на клеточной культуре [186, 187]. Показано,

что соединения (а)–(г) обладают способностью подавлять репликацию вируса, при этом максимальная вирулицидная активность обнаружена у композитного соединения (г). Важно отметить, что испытанные соединения активны только в профилактической схеме (при внесении их в клеточную культуру до заражения), тогда как в лечебной схеме (при внесении – после заражения) активности не проявляют.

Задача ингибирования цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) представляет собой серьезную проблему современной клинической медицины, т.к. цитомегаловирус (ЦМВ), являющийся одним из герпесвирусов, подавляет иммунитет и сопровождает ВИЧ-инфекцию в качестве наиболее распространенного оппортуниста. Большинство химиопрепаратов для ингибирования ЦМВИ требуют применения высоких доз в течение длительного времени, и, как правило, они высокотоксичны. Этими проблемами объясняется актуальность изучения физико-химических механизмов развития ЦМВИ и создания на основе полученных результатов биотестирования таких химических соединений, которые способны эффективно ингибировать ЦМВ. Изучено влияние водорастворимых АПФ, таких как  $H-C_{60}-ABA-OH$  (а),  $H-C_{60}-ABA-ONa$  (б),  $H-C_{60}-ACA-OH$  (в),  $H-C_{60}-ACA-ONa$  (г), а также  $H-C_{60}-ABA-OMe$  (д) и  $H-C_{60}-ACA-OMe$  (е), оказываемое на ЦМВИ *in vitro* в лечебной, профилактической и вирулицидной схемах воздействия [188–191]. Показано, что, в зависимости от дозы, все АПФ (а)–(е) обладают способностью подавлять развитие цитопатогенного действия ЦМВ в клеточной культуре. В частности, установлено, что соединения (а), (б), (д) и (е) оказывают выраженное противовирусное действие в профилактической схеме, тогда как соединения (в) и (г) ингибируют развитие ЦМВИ только при применении в лечебной схеме, причем наибольший противовирусный эффект продемонстрирован в случае соединения (б) [191].

В патентной публикации Куш и соавт. [192] сообщается об успешном применении поликарбоксильного производного фуллерена  $C_{60}$ , такого как  $Cl-C_{60}-[C_6H_4O-(CH_2)_3COOK]_5$ , использованного в качестве противовирусного средства для ингибирования процесса репродукции вируса простого герпеса, ЦМВ, а также экстренной профилактики, предотвращающей передачу этих вирусных инфекций.

#### Иммуногенные эффекты

Прогресс в нанотехнологиях, создание новых наноматериалов на основе фуллерена и углеродных нанотрубок неизбежно приводит к распространению этих веществ в окружающей среде, в том числе в живых организмах. Хотя фуллерены и

обладают низкой токсичностью, их иммуногенные свойства практически не изучены. Вопрос о том, способна ли иммунная система давать отклик на эти соединения, остается открытым. Важно отметить, что антитела к аллотропным модификациям углерода, таким как алмаз и графит, получить не удалось [193].

В конце 1990-х гг. были опубликованы данные о продуцировании специфических анти-C<sub>60</sub>-антител класса IgG, полученных при иммунизации *in vivo* производными фуллерена [194]. Интересно отметить, что было проведено компьютерное моделирование взаимодействия фуллерена с антителом [195]. Однако эта работа не получила последующего развития и реального практического применения в формате ИФА. В дальнейшем был осуществлен цикл исследований, в котором изучали иммуногенную и адъювантную активности как НuFn, или ВДФ, так и водорастворимых АПФ (в том числе конъюгатов с белками – модельными антигенами). Многочисленные эксперименты по иммунизации *in vivo* разнообразными фуллереновыми производными продемонстрировали отсутствие специфического иммунного ответа на фуллерен, причем показано, что основной вклад в регистрируемый иммунный ответ вносят присоединяемые адденды [196–198]. Для оценки антигенных свойств фуллеренового ко́ра были предприняты попытки получить гипериммунную сыворотку с антителами к C<sub>60</sub> при иммунизации *in vivo* препаратами АПФ (например, с использованием Н-C<sub>60</sub>-L-Ala-ONa и Н-C<sub>60</sub>-L-Ser-ONa), эмульгированными в адъюванте Фрейнда, однако не удалось вызвать индукцию анти-C<sub>60</sub>-специфичных антител даже при многократной иммунизации. Тестирование сывороток посредством твердофазного ИФА указало на полное отсутствие реактивности сывороток как с самим фуллереном C<sub>60</sub>, так и со всеми его производными [196]. Между тем была отмечена стимуляция иммунного ответа при иммунизации *in vivo* яичным альбумином (овальбумином, OVA) в присутствии АПФ Н-C<sub>60</sub>-L-Ser-ONa. Овальбумин представляет собой модельный антиген, стимулирующий выработку не только IgG, но и антител класса IgE, являющихся индукторами аллергических реакций. Более того, модифицированная форма модельного антигена OVA в виде его конъюгата с АПФ (Н-C<sub>60</sub>-АСА-OVA) показала увеличение его аллергенности. Проведенные исследования продемонстрировали, что АПФ эффективно стимулируют иммунный ответ на белковый антиген, обладая, таким образом, адъювантными свойствами [196, 198, 199].

Hendrickson et al. сообщили о возможности продуцирования C<sub>60</sub>-специфических поли- и моноклональных антител класса IgG, способных распознавать фуллерен [200]. Данные получены на основе

конкурентного поляризационного флуоресцентного иммуноанализа. Однако осталось неясным, какую форму фуллерена детектируют эти антитела: одиночную молекулу фуллерена или кластер, фуллерен, покрытый гидратной оболочкой, или комплекс фуллерена с белком.

Из числа хорошо изученных представителей синтетических адъювантов можно упомянуть [4-*O*-(2-ацетиламино-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-*N*-ацетилмурамил]-L-аланил-D-α-глутамиламид (*N*-ацетилглюкозаминил-*N*-ацетилмурамил-дипептид, ГМДП), представляющий собой фрагмент клеточных стенок бактерий [201].

Опубликованы данные об адъювантной активности гликопептидного фуллеренового производного – продукта присоединения АПФ, содержащего ε-минокапроновую кислоту, к лизиновому производному гликопептида ГМДП, т.е. Н-C<sub>60</sub>-АСА-(ε-*N*)L-Lys-ГМДП [202]. В рамках обсуждаемого исследования проведены эксперименты, касающиеся сравнительного анализа иммуностимулирующей активности двух водорастворимых фуллереновых производных, таких как Н-C<sub>60</sub>-АСА-ONa (а) и Н-C<sub>60</sub>-АСА-(ε-*N*)L-Lys-ГМДП (б). Для сравнения выбраны два известных адъюванта – полный адъювант Фрейнда (ПАФ) и гидроксид алюминия (ГА), а в качестве антигена использован белок NS4 вируса гепатита С. На основании полученных оценок иммунного ответа и анализа антител, вырабатываемых на отдельных участках антигена, показано, что производные (а) и (б) обладают рядом преимуществ по сравнению с широко используемыми адъювантами ПАФ и ГА – водорастворимостью, длительностью действия, а также способностью к более быстрой генерации антител второго порядка (анти-идиотипических антител), образующихся в ответ на введенный антиген и оказывающих влияние на параметры иммунного ответа, подавляя или усиливая его и, кроме того, участвуя в поддержании длительной иммунной памяти. Экспериментальные результаты позволили сделать заключение о том, что вышеупомянутые фуллереновые производные (а) и (б) могут рассматриваться в качестве эффективных адъювантов при вакцинации различными антигенами, в том числе получаемых генно-инженерными методами.

#### *Нейротропная активность*

На экспериментальных моделях *in vivo* и *in vitro* была продемонстрирована способность фуллерена предотвращать апоптоз нейронов, которые чувствительны к окислительному повреждению, вызываемому свободными радикалами и АФК [130, 203]. В частности, показана эффективность карбоксифуллеренов в роли нейротропных [129, 134, 204]. В экспериментах *in vivo* предвари-

тельное введение комплекса  $C_{60}$  с поли-*N*-винилпирролидоном (ПВП) в дорсальный гиппокамп при помощи микроинъекции полностью предотвращало нарушение пространственной памяти, вызываемое модельным ингибитором синтеза белка, таким как циклогексимид [205]. Установлено, что фуллерен  $C_{60}$  и его производные способны ингибировать ранние стадии агрегации  $\beta$ -амилоидных пептидов [206–211], которая, как предполагают, запускает процесс нейрональной дегенерации и вызывает патологические изменения, например, при болезнях Альцгеймера и Паркинсона [212].

Также показано, что антиамилоидную активность могут, в частности, проявлять гидратированный фуллерен (НуФу, или ВДФ) [209, 213–217] и фуллеренолы [218]. Посредством высокоразрешающей электронной микроскопии *in vitro* изучена антиамилоидная способность ГПФ [219]. Выяснено, что нитроксильные ГПФ, такие как  $O_2NOCH_2CH_2-C_{60}-L-Pro-OMe$  (а),  $O_2NOCH_2CH(ONO_2)CH_2-C_{60}-L-Pro-OMe$  (б) и  $O_2NOCH_2CH_2-C_{60}-L-Pro-OCH_2CH_2ONO_2$  (в), способны предотвращать образование амилоидных фибрилл  $A\beta(1-42)$ -пептидом мозга и X-белком, а также разрушать уже сформированные амилоидные структуры. Следует подчеркнуть, что электронная микроскопия оказалась исключительно важным методом для отбора эффективных антиамилоидных препаратов. Сделан многообещающий вывод о том, что обнаруженная антиамилоидная активность наноразмерных нитроксильных ГПФ открывает перспективы для разработки на их основе терапевтических подходов к лечению амилоидозов, в частности болезни Альцгеймера.

Показано также, что водорастворимая натриевая соль карбоксилсодержащего пентакис-производного фуллерена  $C_{60}$ , такая как  $Cl-C_{60}-(C_6H_4CH_2COONa)_5$ , способна разрушать амилоидные фибриллы  $A\beta(1-42)$ -пептида и X-белка или предотвращать их образование [216, 217].

Изучено нейропротекторное действие АПФ  $H-C_{60}-L-Pro-OMe$  (а), а также ГПФ, таких как  $O_2NOCH_2CH_2-C_{60}-L-Pro-OMe$  (б),  $O_2NOCH_2CH(ONO_2)CH_2-C_{60}-L-Pro-OMe$  (в) и Карнозин- $OCH_2CH_2-C_{60}-L-Pro-OMe$  (г). Все указанные соединения, кроме соединения (а), ингибировали активность фермента MAO-B, при этом соединения (а)–(г) повышали активность MAO-A. Кроме того, все соединения (а)–(г) *in vitro* ингибировали глутамат-индуцированный захват ионов  $Ca^{2+}$  в выделенной фракции синапсомомы коры головного мозга, причем наибольший эффект ингибирования продемонстрирован динитроксильным ГПФ (в). Соединение ГПФ (в) также вызывало достоверное увеличение амплитуды трансмембранных токов, связанных с активацией

AMPA-рецепторов, что свидетельствует об эффективном когнитивно-стимулирующем действии этого соединения [220].

Получены данные, касающиеся нейротропной активности ГПФ на основе метилового эфира L-пролина, в которое в качестве второго адденда (по 8-му положению гетероциклического фрагмента) введено когнитивно-стимулирующее соединение, такое как 5-бензил-2-метил-8-хлор-2,3,4,5-тетрагидро-1*H*-пиридо[4,3-*b*]индол (БД-2), относящееся к классу  $\gamma$ -карболинов. Отмечено, что ГПФ, такое как (БД-2)- $C_{60}-L-Pro-OMe$ , утрачивает побочное психостимулирующее действие, характерное для вышеупомянутого  $\gamma$ -карболина (БД-2), однако оно полностью сохраняет свойства когнитивного стимулятора [148, 149].

#### *Системы направленной доставки лекарственных веществ. Тераностика*

Важное направление химии лекарственных веществ и фармакологии – адресная доставка лекарственных препаратов, способствующая повышению эффективности их действия за счет оптимизации биораспределения. Одним из возможных носителей лекарственных веществ может служить фуллереновый модифицированный кор [150, 182, 221]. Размер, форма и высокая липофильность фуллерена позволяют этой молекуле довольно легко проникать в клетки, что представляет собой идеальное сочетание свойств для использования фуллерена и его производных в качестве вектора для адресной доставки лекарственных веществ [182, 221, 222]. Одна из первых работ по медицинской химии фуллеренов была посвящена целенаправленной доставке фуллерена-фотосенсибилизатора к мишени посредством олигонуклеотидной последовательности, ковалентно связанной с фуллереновым кором [223]. Для повышения эффективности действия синтезирован конъюгат фуллерена  $C_{60}$  с олигонуклеотидом. Такой конъюгат обеспечивает связь с одноцепочечной ДНК и фиксацию фотосенсибилизатора (фуллеренового фрагмента) вблизи ДНК, что значительно увеличивает эффективность действия. Для повышения специфичности связывания были также синтезированы соединения, содержащиеся в фуллереновом коре фрагменты, связывающиеся с малой бороздкой ДНК [224].

Так, например, для целенаправленной доставки препарата к рецепторам-мишеням в центральной нервной системе (с возможностью преодоления гематоэнцефалического барьера) получены комплексы производных фуллерена  $C_{60}$  с гексоном  $\{[(CH_3)_3N(CH_2)_6N(CH_3)_3]^{2+}\}$ . Комплексообразование осуществлено с аддуктами фуллерена  $C_{60}$ , образующимися при реакциях с  $\epsilon$ -аминокапроновой кислотой ( $H-C_{60}-ACA-OH$ ),  $\beta$ -алани-

ном (H-C<sub>60</sub>-β-Ala-OH), а также малоновой кислотой (C<sub>60</sub>[C(COOH)<sub>2</sub>]<sub>n</sub>) [225]. Как показали эксперименты *in vivo*, комплексы, образуемые высокополярной молекулой периферического ацетилхолинового блокатора с аддуктами фуллера C<sub>60</sub>, при проникновении в центральную нервную систему снижают (по сравнению с контролем) длительность и интенсивность судорог, вызванных введением никотина, оказывают миорелаксирующий эффект, что характеризует их как соединения с ярким H-холинолитическим действием.

На основе фуллера возможно создание модульных несущих “систем”, включающих в свой состав триаду компонентов: 1) терапевтический блок (собственно биологически активный компонент); 2) блок, обеспечивающий направленность действия; 3) блок, способный увеличивать количество биологически активных фрагментов, транспортируемых “системой” [182]. Например, в качестве такой “системы” предложена модульная “система” на основе *гексакис*-малонного производного фуллера C<sub>60</sub>, в которой еще имеется терапевтический блок с фрагментами феофорбида-а в качестве фотосенсибилизатора и дополнительный спейсер для связи с “адресующим” блоком-антителом [226]. Подобные модульные системы доставки с повторяющимися фрагментами могут использоваться в ФДТ и иметь применение в терапии, когда требуются высокие показатели избирательности и средства к мишени.

Липофильный характер фуллеренового кора можно использовать для создания композитных систем, проникающих через липофильные барьеры. Например, на основе *моно*-малонного производного C<sub>60</sub>C(COOH)<sub>2</sub> созданы “системы” для переноса пептидов, проникающих через двухслойные мембраны [227].

На основе фуллеренов можно создавать “векторные соединения” для трансфекции генов [228].

Тераностики – соединения, объединяющие в своей структуре два начала: терапевтическое и диагностическое (визуализирующее) [182]. В настоящее время создаются тераностики на основе объединения углеродных наноструктур и полимеров [229], а также на основе эндофуллеренов [230].

Фуллерены могут служить и в качестве терапевтических, и в качестве вспомогательных средств при создании тераностиков. Благодаря фуллерену тераностики могут быть не наночастицами, как обычно предполагается, а отдельными молекулами [182, 221]. Например, к дикарбоксиметанофуллерену посредством гидрофильных спейсеров были ковалентно присоединены две молекулы антрациклинового антибиотика доксорубина. Таким способом в одной молекуле (а

не в наночастице) удалось объединить и средство доставки, и действующее начало [231].

Противораковый препарат-тераностик создан на основе полигидроксильированного фуллера C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub>. Опухоли, в которые вводили препарат, визуализировали с использованием фотоакустической томографии, а затем подвергали действию ИК-лазера. Примечательно, что после терапевтического воздействия препаратом развитие опухолевого процесса менее чем за сутки было полностью купировано [232].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании данных, изложенных в настоящем обзоре, показаны и систематизированы те результаты и достижения, которые имеются по синтезу ковалентно связанных производных фуллера C<sub>60</sub>, содержащих в своем составе аминокислотные и пептидные остатки, а также возможности широкого биомедицинского применения таких соединений. Рассмотрены физико-химические факторы, обеспечивающие свойства их биологической активности. Описаны мембранотропные, антиоксидантные и фотосенсибилизирующие свойства этих соединений. Обсуждены полученные результаты по проявлению ими противовирусной, антибактериальной, нейротропной и иммуногенной активностей, а также перспективы их использования для фотодинамической противоопухолевой терапии и в системах направленной доставки лекарственных веществ. Кроме того, для полноты картины в обзоре некоторое внимание уделено свойствам биологической активности и биомедицинскому применению ряда других важных в практическом отношении фуллереновых производных.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в соответствии с программой исследований, утвержденной Министерством науки и высшего образования Российской Федерации.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Караулова Е.Н., Багрий Е.И. // Усп. химии. 1999. Т. 68. С. 979–998.  
<https://doi.org/10.1070/RC1999v068n11ABEH000499>
2. Трошин П.А., Любовская Р.Н. // Усп. химии. 2008. Т. 77. С. 323–369.  
<https://doi.org/10.1070/RC2008v077n04ABEH003770>
3. Сидоров Л.Н., Юровская М.А., Борщевский А.Я., Трушков И.В., Иоффе И.Н. // Фуллерены: учебное пособие. Москва: Экзамен, 2005. 688 с.
4. Hirsch A. // The Chemistry of the Fullerenes Thieme. Stuttgart: Germany, 1994. 203 p.
5. Diederich F., Isaacs L., Philp D. // Chem. Soc. Rev. 1994. V. 23. P. 243–255.  
<https://doi.org/10.1039/CS9942300243>
6. Hirsch A. // Synthesis. 1995. P. 895–913.  
<https://doi.org/10.1055/s-1995-4046>
7. Prato M., Maggini M. // Acc. Chem. Res. 1998. V. 31. P. 519–526.  
<https://doi.org/10.1021/ar970210p>
8. Prato M., Bianco A., Maggini M., Scorrano G., Toniolo C., Wudl F. // J. Org. Chem. 1993. V. 58. P. 5578–5580.  
<https://doi.org/10.1021/jo00073a004>
9. Isaacs L., Diederich F. // Helv. Chim. Acta. 1993. V. 76. P. 2454–2464.  
<https://doi.org/10.1002/hlca.19930760705>
10. Toniolo C., Bianco A., Maggini M., Scorrano G., Prato M., Marastoni M., Tomatis R., Spisani S., Palú G., Blair E.D. // J. Med. Chem. 1994. V. 37. P. 4558–4562.  
<https://doi.org/10.1021/jm00052a015>
11. Skiebe A., Hirsch A. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1994. P. 335–336.  
<https://doi.org/10.1039/C39940000335>
12. Eckert J.F., Bourgogne C., Nierengarten J.F. // Chem. Commun. 2002. P. 712–713.  
<https://doi.org/10.1039/B201122K>
13. Martín N., Sánchez L., Guldi D.M. // Chem. Commun. 2000. P. 113–114.  
<https://doi.org/10.1039/A908770B>
14. Pellicciari R., Annibaldi D., Constantino G., Marinozzi M., Natalini B. // Synlett. 1997. P. 1196–1198.  
<https://doi.org/10.1055/s-1997-980>
15. Quíhía A., René L., Guilhem J., Pascard C., Badet B. // J. Org. Chem. 1993. V. 58. P. 1641–1642.  
<https://doi.org/10.1021/jo00059a001>
16. Pellicciari R., Natalini B., Amori L., Marinozzi M., Seraglia R. // Synlett. 2000. P. 1816–1818.  
<https://doi.org/10.1055/s-2000-8680>
17. Bingel C. // Chem. Ber. 1993. V. 126. P. 1957–1959.  
<https://doi.org/10.1002/cber.19931260829>
18. Camps X., Hirsch A. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1997. № 11. P. 1595–1596.  
<https://doi.org/10.1039/A702055D>
19. Thilgen C., Herrmann A., Diederich F. // Helv. Chim. Acta. 1997. V. 80. P. 183–199.  
<https://doi.org/10.1002/hlca.19970800117>
20. Richardson C.F., Schuster D.I., Wilson S.R. // Org. Lett. 2000. V. 2. P. 1011–1014.  
<https://doi.org/10.1021/ol990312a>
21. Gong W.L., Jin B., Peng R.F., Deng N.M., Zheng R.Z., Chu S.J. // Ind. Eng. Chem. Res. 2015. V. 54. P. 2613–2618.  
<https://doi.org/10.1021/ie504876c>
22. Tanzi L., Rubes D., Bavaro T., Sollogoub M., Serra M., Zhang Y., Terreni M. // Molecules. 2022. V. 27. P. 2776.  
<https://doi.org/10.3390/molecules27092776>
23. Li Z.Z., Bouhadir K.H., Shevlin P.B. // Tetrahedron Lett. 1996. V. 37. P. 4651–4654.  
[https://doi.org/10.1016/0040-4039\(96\)00917-3](https://doi.org/10.1016/0040-4039(96)00917-3)
24. Tsumoto H., Takahashi K., Suzuki T., Nakagawa H., Kohda K., Miyata N. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008. V. 18. P. 657–660.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.11.065>
25. Banks M.R., Cadogan J.I.G., Gosney I., Hodgson P.K.G., LangridgeSmith P.R.R., Millar J.R.A., Parkinson J.A., Rankin D.W.H., Taylor A.T. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1995. P. 887–888.  
<https://doi.org/10.1039/C39950000887>
26. Strom T.A., Barron A.R. // Chem. Commun. 2010. V. 46. P. 4764–4766.  
<https://doi.org/10.1039/C003019H>
27. Халилов Л.М., Тулябаев А.Р., Ахметов А.Р., Туктаров А.Р. // Изв. РАН. Сер. хим. 2015. № 11. С. 2725–2730.
28. Wang N.X., Li J.S., Zhu D.B., Chan T.H. // Tetrahedron Lett. 1995. V. 36. P. 431–434.  
[https://doi.org/10.1016/0040-4039\(94\)02312-Y](https://doi.org/10.1016/0040-4039(94)02312-Y)
29. Юровская М.А., Овчаренко А.А. // Химия гетероциклич. соедин. 1998. № 3 (369). С. 291–297.
30. Wudl F., Hirsch A., Khemani K.C., Suzuki T., Allemand P.M., Koch A., Eckert H., Srdanov G., Webb H.M. // In: Fullerenes: Synthesis, Properties and Chemistry of Large Carbon Clusters / Eds. Hammons G.S., Kuck V.J. Washington: Am. Chem. Soc., 1992. P. 161–175.
31. Prato M., Maggini M., Giacometti C., Scorrano G., Sandona G., Farnia G. // Tetrahedron. 1996. V. 52. P. 5221–5234.  
[https://doi.org/10.1016/0040-4020\(96\)00126-3](https://doi.org/10.1016/0040-4020(96)00126-3)
32. Zhang J.M., Yang W., He P., Zhu S.Z., Wang S. // Synth. Commun. 2005. V. 35. P. 89–96.  
<https://doi.org/10.1081/SCC-200046505>
33. De la Hoz A., Díaz-Ortiz A., Moreno A., Langa F. // Eur. J. Org. Chem. 2000. P. 3659–3673.  
[https://doi.org/10.1002/1099-0690\(200011\)2000:22<3659::AID-EJOC3659>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1099-0690(200011)2000:22<3659::AID-EJOC3659>3.0.CO;2-0)
34. Suárez M., Verdecia Y., Illescas B., Martínez-Alvarez R., Alvarez A., Ochoa E., Seoane C., Kayali N., Martín N. // Tetrahedron. 2003. V. 59. P. 9179–9186.  
<https://doi.org/10.1016/j.tet.2003.09.047>
35. Jin B., Peng R.F., Shen J., Wang G.W., Tan B.S., Chu S.J. // Synth. Commun. 2012. V. 42. P. 1532–1541.  
<https://doi.org/10.1080/00397911.2010.541965>
36. Zhu S.E., Chen X., Li Y.J., Mai C.K., Huang Y.S., Wang G.W., Peng R.F., Jin B., Chu S.J. // Org. Biomol. Chem. 2012. V. 10. P. 8720–8729.  
<https://doi.org/10.1039/C2OB26066B>

37. Wang G.W., Zhang T.H., Hao E.H., Jiao L.J., Murata Y., Komatsu K. // *Tetrahedron*. 2003. V. 59. P. 55–60. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(02\)01478-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(02)01478-3)
38. DaRos T., Spalluto G., Prato M. // *Croatica Chem. Acta*. 2001. V. 74. P. 743–755.
39. Watanabe L.A., Bhuiyan M.P.I., Jose B., Kato T., Nishino N. // *Tetrahedron Lett.* 2004. V. 45. P. 7137–7140. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.07.088>
40. Pellarini F., Pantarotto D., DaRos T., Giangaspero A., Tossi A., Prato M. // *Org. Lett.* 2001. V. 3. P. 1845–1848. <https://doi.org/10.1021/ol015934m>
41. Sofou P., Elemes Y., Panou-Pomonis E., Stavrakoudis A., Tsikaris V., Sakarellos C., Sakarellos-Daitsiotis M., Maggini M., Formaggio F., Toniolo C. // *Tetrahedron*. 2004. V. 60. P. 2823–2828. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2004.01.064>
42. Zhang J., Wang Y.X., Kang F., Shao Y.Y., Li Z.J., Yang X.L. // *Chin. Chem. Lett.* 2008. V. 19. P. 1159–1162. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2008.06.035>
43. Milic D., Prato M. // *Eur. J. Org. Chem.* 2010. P. 476–483. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200900791>
44. DaRos T., Guldi D.M., Morales A.F., Leigh D.A., Prato M., Turco R. // *Org. Lett.* 2003. V. 5. P. 689–691. <https://doi.org/10.1021/ol0274110>
45. Maggini M., Scorrano G., Prato M. // *J. Am. Chem. Soc.* 1993. V. 115. P. 9798–9799. <https://doi.org/10.1021/ja00074a056>
46. Maggini M., Scorrano G., Bianco A., Toniolo C., Sijbesma R.P., Wudl F., Prato M. // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1994. P. 305–306. <https://doi.org/10.1039/C39940000305>
47. Ioutsy V.A., Zadorin A.A., Khavrel P.A., Belov N.M., Ovchinnikova N.S., Goryunkov A.A., Kharybin O.N., Nikolaev E.N., Yurovskaya M.A., Sidorov L.N. // *Tetrahedron*. 2010. V. 66. P. 3037–3041. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2010.02.057>
48. Bianco A., Maggini M., Scorrano G., Toniolo C., Marconi G., Villani C., Prato M. // *J. Am. Chem. Soc.* 1996. V. 118. P. 4072–4080. <https://doi.org/10.1021/ja9539249>
49. Wang G.W., Li J.X., Li Y.J., Liu Y.C. // *J. Org. Chem.* 2006. V. 71. P. 680–684. <https://doi.org/10.1021/jo052116p>
50. Burley G.A., Keller P.A., Pyne S.G., Ball G.E. // *Chem. Commun.* 1998. P. 2539–2540. <https://doi.org/10.1039/A806865H>
51. Burley G.A., Keller P.A., Pyne S.G., Ball G.E. // *Chem. Commun.* 2001. P. 563–564. <https://doi.org/10.1039/B100655J>
52. Ball G.E., Burley G.A., Chaker L., Hawkins B.C., Williams J.R., Keller P.A., Pyne S.G. // *J. Org. Chem.* 2005. V. 70. P. 8572–8574. <https://doi.org/10.1021/jo051282u>
53. Prato M., Suzuki T., Foroudian H., Li Q., Khemani K., Wudl F., Leonetti J., Little R.D., White T., Rickborn B., Yamago S., Nakamura E. // *J. Am. Chem. Soc.* 1993. V. 115. P. 1594–1595. <https://doi.org/10.1021/ja00057a065>
54. Yamago S., Tokuyama H., Nakamura E., Prato M., Wudl F. // *J. Org. Chem.* 1993. V. 58. P. 4796–4798. <https://doi.org/10.1021/jo00070a009>
55. Jin B., Shen J., Peng R.F., Chen C.D., Chu S.J. // *Eur. J. Org. Chem.* 2014. P. 6252–6262. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201402655>
56. An Y.Z., Anderson J.L., Rubin Y. // *J. Org. Chem.* 1993. V. 58. P. 4799–4801. <https://doi.org/10.1021/jo00070a010>
57. Yang J.Z., Barron A.R. // *Chem. Commun.* 2004. P. 2884–2885. <https://doi.org/10.1039/B411118D>
58. Kotha S., Mandal K., Banerjee S., Shaikh M.M. // *Eur. J. Org. Chem.* 2007. P. 1244–1255. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200600970>
59. Enes R.F., Tomé A.C., Cavaleiro J.A.S. // *Tetrahedron*. 2005. V. 61. P. 1423–1431. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2004.12.007>
60. Kotha S., Kumar G.A. // *Tetrahedron Lett.* 2004. V. 45. P. 2931–2934. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.02.060>
61. Gan L.B., Zhou D.J., Luo C.P., Tan H.S., Huang C.H., Lü M.J., Pan J.Q., Wu Y. // *J. Org. Chem.* 1996. V. 61. P. 1954–1961. <https://doi.org/10.1021/jo951933u>
62. Skanji R., Messaouda M.B., Zhang Y.M., Abderrabba M., Szwarc H., Moussa F. // *Tetrahedron*. 2012. V. 68. P. 2713–2718. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.01.049>
63. Zhou D.J., Tan H.S., Luo C.P., Gan L.B., Huang C.H., Pan J.Q., Lü M.J., Wu Y. // *Tetrahedron Lett.* 1995. V. 36. P. 9169–9172. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(95\)02036-O](https://doi.org/10.1016/0040-4039(95)02036-O)
64. Gan L.B., Jiang J.F., Zhang W., Su Y., Shi Y.R., Huang C.H., Pan J.Q., Lü M.J., Wu Y. // *J. Org. Chem.* 1998. V. 63. P. 4240–4247. <https://doi.org/10.1021/jo971990i>
65. Zhang W., Su Y., Gan L.B., Jiang J.F., Huang C.H. // *Chem. Lett.* 1997. P. 1007–1008. <https://doi.org/10.1246/cl.1997.1007>
66. Hirsch A., Li Q.Y., Wudl F. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1991. V. 30. P. 1309–1310. <https://doi.org/10.1002/anie.199113091>
67. Seshadari R., Govindaraj A., Nagarajan R., Pradeep T., Rao C.N.R. // *Tetrahedron Lett.* 1992. V. 33. P. 2069–2070. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(92\)88144-T](https://doi.org/10.1016/0040-4039(92)88144-T)
68. Skiebe A., Hirsch A., Klos H., Gotschy B. // *Chem. Phys. Lett.* 1994. V. 220. P. 138–140. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(94\)00124-3](https://doi.org/10.1016/0009-2614(94)00124-3)
69. Романова В.С., Цыряпкин В.А., Ляховецкий Ю.И., Парнес З.Н., Вольпин М.Е. // *Изв. РАН. Сер. хим.* 1994. № 6. С. 1154–1155.
70. Vol'pin M.E., Romanova V.S., Parnes Z.N. // *Mol. Cryst. Liquid Cryst. Sci. Technol. Sec. C Mol. Mater.* 1996. V. 7. P. 53–60.
71. Klemenkova Z.S., Romanova V.S., Tsyryapkin V.A., Muradan V.E., Parnes Z.N., Lokshin B.V., Vol'pin M.E. // *Mendeleev Commun.* 1996. V. 6. P. 60–62.
72. Ямскова О.В., Колягин Ю.Г., Романова В.С., Егорова А.С., Курилов Д.В., Ямсков И.А., Зубарева Н.Д.,

- Кустов Л.М. // Журн. физ. химии. 2019. Т. 93. С. 78–80.  
<https://doi.org/10.1134/S0044453719110347>
73. Раснецов Л.Д., Шварцман Я.Ю., Лялина И.К., Раснецова Б.Е., Карнацевич В.Л., Суворова О.Н., Кутырева В.В., Щупак Е.А., Базякина Н.Л., Макаров С.Г. // Патент RU 2213049 С1, опубл. 27.09.2003.
  74. Suvorova O.N., Kutureva V.V., Baziakina N.L., Karnatsevich V.L., Schupak E.A., Rasnetsov L.D., Makarov S.G. // IX Int. Conference “Hydrogen materials science and chemistry of carbon nanomaterials” (ICHMS’2005), Crimea, Sevastopol, September 5–11, 2005: Book of heads of reports / Eds. Schur D.V., Zaginaichenko S.Y., Veziroglu T.N. Kiev: ANEU, 2005. P. 498–499.
  75. Жмак М.Н., Вольпина О.М., Куприянова М.А., Андропова Т.М., Макаров Е.А., Романова В.С., Парнес З.Н., Вольпин М.Е., Иванов В.Т. // Патент RU 2124022 С1, опубл. 27.12.1998.
  76. Раснецов Л.Д., Шварцман Я.Ю., Лялина И.К., Раснецова Б.Е., Карнацевич В.Л., Суворова О.Н., Кутырева В.В., Щупак Е.А., Базякина Н.Л., Макаров С.Г. // Патент RU 2213048 С1, опубл. 27.09.2003.
  77. Думнис М.А., Литасова Е.В., Ильин В.В., Николаев Д.Н., Шукарев А.В., Пиотровский Л.Б. // Изв. СПбГТИ (ТУ). 2014. № 24. С. 32–34.
  78. Sun T., Xu Z.D., Jia Z.S. // Chem. J. Chin. Univ. 2003. V. 24. P. 1231–1233.
  79. Котельников А.И., Романова В.С., Богданов Г.Н., Коновалова Н.П., Писаренко О.И., Котельникова Р.А., Файнгольд И.И., Фрог Е.С., Бубнов Ю.Н., Давыдов М.И., Алдошин С.М. // Патент RU 2462473 С2, опубл. 27.09.2012.
  80. Андреев С.М., Башкатова Е.Н., Башкатова Ю.Н., Хаитов М.Р., Петрухина А.О. // Патент RU 2462474 С2, опубл. 27.09.2012.
  81. Котельников А.И., Котельникова Р.А., Богданов Г.Н., Коновалова Н.П., Алдошин С.М., Романова В.С., Бубнов Ю.Н. // Международ. форум по нанотехнологиям “Rusnanotech’08” (Москва, 3–5 декабря 2008 г.): сб. тез. докл. Глава 4.3. Конструкционные наноматериалы и наноматериалы со специальными свойствами. Москва, 2008. С. 390–392.
  82. Romanova V.S., Shepeta N.Yu., Buyanovskaya A.G., Takazova R.U. // Processes of Petrochemistry and Oil Refining. 2019. V. 20. № 1. P. 14–24.
  83. Долинина Т.Ю., Лужков В.Б. // Изв. РАН. Сер. хим. 2012. № 8. С. 1614–1617.
  84. Taylor R., Walton D.R.M. // Nature. 1993. V. 363. P. 685–693.  
<https://doi.org/10.1038/363685a0>
  85. Тимофеева Г.И., Тепанов А.А., Лопанов В.А., Романова В.С. // Изв. РАН. Сер. хим. 2012. № 8. С. 1618–1620.
  86. Nambo M., Segawa Y., Wakamiya A., Itami K. // Chem. Asian J. 2011. V. 6. P. 590–598.  
<https://doi.org/10.1002/asia.201000583>
  87. Minois P., Bayardon J., Meunier-Prest R., Jugé S. // J. Org. Chem. 2017. V. 82. P. 11358–11369.  
<https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b01737>
  88. Vol’pin M.E., Belavtseva E.M., Romanova V.S., Lapshin A.I., Arefeva L.I., Parnes Z.N. // Mendeleev Commun. 1995. V. 5. P. 129–131.
  89. Белавцева Е.М., Киченко Е.В., Романова В.С., Парнес З.Н., Вольпин М.Е. // Изв. РАН. Сер. хим. 1996. № 4. С. 876–878.
  90. Белавцева Е.М., Романова В.С., Кулешова Е.Ф., Парнес З.Н., Вольпин М.Е. // Биофизика. 2000. Т. 45. № 2. С. 257–259.
  91. Белавцева Е.М., Парнес З.Н., Романова В.С., Щетнев Ю.Ф. // XVIII Российская конференция по электронной микроскопии “ЭМ’2000” (5 июня–8 июля 2000 г.): сб. тез. докл. Черноголовка, 2000. С. 75.
  92. Belavtseva E.M., Romanova V.S., Lapshin A.I., Kuleshova E.F., Parnes Z.N., Vol’pin M.E. // Mendeleev Commun. 1996. V. 6. P. 171–173.
  93. Волков В.А., Воронков М.В., Сажина Н.Н., Курилов Д.В., Вохмянина Д.В., Ямскова О.В., Мартиросян Ю.Ц., Антрошенко Д.Л., Мартиросян Л.Ю., Романова В.С. // Кинетика и катализ. 2021. Т. 62. С. 343–353.  
<https://doi.org/10.31857/S0453881121030096>
  94. Вольпин М.Е., Парнес З.Н., Романова В.С. // Изв. РАН. Сер. хим. 1998. № 5. С. 1050–1054.
  95. Тимофеева Г.И., Романова В.С., Лопанова Л.А. // Изв. РАН. Сер. хим. 1996. № 4. С. 879–882.
  96. Тимофеева Г.И., Кулешова Е.Ф., Романова В.С. // Изв. РАН. Сер. хим. 1997. № 3. С. 493–496.
  97. Timofeeva G.I., Kuleshova E.F., Romanova V.S. // Mendeleev Commun. 1997. V. 7. P. 37–38.
  98. Timofeeva G.I., Kuleshova E.F., Romanova V.S. // Mendeleev Commun. 1997. V. 7. P. 182–184.
  99. Тимофеева Г.И., Романова В.С. // Изв. РАН. Сер. хим. 2007. № 12. С. 2307–2311.
  100. Тимофеева Г.И., Романова В.С. // Изв. РАН. Сер. хим. 2010. № 1. С. 277–280.
  101. Даниленко А.Н., Романова В.С., Кулешова Е.Ф., Парнес З.Н., Браудо Е.Е. // Изв. РАН. Сер. хим. 1998. № 11. С. 2202–2204.
  102. Miller G.P., Millar J.M., Liang B.M., Uldrich S., Johnston J.E. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1993. P. 897–899.  
<https://doi.org/10.1039/C39930000897>
  103. Клеменкова Э.С., Романова В.С., Цыряпкин В.А., Кулешова Е.Ф., Парнес З.Н., Локшин Б.В., Вольпин М.Е. // Докл. Междунар. симп. “Аминокислоты и их производные” (Гродно, 23–25 октября 1996 г.). Весці АН Беларусі. Сер. хім. н. 1997. № 2. С. 48–54.
  104. Shang Z.F., Teng Q.W., Pan Y.M., Zhao X.Z., Tang A.Q., Feng J.K. // Huaxue Xuebao Acta Chim. Sin. 1997. V. 55. P. 417–422.
  105. Романова В.С., Бабиевский К.К., Ямсков И.А. // Изв. РАН. Сер. хим. 2010. № 3. С. 650–652.
  106. Бабиевский К.К., Романова В.С., Давидович Ю.А., Ямсков И.А. // Изв. РАН. Сер. хим. 2013. № 12. С. 2609–2611.
  107. Лужков В.Б., Романова В.С., Котельников А.И. // Изв. РАН. Сер. хим. 2014. № 3. С. 567–571.

108. *Shestopalova A.A., Semenov K.N., Charykov N.A., Postnov V.N., Ivanova N.M., Sharoyko V.V., Keskinov V.A., Letenko D.G., Nikitin V.A., Klepikov V.V., Murin I.V.* // *J. Mol. Liq.* 2015. V. 211. P. 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.07.022>
109. *Волков В.А., Ямскова О.В., Шепель Н.Э., Романова В.С., Курилов Д.В., Трегубов А.В., Вышиванная О.В., Воронков М.В., Ямсков И.А., Мисин В.М., Зубарева Н.Д., Кустов Л.М.* // *Журн. физ. химии.* 2019. Т. 93. С. 1674–1680.
110. *Файнгольд И.И., Котельникова Р.А., Коновалова Н.П., Романова В.С., Мищенко Д.В., Полетаева Д.А., Богданов Г.Н., Котельников А.И.* // *Рос. биотерапевтич. журнал.* 2010. Т. 9. С. 81.
111. *Котельников А.И., Котельникова Р.А., Богданов Г.Н., Коновалова Н.П., Файнгольд И.И., Мищенко Д.В., Баринов А.В., Рубцов А.Ю., Романова В.С.* // *Сб. докл. III Троицкой конференции “Медицинская физика и инновации в медицине” (Троицк, 3–6 июня 2008 г.). Альм. клин. мед.* Т. 17. Ч. 2. Москва, 2008. С. 340–343.
112. *Богданова Ю.Г., Должикова В.Д., Клеменкова З.С., Романова В.С., Тимофеева Г.И., Богданов Г.Н., Харлов А.Е.* // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2013. Т. 54. С. 102–111.
113. *Богданова Ю.Г., Романова В.С., Тимофеева Г.И., Клеменкова З.С., Мищенко Д.В., Рыбкин А.Ю., Богданов Г.Н., Котельникова Р.А., Котельников А.И.* // *Сб. статей “Структура и динамика молекулярных систем”, Йошкар-Ола–Москва–Уфа–Казань, 2012. Вып. 19. Т. 1. С. 105–107.*
114. *Tamanini E., Pantoş G.D., Sanders J.K.M.* // *Chemistry.* 2010. V. 16. P. 81–84. <https://doi.org/10.1002/chem.200902662>
115. *Wietor J.L., Pantoş G.D., Sanders J.K.M.* // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008. V. 47. P. 2689–2692. <https://doi.org/10.1002/anie.200704983>
116. *Szymanski M., Wierzbicki M., Gilski M., Jędrzejewska H., Sztylko M., Smoch P., Shkurenko A., Jaskólski M., Szumna A.* // *Chemistry.* 2016. V. 22. P. 3148–3155. <https://doi.org/10.1002/chem.201504451>
117. *Hashizume H., Hirata C., Fujii K., Miyazawa K.* // *Sci. Technol. Adv. Mater.* 2015. V. 16. № 6. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/16/6/065005>
118. *Basiuk V.A., Gonzalez-Luciano E.* // *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures.* 2016. V. 24. P. 371–379. <https://doi.org/10.1080/1536383X.2016.1163687>
119. *DeLeon A., Jalbout A.F., Basiuk V.A.* // *Chem. Phys. Lett.* 2008. V. 452. P. 306–314. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2007.12.065>
120. *Krusic P.J., Wasserman E., Keizer P.N., Morton J.R., Preston K.F.* // *Science.* 1991. V. 254. P. 1183–1185. <https://doi.org/10.1126/science.254.5035.1183>
121. *Sergeeva V., Kraevaya O., Ershova E., Kameneva L., Malinovskaya E., Dolgikh O., Konkova M., Voronov I., Zhilenkov A., Veiko N., Troshin P., Kutsev S., Kostyuk S.* // *Oxid. Med. Cell Longev.* 2019. V. 2019. P. 4398695. <https://doi.org/10.1155/2019/4398695>
122. *Gharbi N., Pressac M., Hadchouel M., Szwarc H., Wilson S.R., Moussa F.* // *Nano Lett.* 2005. V. 5. P. 2578–2585. <https://doi.org/10.1021/nl051866b>
123. *Foley S., Crowley C., Smahi M., Bonfils C., Erlanger B.F., Seta P., Larroque C.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. V. 294. P. 116–119. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00445-X](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00445-X)
124. *Youle R.J., Karbowski M.* // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2005. V. 6. P. 657–663. <https://doi.org/10.1038/nrm1697>
125. *Yu T., Zhen M., Li J., Zhou Y., Ma H., Jia W., Wang C.* // *Dalton. Trans.* 2019. V. 48. P. 7884. <https://doi.org/10.1039/c9dt00800d>
126. *Tsai M.C., Chen Y.H., Chiang L.Y.* // *J. Pharm. Pharmacol.* 1997. V. 49. P. 438–445. <https://doi.org/10.1111/j.2042-1758.1997.tb06821.x>
127. *Lotharius J., Dugan L.L., O'Malley K.L.* // *J. Neurosci.* 1999. V. 19. P. 1284–1293. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-04-01284.1999>
128. *Bisaglia M., Natalini B., Pellicciari R., Straface E., Malorni W., Monti D., Franceschi C., Schettini G.* // *J. Neurochem.* 2000. V. 74. P. 1197–1204. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.741197.x>
129. *Lin A.M.Y., Chyi B.Y., Wang S.D., Yu H.H., Kanakamma P.P., Luh T.Y., Chou C.K., Ho L.T.* // *J. Neurochem.* 1999. V. 72. P. 1634–1640. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.721634.x>
130. *Lin A.M.Y., Fang S.F., Lin S.Z., Chou C.K., Luh T.Y., Ho L.T.* // *Neurosci. Res.* 2002. V. 43. P. 317–321. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.721634.x>
131. *Chen Y.W., Hwang K.C., Yen C.C., Lai Y.L.* // *J. Physiol. Regul. Integr. Compar. Physiol.* 2004. V. 287. P. R21–R26. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00310.2003>
132. *Chen T., Li Y., Zhang J., Xu B., Lin Y., Wang C., Guan W., Wang Y., Xu S.* // *J. Appl. Toxicol.* 2011. V. 31. P. 255–261. <https://doi.org/10.1002/jat.1588>
133. *Hu Z., Guan W.C., Wang W., Huang L.Z., Xing H.P., Zhu Z.* // *Cell Biol. Int.* 2007. V. 31. P. 798–804. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.02.009>
134. *Dugan L.L., Turetsky D.M., Du C., Lobner D., Wheeler M., Almlı C.R., Shen C.K.F., Luh T.Y., Choi D.W., Lin T.S.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. P. 9434–9439. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.17.9434>
135. *Straface E., Natalini B., Monti D., Franceschi C., Schettini G., Bisaglia M., Fumelli C., Pincelli C., Pellicciari R., Malorni W.* // *FEBS Lett.* 1999. V. 454. P. 335–340. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00812-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00812-1)
136. *Xiao L., Takada H., Gan X.H., Miwa N.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006. V. 16. P. 1590–1595. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.12.011>
137. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* // *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.* Москва: Наука, 1972. 252 с.
138. *Uno K., Nicholls S.J.* // *Biomark Med.* 2010. V. 4. P. 361–373. <https://doi.org/10.2217/bmm.10.57>
139. *Bonda D.J., Wang X.L., Perry G., Nunomura A., Tabaton M., Zhu X.W., Smith M.A.* // *Neuropharmacology.*

2010. V. 59. P. 290–294.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.04.005>
140. *Berry M.D., Juorio A.V., Paterson I.A.* // Progress in Neurobiology. 1994. V. 42. P. 375–391.  
[https://doi.org/10.1016/0301-0082\(94\)90081-7](https://doi.org/10.1016/0301-0082(94)90081-7)
141. *Жохова Д.А., Котельникова Р.А., Котельников А.И., Богданов Г.Н., Мищенко Д.В., Романова В.С., Андреев С.М., Куц А.А.* // Сб. тез. докл. Всероссийской школы-семинара “Нанобиотехнологии: проблемы и перспективы” (Белгород, 9–11 декабря 2008 г.). Белгород, 2008. С. 61.
142. *Богданов Г.Н., Котельникова Р.А., Фрог Е.С., Штолько В.Н., Романова В.С., Бубнов Ю.Н.* // Докл. РАН. 2004. Т. 396. С. 401–403.
143. *Богданова Ю.Г., Тепанов А.А., Иоутси В.А., Романова В.С., Богданов Г.Н., Котельникова Р.А., Мищенко Д.В., Рыбкин А.Ю., Котельников А.И.* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2012. Т. 53. С. 241–245.
144. *Hu Z., Guan W.C., Wang W., Huang L.Z., Tang X.Y., Xu H., Zhu Z., Xie X.Z., Xing H.P.* // Carbon. 2008. V. 46. P. 99–109.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbon.2007.10.041>
145. *Котельникова Р.А., Файнгольд И.И., Полетаева Д.А., Мищенко Д.В., Романова В.С., Штолько В.Н., Богданов Г.Н., Рыбкин А.Ю., Фрог Е.С., Смолина А.В., Куц А.А., Федорова Н.Е., Котельников А.И.* // Изв. АН. Сер. хим. 2011. № 6. С. 1146–1150.
146. *Фрог Е.С., Котельникова Р.А., Богданов Г.Н., Романова В.С.* // Сб. тез. докл. II Ежегодной молодежной конференции ИБХФ-ВУЗы “Биохимическая физика” (13–14 июня 2002 г.). Москва: ИБХФ РАН, 2002. С. 15–16.
147. *Котельникова Р.А., Полетаева Д.А., Смолина А.В., Файнгольд И.И., Мищенко Д.В., Григорьев В.В., Болкунов А.В., Ванькин Г.И., Замойский В.Л., Романова В.С., Бачурин С.О.* // В кн: Органические и гибридные наноматериалы: получение, исследование, применение. Глава 10 / Под ред. Разумова В.Ф., Ключева М.В. Иваново: Ивановский государственный университет, 2011. С. 238–251.
148. *Котельникова Р.А., Григорьев В.В., Смолина А.В., Файнгольд И.И., Мищенко Д.В., Ванькин Г.И., Замойский В.Л., Полетаева Д.А., Маркова Н.А., Романова В.С., Котельников А.И., Алиев Г., Бачурин С.О.* // Изв. РАН. Сер. хим. 2014. С. 2375–2382.
149. *Смолина А.В., Григорьев В.В., Болкунов А.В., Ванькин Г.И., Замойский В.Л., Котельникова Р.А., Полетаева Д.А., Мищенко Д.В., Файнгольд И.И., Маркова Н.А., Романова В.С.* // Сб. тез. докл. VIII Международного и междисциплинарного конгресса “Нейронаука для медицины и психологии” (Крым, Судак, 2–12 июня 2012 г.). Судак, 2012. С. 380–381.
150. *DaRos T., Prato M.* // Chem. Commun. 1999. P. 663–669.  
<https://doi.org/10.1039/A809495K>
151. *Орлова М.А., Трофимова Т.П., Орлов А.П., Шаталов О.А., Наполов Ю.К., Свистунов А.А., Чехонин В.П.* // Онкогематология. 2013. Т. 8. С. 65–71.  
<https://doi.org/10.17650/1818-8346-2013-8-1-65-71>
152. *Serda M., Szewczyk G., Krzysztowska-Kuleta O., Korzuch J., Dulski M., Musioł R., Sarna T.* // ACS Biomater. Sci. Eng. 2020. V. 6. P. 5930–5940.  
<https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c00932>
153. *Antoku D., Satake S., Mae T., Sugikawa K., Funabashi H., Kuroda A., Ikeda A.* // Chemistry. 2018. V. 24. P. 7335–7339.  
<https://doi.org/10.1002/chem.201800674>
154. *Li Z., Pan L.L., Zhang F.L., Wang Z., Shen Y.Y., Zhang Z.Z.* // J. Nanosci. Nanotechnol. 2014. V. 14. P. 4513–4518.  
<https://doi.org/10.1166/jnn.2014.8242>
155. *Tokuyama H., Yamago S., Nakamura E., Shiraki T., Sugiura Y.* // J. Am. Chem. Soc. 1993. V. 115. P. 7918–7919.  
<https://doi.org/10.1021/ja00070a064>
156. *Guldi D.M., Prato M.* // Acc. Chem. Res. 2000. V. 33. P. 695–703.  
<https://doi.org/10.1021/ar990144m>
157. *Meshcheriakov A.A., Iurev G.O., Lutsev M.D., Podolsky N.E., Ageev S.V., Petrov A.V., Vasina L.V., Solovtsova I.L., Sharoyko V.V., Murin I.V., Semenov K.N.* // Colloids. Surf. B. Biointerfaces. 2020. V. 196. P. 111338.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111338>
158. *Tabata Y., Murakami Y., Ikada Y.* // Jpn. J. Cancer Res. 1997. V. 88. P. 1108–1116.  
<https://doi.org/10.1080/15363839708013312>
159. *Tabata Y., Ikada Y.* // Pure Appl. Chem. 1999. V. 71. P. 2047–2053.  
<https://doi.org/10.1351/pac199971112047>
160. *Ikeda A., Mae T., Ueda M., Sugikawa K., Shigeto H., Funabashi H., Kuroda A., Akiyama M.* // Chem. Commun. 2017. V. 53. P. 2966–2969.  
<https://doi.org/10.1039/C7CC00302A>
161. *Zhao B.Z., He Y.Y., Bilski P.J., Chignell C.F.* // Chem. Res. Toxicol. 2008. V. 21. P. 1056–1063.  
<https://doi.org/10.1021/tx800056w>
162. *Belik A.Y., Rybkin A.Y., Goryachev N.S., Sadkov A.P., Filatova N.V., Buyanovskaya A.G., Talanova V.S., Klemenkova Z.S., Romanova V.S., Koifman M.O., Terentiev A.A., Kotelnikov A.I.* // Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectroscopy. 2021. V. 260. 119885.  
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119885>
163. *Rasnetsov L.D., Shvartsman Ia.Yu., Suvorova O.N.* // Patent US 9096492 B2, publ. 04.08.2015.
164. *Rasnetsov L.D., Shvartsman Ia.Yu., Suvorova O.N.* // Patent US 9221746 B2, publ. 29.12.2015.
165. *Wong C.-W., Zhilenkov A.V., Kraevaya O.A., Mischenko D.V., Troshin P.A., Hsu S.* // J. Med. Chem. 2019. V. 62. P. 7111–7125.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00652>
166. *Корнев А.Б., Хакина Е.А., Иванчихина А.В., Конова-лова Н.П., Разумов В.Ф., Трошин П.А.* // Патент RU 2550030 C2, опубл. 10.05.2015.
167. *Кузума О.А., Bashmakova N.V., Gorshkova Yu.E., Ivankov O.I., Mikheev I.V., Kuzmenko M.O., Kutovyy S.Yu., Nikolaienko T.Yu.* // J. Mol. Liquids.

2019. V. 278. P. 452–459.  
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.01.062>
168. Meng J., Liang X.J., Chen X.Y., Zhao Y.L. // *Integr. Biol.* 2013. V. 5. P. 43–47.  
<https://doi.org/10.1039/c2ib20145c>
169. Yang D., Zhao Y.L., Guo H., Li Y., Tewary P., Xing G.M., Hou W., Oppenheim J.J., Zhang N. // *ACS Nano*. 2010. V. 4. P. 1178–1186.
170. Murphy S.V., Hale A., Reid T., Olson J., Kidiyoor A., Tan J., Zhou Z., Jackson J., Atala A. // *Methods*. 2016. V. 99. P. 99–111.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.11.004>
171. Li J., Chen L., Yan L., Gu Z., Chen Z., Zhang A., Zhao F. // *Molecule*. 2019. V. 24. P. 2387.  
<https://doi.org/10.3390/molecules24132387>
172. Dellinger A., Olson J., Link K., Vance S., Sandros M.G., Yang J., Zhou Z., Kepley C.L. // *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* 2013. V. 15. P. 7.  
<https://doi.org/10.1186/1532-429X-15-7>
173. Тихонов А.Н. // *Соросовский образоват. журнал*. 1997. № 11. С. 8–15.
174. Wharton T., Wilson L.J. // *Bioorg. Med. Chem.* 2002. V. 10. P. 3545–3554.  
[https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(02\)00252-3](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(02)00252-3)
175. Diener M.D., Alford J.M., Kennel S.J., Mirzadeh S. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. P. 5131–5138.  
<https://doi.org/10.1021/ja068639b>
176. Lin Y.L., Lei H.Y., Wen Y.Y., Luh T.Y., Chou C.K., Liu H.S. // *Virology*. 2000. V. 275. P. 258–262.  
<https://doi.org/10.1006/viro.2000.0490>
177. Li H., Chen S., Peng X., Sun J., Shu C., Jiang L., Wang C. // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2016. V. 16. P. 2504.  
<https://doi.org/10.1166/jnn.2016.10797>
178. Tsao N., Luh T.Y., Chou C.K., Chang T.Y., Wu J.J., Liu C.C., Lei H.Y. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2002. V. 49. P. 641–649.  
<https://doi.org/10.1093/jac/49.4.641>
179. Zhang J., Xu J., Ma H., Bai H., Liu L., Shu C., Li H., Wang S., Wang C. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2019. V. 11. P. 14597–14607.  
<https://doi.org/10.1021/acsami.9b01483>
180. Mashino T., Shimotohno K., Ikegami N., Nishikawa D., Okuda K., Takahashi K., Nakamura S., Mochizuki M. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005. V. 15. P. 1107–1109.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.12.030>
181. Nakamura S., Ikegami N., Harada M., Shimotohno K., Takahashi K., Mashino T. // *J. Kyoritsu Univ. Pharm.* 2006. № 1. P. 77–84.  
<https://doi.org/10.1272/jnms.79.248>
182. Думнис М.А., Николаев Д.Н., Литасова Е.В., Ильин В.В., Брусина М.А., Пиотровский Л.Б. // *Обз. по клин. фармакол. и лекарств. терапии*. 2018. Т. 16. С. 4–20.
183. Фальинскова И.Н., Ионова К.С., Дедова А.В., Ленева И.А., Махмудова Н.Р., Раснецов Л.Д. // *Хим.-фарм. журн.* 2014. Т. 48. С. 17–20.
184. Миллер Г.Г., Романова В.С., Покидьшева Л.Н., Титова И.В., Калиберда Е.Н., Руми Л.Д., Андреева О.И., Рыбалкин Н.П. // *Антибиотики и химиотерапия*. 2004. Т. 49. С. 3–8.
185. Dąbrowska A., Pieńko T., Taciak P., Wiktorska K., Chilmonczyk Z., Mazurek A.P., Stasiulewicz A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. P. 3231.  
<https://doi.org/10.3390/ijms19103231>
186. Халиков Ш.Х., Шарипова Д., Зафаров С.З., Умархон М., Алиева С.В. // *Химия природ. соединений*. 2017. № 1. С. 102–108.
187. Khalikov Sh.Kh., Sharipova D., Zafarov S.Z., Umarchon M., Jalalifar M. // *Int. J. Modern Chem.* 2016. V. 8. P. 1–18.
188. Котельникова Р.А., Файнгольд И.И., Богданов Г.Н., Фрог Е.С., Мищенко Д.В., Романова В.С., Куц А.А., Котельников А.И. // *Сб. тез. докл. VII Международ. конференции “Биоантиоксидант” (Москва, 25–26 октября 2006 г.)*. Москва: РУДН, 2006. С. 54–55.
189. Федорова Н.Е., Адуева С.М., Меджидова А.А., Романова В.С., Парнес З.Н., Галегов Г.А., Куц А.А. // *Вопр. вирусол.* 2002. Т. 47. С. 30–34.
190. Миллер Г.Г., Куц А.А., Романова В.С. // *Патент RU 2196602 C1*, опубл. 20.01.2003.
191. Меджидова М.Г., Абдуллаева М.В., Федорова Н.Е., Романова В.С., Куц А.А. // *Антибиотики и химиотерапия*. 2004. Т. 49. С. 13–20.
192. Куц А.А., Климова Р.Р., Федорова Н.Е., Трошин П.А., Корнев А.Б. // *Патент RU 2533232 C2*, опубл. 20.11.2014.
193. Pinneo M. // In: *Prospects in Nanotechnology: Toward Molecular Manufacturing, Proceedings of the First General Conference on Nanotechnology: Development, Applications, and Opportunities*, 11–14 November, 1992. New York: John Wiley & Sons., 1995. P. 147–172.
194. Chen B.X., Wilson S.R., Das M., Coughlin D.J., Erlanger B.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 10809–10813.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.18.1080>
195. Braden B.C., Goldbaum F.A., Chen B.X., Kirschner A.N., Wilson S.R., Erlanger B.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 12193–12197.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.21039619>
196. Андреев С.М., Бабахин А.А., Петрухина А.О., Романова В.С., Парнес З.Н., Петров Р.В. // *Докл. РАН*. 2000. Т. 370. С. 261–264.
197. Андреев С.М., Бабахин А.А. // *Сб. тез. докл. Международ. форума по нанотехнологиям “Rusnanotech’08” (Москва, 3–5 декабря 2008 г.)*. Москва, 2008. Т. 2. С. 88–89.
198. Андреев С.М., Петрухина А.О., Бабахин А.А., Германова А.В., Романова В.С., DuBuske L.V. // *Иммунология*. 2006. Т. 27. С. 343–348.
199. Парнес З.Н., Романова В.С., Андреев С.М., Петрухина А.О., Вольпин М.Е. // *Патент RU 2129436 C1*, опубл. 27.04.1999.
200. Hendrickson O., Fedyunina N., Zherdev A., Solopova O., Sveshnikov P., Dzantiev B. // *Analyst*. 2012. V. 137.

- Р. 98–105.  
<https://doi.org/10.1039/C1AN15745K>
201. *Titov V.M., Meshcheryakova E.A., Balashova T.A., Andronova T.M., Ivanov V.T.* // *Int. J. Pept. Protein Res.* 1995. V. 45. P. 348–355.  
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1995.tb01048.x>
202. *Масалова О.В., Шепелев А.В., Атанадзе С.Н., Парнес З.Н., Романова В.С., Вольпина О.М., Семилетов Ю.А., Куц А.А.* // Докл. РАН. 1999. Т. 369. С. 411–413.
203. *Halliwel B.* // *J. Neurochem.* 1992. V. 59. P. 1609–1623.  
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb10990.x>
204. *Dugan L.L., Lovett E.G., Quick K.L., Lotharius J., Lin T.T., O'Malley K.L.* // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2001. V. 7. P. 243–246.  
[https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(00\)00064-X](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(00)00064-X)
205. *Подольский И.Я., Кондратьева Е.В., Щеглов И.В., Думнис М.А., Пиотровский Л.Б.* // *Физика твердого тела.* 2002. Т. 44. С. 552–553.
206. *Kim J.E., Lee M.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 303. P. 576–579.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00393-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00393-0)
207. *Бобылев А.Г., Шпагина М.Д., Бобылева Л.Г., Окунева А.Д., Пиотровский Л.Б., Подлубная З.А.* // *Биофизика.* 2012. Т. 57. С. 416–421.
208. *Makarova E.G., Gordon R.Y., Podolski I.Ya.* // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2012. V. 12. P. 119–126.  
<https://doi.org/10.1166/jnn.2012.5709>
209. *Gordon R., Podolski I., Makarova E., Deev A., Mugantseva E., Khutsyan S., Sengpiel F., Murashev A., Vorobyov V.* // *J. Alzheimer's Dis.* 2017. V. 58. P. 711–724.  
<https://doi.org/10.3233/JAD-161182>
210. *Xie L.G., Luo Y., Lin D.D., Xi W.H., Yang X.J., Wei G.H.* // *Nanoscale.* 2014. V. 6. P. 9752–9762.  
<https://doi.org/10.1039/C4NR01005A>
211. *Huy P.D.Q., Li M.S.* // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2014. V. 16. P. 20030–20040.  
<https://doi.org/10.1039/C4CP02348J>
212. *Hashimoto M., Rockenstein E., Crews L., Masliah E.* // *Neuromol. Med.* 2003. V. 4. P. 21–36.
213. *Podolski I.Ya., Podlubnaya Z.A., Kosenko E.A., Mugantseva E.A., Makarova E.G., Marsagishvili L.G., Shpagina M.D., Kaminsky Yu.G., Andrievsky G.V., Klochkov V.K.* // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2007. V. 7. P. 1479–1485.
214. *Подлубная З.А., Подольский И.Я., Шпагина М.Д., Марсагишвили Л.Г.* // *Биофизика.* 2006. Т. 51. С. 795–799.
215. *Макарова Е.Г., Кордонец О.Л., Муганцева Е.А., Марсагишвили Л.Г., Шпагина М.Д., Подлубная З.А., Годухин О.В., Подольский И.Я.* // Сб. тез. докл. III Международ. и междисциплинар. конгресса “Нейронаука для медицины и психологии” (Крым, Судак, 12–20 июня 2007 г.). Судак, 2007. С. 149–150.
216. *Марсагишвили Л.Г., Бобылев А.Г., Шпагина М.Д., Трошин П.А., Подлубная З.А.* // *Биофизика.* 2009. Т. 54. С. 202–205.
217. *Бобылев А.Г., Марсагишвили Л.Г., Шпагина М.Д., Подлубная З.А.* // *Технол. жив. систем.* 2009. Т. 6. С. 46–53.
218. *Vednarikova Z., Huy P.D.Q., Mocanu M.M., Fedunova D., Li M.S., Gazova Z.* // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2016. V. 18. P. 18855–18867.  
<https://doi.org/10.1039/C6CP00901H>
219. *Бобылев А.Г., Марсагишвили Л.Г., Шпагина М.Д., Романова В.С., Котельникова Р.А., Подлубная З.А.* // *Биофизика.* 2010. Т. 55. С. 394–399.
220. *Григорьев В.В., Петрова Л.Н., Иванова Т.А., Котельникова Р.А., Богданов Г.Н., Полетаева Д.А., Файнгольд И.И., Мищенко Д.В., Романова В.С., Котельников А.И., Бачурин С.О.* // *Изв. АН. Сер. биол.* 2011. № 2. С. 163–170.
221. *Пиотровский Л.Б.* // *Рос. нанотехнологии.* 2007. Т. 2. С. 6–18.
222. *Пиотровский Л.Б.* // *Очерки о наномедицине.* СПб.: Европейский дом, 2013. 207 с.
223. *Boutorine A.S., Tokuyama H., Takasugi M., Isobe H., Nakamura E., Hélène C.* // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1994. V. 33. P. 2462–2465.  
<https://doi.org/10.1002/anie.199424621>
224. *DaRos T., Vázquez E., Spalluto G., Moro S., Boutorine A., Prato M.* // *J. Supramol. Chem.* 2002. V. 2. P. 327–334.  
[https://doi.org/10.1016/S1472-7862\(03\)00089-3](https://doi.org/10.1016/S1472-7862(03)00089-3)
225. *Пиотровский Л.Б., Литасова Е.В., Думнис М.А., Николаев Д.Н., Яковлева Е.Е., Драволлина О.А., Беспалов А.Ю.* // Докл. РАН. 2016. Т. 468. P. 108–110.
226. *Rancan F., Helmreich M., Mölich A., Ermilov E.A., Jux N., Röder B., Hirsch A., Böhm F.* // *Bioconjugate Chem.* 2007. V. 18. P. 1078–1086.  
<https://doi.org/10.1021/bc0603337>
227. *Nishihara M., Perret F., Takeuchi T., Futaki S., Lazar A.N., Coleman A.W., Sakai N., Matile S.* // *Org. Biomol. Chem.* 2005. V. 3. P. 1659–1669.  
<https://doi.org/10.1039/B501472G>
228. *Sitharaman B., Zakharian T.Y., Saraf A., Misra P., Ashcroft J., Pan S., Pham Q.P., Mikos A.G., Wilson L.J., Engler D.A.* // *Mol. Pharmaceutics.* 2008. V. 5. P. 567–578.  
<https://doi.org/10.1021/mp700106w>
229. *Liu Z., Liang X.J.* // *Theranostics.* 2012. V. 2. P. 235–237.  
<https://doi.org/10.7150/thno.4156>
230. *Cerón M.R., Maffei V., Stevenson S., Echegoyen L.* // *Inorg. Chim. Acta.* 2017. V. 468. P. 16–27.  
<https://doi.org/10.1016/j.ica.2017.03.040>
231. *Liu J.H., Cao L., Luo P.J.G., Yang S.T., Lu F.S., Wang H.F., Meziani M.J., Haque S.A., Liu Y.F., Lacher S., Sun Y.P.* // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2010. V. 2. P. 1384–1389.  
<https://doi.org/10.1021/am100037y>
232. *Krishna V., Singh A., Sharma P., Iwakuma N., Wang Q., Zhang Q.Z., Knapik J., Jiang H.B., Grobmyer S.R., Koopman B., Moudgil B.* // *Small.* 2010. V. 6. P. 2236–2241.  
<https://doi.org/10.1002/smll.201000847>

**C<sub>60</sub> Fullerene Amino Acid Derivatives: Synthesis and Biomedical Applications****O. V. Yamskova\***, **D. V. Kurilov\*\***, **V. A. Volkov\*\*\*, #**, **M. V. Voronkov\*\*\***, and **I. V. Zavarzin\*\***

#E-mail: vl.volkov@mail.ru

\*Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 28, Moscow, 119991 Russia

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

\*\*\*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, ul. Kosygina 4, 119334 Russia

Water-soluble forms of fullerene C<sub>60</sub> possess unique physicochemical and biological properties, making them promising candidates for the development of various drugs in the fields of medicine and veterinary science. Of particular interest are studies on the synthesis and characterization of C<sub>60</sub> fullerene derivatives with biogenic additives such as amino acids and peptides. This review focuses on different approaches to the synthesis of amino acid derivatives of fullerene C<sub>60</sub> and their promising biomedical applications.

*Keywords: fullerene, amino acid derivatives, organic synthesis, water-soluble derivatives, amino acid and peptide derivatives of fullerene, physicochemical properties, analytical methods, biological activity, biomedical applications*



УДК 577.115.3:577.125.3

## ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ ЗАПАСНЫХ ЛИПИДОВ ПРИ ВОССТАНОВЛЕНИИ ЧАСТИЧНО ОБЕСЦВЕЧЕННОГО КОРАЛЛА *Sinularia heterospiculata*

© 2023 г. Т. В. Сикорская\*, #, Д. Д. Солодий\*, \*\*, Е. В. Маськин\*, \*\*

\*Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН,  
Россия, 690041 Владивосток, ул. Пальчевского, 17

\*\*Дальневосточный федеральный университет, кафедра биохимии и биотехнологии, Институт Мирового океана,  
Россия, 690922 Владивосток, п. Аякс, 10

Поступила в редакцию 09.11.2022 г.

После доработки 15.11.2022 г.

Принята к публикации 16.11.2022 г.

В связи с глобальным потеплением коралл теряет симбиотических динофлагеллят, что приводит к его обесцвечиванию. Исследования по восстановлению кораллов имеют первостепенное значение для сохранения экосистемы коралловых рифов. Липидомный подход может предоставить детальную информацию о процессах, протекающих в организме коралла при обесцвечивании и восстановлении. С помощью сверхкритической флюидной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией была изучена динамика изменений профиля молекулярных видов основных классов запасных липидов триацилглицеридов (ТГ) и моноалкилдиацилглицеридов (МАДАГ) в процессе восстановления октокоралла *Sinularia heterospiculata* после теплового стресса (32°C). Показано, что после перенесенного теплового стресса МАДАГ играют ключевую роль в энергетическом балансе организма *S. heterospiculata*. При стрессе *S. heterospiculata* в первую очередь расходовал насыщенные молекулярные виды МАДАГ. Изменения в профиле молекулярных видов ТГ происходили только на 16-е сутки эксперимента. Вероятно, при восстановлении после перенесенного стресса октокоралл *S. heterospiculata* меняет энергетическую стратегию, поэтому происходит перестройка качественного состава запасных липидов.

**Ключевые слова:** обесцвечивание кораллов, октокораллы, липидомика, хромато-масс-спектрометрия, запасные липиды

**DOI:** 10.31857/S0132342323050068, **EDN:** AQFLLS

### ВВЕДЕНИЕ

Коралловые рифы – это уникальные тропические и субтропические экосистемы [1]. Половина известных в настоящее время видов коралловых полипов – симбиотические организмы, гастро-дермальные клетки которых содержат динофлагеллят семейства Symbiodiniaceae (СД). Известно, что коралловые рифы шельфовых зон находятся под угрозой исчезновения. Это связано с глобальным потеплением и, как следствие, повышением температуры воды поверхности океана, что приводит к разрушению симбиоза и потере СД или обесцвечиванию кораллов.

Коралловые рифы, помимо твердых, населяют мягкие кораллы (подкласс Octocorallia), которые

содержат в своих тканях известковые включения (спикулы). *Sinularia heterospiculata* относится к наиболее многочисленному отряду октокораллов Alcyonacea, в котором различают до 40 родов и 1200 видов [2]. Мягкие кораллы, обитающие на больших глубинах, не защищены от воздействий природных и антропогенных явлений, однако они лучше адаптированы к климатическим аномалиям по сравнению с рифообразующими кораллами [3]. На сегодняшний день исследования по различным аспектам обесцвечивания и восстановления основывались главным образом на изучении рифообразующих видов кораллов (подкласс Hexacorallia) [4, 5]. Изучение большего числа видов кораллов различных подгрупп может способствовать формированию более полного понимания механизмов процесса обесцвечивания кораллов. Исследования по восстановлению кораллов имеют первостепенное значение для сохранения экосистем коралловых рифов.

Сокращения: МАДАГ – моноалкилдиацилглицериды; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; ТГ – триацилглицериды.

# Автор для связи: (тел.: +7 (423) 231-09-05; эл. почта: miss.tatyanna@yandex.ru).

Ткани коралловых полипов богаты липидами [6]. Большую часть липидов кораллов составляют нейтральные липиды [7], к которым относятся триацилглицериды (ТГ), моноалкилдиацилглицериды (МАДАГ), воски (ЭВ, сложные эфиры алифатических спиртов и ЖК), стеринны (СТ), а также эфиры стериннов [8]. Встречаются также гликолипиды (ГЛ), фосфолипиды (ФЛ) и углеводороды. В коралловых полипах ТГ, МАДАГ и ЭВ служат основным резервом энергии, а ФЛ и СТ выполняют структурную функцию и составляют основу клеточных мембран. Измерение уровня общих липидов, содержания основных классов липидов и их молекулярных видов — один из основных методических подходов в изучении эффективности репродуктивной стратегии кораллов, степени повреждения и скорости восстановления частично обесцвеченных рифов, пищевых и симбиотических отношений кораллов, а также транспорта органического углерода между организмом-хозяином и симбионтами [9, 10].

Целью данной работы — изучение профиля молекулярных видов основных классов запасных липидов ТГ и МАДАГ мягкого коралла (октокоралла) *S. heterospiculata* (тип Cnidaria, класс Anthozoa, подкласс Octocorallia, отряд Alcyoniina, семейство Alcyoniidae), а также изучение закономерностей изменения содержания ТГ и МАДАГ в процессе восстановления частично обесцвеченного коралла *S. heterospiculata* после перенесенного теплового стресса. В данной работе использована сверхкритическая флюидная хроматография с различным детектированием (масс-спектрометрическое, светорассеивающее детектирование).

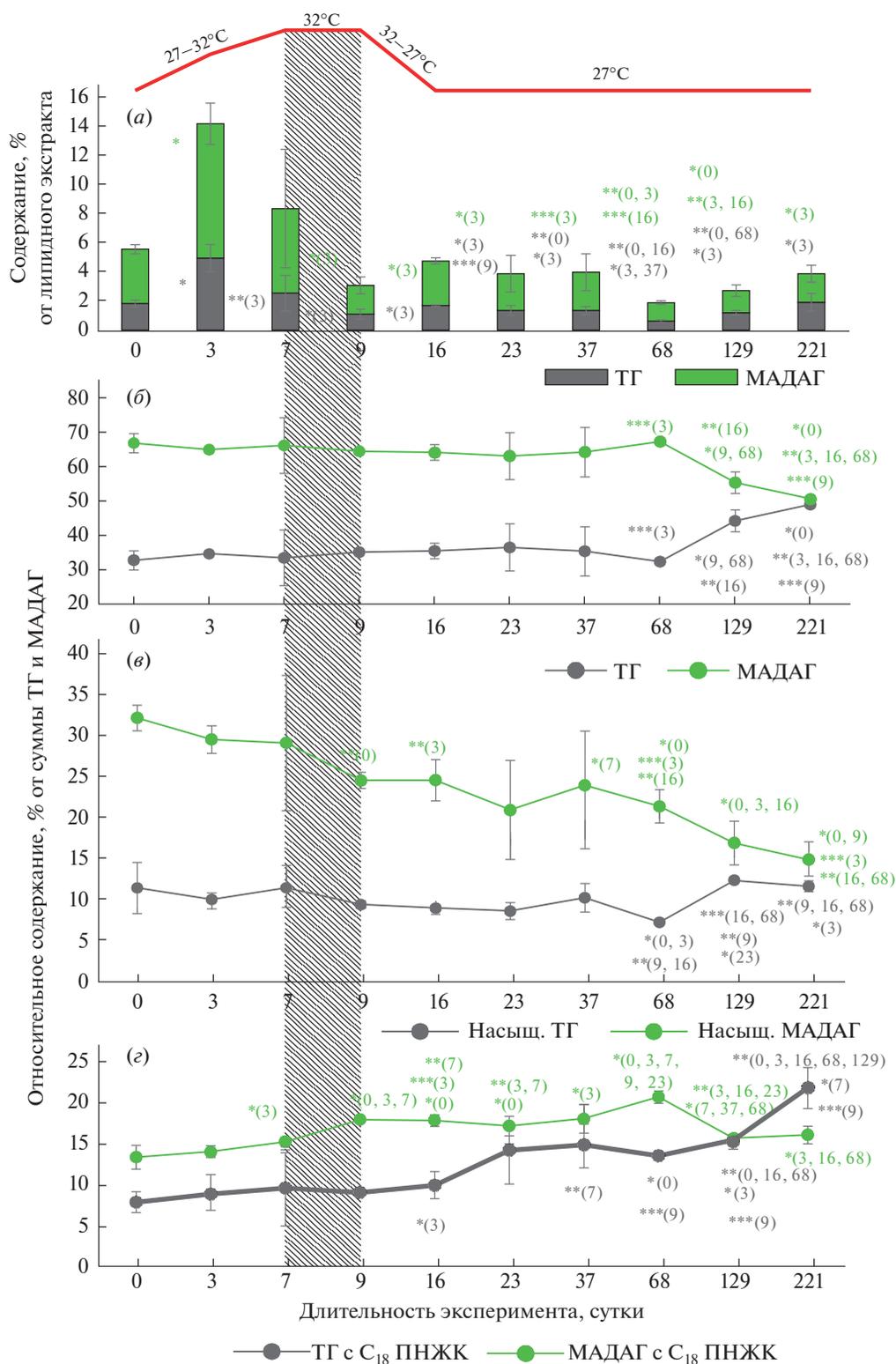
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нейтральные липиды (ТГ, МАДАГ и воски) — запасные соединения, которые кораллы накапливают и, таким образом, запасают энергию. Известно, что в процессе обесцвечивания и последующего длительного восстановления рифообразующие и мягкие кораллы восполняют дополнительную потребность в энергии за счет использования запасных классов липидов, но динамика содержания классов липидов и их молекулярных видов при обесцвечивании все еще не ясна [11].

Мягкий коралл *S. heterospiculata* был подвержен тепловому стрессу (32°C) и обесцвечен, а затем полностью восстановлен за период 205 суток. Изучение динамики суммарного содержания запасных липидов в экстракте показало, что общее содержание и ТГ и МАДАГ резко возросло сразу же после повышения температуры на 3-и сутки эксперимента (0-е сутки: ТГ =  $1.83 \pm 0.24\%$  и МАДАГ =  $3.74 \pm 0.32\%$ ; 3-и сутки: ТГ =  $4.96 \pm 0.94\%$  и МАДАГ =  $9.27 \pm 1.42\%$  от липид-

ного экстракта,  $p < 0.05$ ) (рис. 1а). При этом относительное содержание ТГ и МАДАГ в данной точке достоверно не менялось ( $p \geq 0.05$ ) (рис. 1б). После двухдневного теплового стресса (9-е сутки эксперимента) уровень ТГ и МАДАГ в липидном экстракте достоверно снижался до первоначального значения (ТГ =  $1.09 \pm 0.35\%$  и МАДАГ =  $1.99 \pm 0.59\%$  от липидного экстракта) (рис. 1а). Ранее было показано резкое снижение содержания ТГ в липидах рифообразующих кораллов, собранных около острова Сесоко (Окинава, Япония) [12], и снижение содержания ТГ и МАДАГ в липидном экстракте мягкого коралла *Sinularia* sp. [13] после теплового стресса. Относительное содержание ТГ и МАДАГ на 9-е сутки эксперимента по-прежнему оставалось неизменным ( $p \geq 0.05$ ), но профиль молекулярных видов начал меняться (рис. 1в, 1г).

Основными ТГ и МАДАГ были 16:0/16:0/16:0, 18:0/16:0/16:0, 16:0алк/16:0/16:0 и 18:0алк/16:0/16:0 ( $7.50 \pm 1.61\%$ ,  $3.13 \pm 0.18\%$ ,  $8.39 \pm 1.47\%$  и  $23.14 \pm 2.55\%$  от суммы ТГ и МАДАГ), также липидный экстракт *S. heterospiculata* содержал ТГ и МАДАГ с полиненасыщенными ЖК (ПНЖК) 16:2/16:0/16:0, 18:3/18:4/18:3, 16:0алк/18:2/18:0 + 18:0алк/18:2/16:0 и 18:0алк/16:2/16:0 ( $8.88 \pm 0.02$ ,  $4.25 \pm 1.04$ ,  $3.85 \pm 1.19$  и  $9.61 \pm 1.11\%$  от суммы ТГ и МАДАГ). Для изучения динамики изменения профиля молекулярных видов ТГ и МАДАГ насыщенные молекулярные виды, а также ТГ и МАДАГ с C<sub>18</sub> ПНЖК (маркерные ЖК симбионтов коралла [14–17]) были просуммированы (% от суммы ТГ и МАДАГ). Изменения профиля молекулярных видов запасных липидов исследуемого коралла начинали происходить только на 7-е сутки эксперимента. Первые изменения наблюдались в профиле МАДАГ. На 9-е сутки эксперимента снижалось содержание насыщенных молекулярных видов МАДАГ (0-е сутки:  $32.11 \pm 1.56\%$ ; 9-е сутки:  $24.51 \pm 0.98\%$  от суммы ТГ и МАДАГ,  $p < 0.05$ ), на этом фоне возрастало относительное содержание МАДАГ с C<sub>18</sub> ПНЖК (0-е сутки:  $13.27 \pm 1.44\%$ ; 9-е сутки  $17.82 \pm 0.13\%$  от суммы ТГ и МАДАГ,  $p < 0.05$ ). Профиль ТГ начинал достоверно меняться только на 16-е сутки эксперимента (рис. 1в, 1г). Известно, что МАДАГ — маркерный класс липидов организма-хозяина коралла, тогда как основным источником ТГ выступают симбионты [16]. Ранее было показано, что популяция симбиотических динофлагеллят в октокоралле *S. heterospiculata* после двухдневного теплового стресса сокращалась в 3 раза от первоначального значения [18]. Таким образом, при утрате симбионтов как основного источника питательных веществ насыщенные молекулярные виды МАДАГ, синтезируемые самим организмом-хозяином, играют важ-



**Рис. 1.** Динамика изменения профиля запасных липидов при восстановлении октокоралла *S. heterospiculata* после перенесенного теплового стресса (32°C). (а) – Общее содержание триацилглицеролов (ТГ) и моноацилдиацилглицеролов (МАДАГ) в липидном экстракте; (б) – относительное содержание ТГ и МАДАГ; (в) – относительное содержание насыщенных ТГ и МАДАГ; (г) – относительное содержание ТГ и МАДАГ с C<sub>18</sub> полиненасыщенными жирными кислотами. Дизайн эксперимента: 0–7-е сутки – повышение температуры (27–32°C), 7–9-е сутки – период обесцвечивания (заштрихованная область) при температуре 32°C, 9–16-е сутки – снижение температуры (32–27°C); 16–221-е сутки – период восстановления (27°C). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  и \*\*\*  $p < 0.001$  (парный  $t$ -тест); \*(сутки) – в скобках указаны достоверно отличающиеся временные точки.

ную роль в энергетическом балансе частично обесцвеченного организма *S. heterospiculata*.

После перенесенного стресса октокоралл *S. heterospiculata* может менять энергетическую стратегию, поэтому мы наблюдали перестройку качественного состава запасных липидов в период восстановления. К концу эксперимента на 221-е сутки относительное содержание МАДАГ снижалось (0-е сутки:  $67.17 \pm 2.80\%$ ; 221-е сутки:  $50.81 \pm 0.73\%$ ,  $p < 0.05$ ), а ТГ – возрастало (0-е сутки:  $32.83 \pm 2.80\%$ ; 221-е сутки:  $49.19 \pm 0.73\%$  от суммы ТГ и МАДАГ,  $p < 0.05$ ). Содержание насыщенных ТГ немного возрастало от первоначального значения (221-е сутки:  $11.63 \pm 0.66\%$  от сумм ТГ и МАДАГ,  $p < 0.05$ ), существенно возрастало содержание ТГ с C<sub>18</sub> ПНЖК (0-е сутки:  $7.08 \pm 1.28\%$ ; 221-е сутки:  $21.69 \pm 2.49\%$  от суммы ТГ и МАДАГ,  $p < 0.05$ ) и снижалось содержание насыщенных молекулярных видов МАДАГ (221-е сутки:  $14.86 \pm 1.97\%$  от суммы ТГ и МАДАГ,  $p < 0.05$ ) (рис. 1в, 1з). Ранее уже было показано, что после повторного обесцвечивания меняется динамика энергетического запаса и кальцификация рифообразующих кораллов *Orbicella faveolata*, *Porites divaricata* и *P. astreoides*. После первого обесцвечивания через 6 месяцев восстановления энергетический запас *O. faveolata* увеличивался, а после повторного обесцвечивания при восстановлении достоверно не менялся [19]. Вероятно, качественная перестройка запасных липидов – один из адаптационных механизмов в организме *S. heterospiculata* после перенесенного стресса.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Дизайн эксперимента.** Колонии коралла *S. heterospiculata* ( $n = 40$ ) были вегетативно выращены в резервуаре объемом 500 л с аэрированной морской водой, подключенной к общей системе сквозной циркуляции морской воды (залив Петра Великого, Японское море). Колонии кораллов выращивали до 10 см в течение 1 года при 27°C. Колонии освещали белыми люминесцентными лампами (National, FL20SS-N/18). Фотопериод составлял 9 ч света, 15 ч темноты. Для выбора временных промежутков эксперимента по обесцвечиванию *S. heterospiculata* был проведен предварительный эксперимент. Экспериментальное обесцвечивание и дальнейшее восстановление *S. heterospiculata* длилось 221 сутки. С использованием автоматического термостата Platinum Heater (Aquael, Польша;  $\pm 0.4^\circ\text{C}$ ) температура воды была повышена с 27 до 32°C с 0-х по 7-е сутки эксперимента. Затем, с 7-х по 9-е сутки (двухдневный период обесцвечивания), температуру поддерживали на постоянном уровне (32°C). С 9-х по 16-е сутки (7 суток) температура воды была снижена с 32 до 27°C. В течение

следующих 205 суток (с 16-х по 221-е сутки эксперимента) колонии коралла подвергали воздействию температуры 27°C для восстановления (рис. 1а). В десяти экспериментальных временных точках были отобраны по четыре колонии *S. heterospiculata* для экстракции липидов. Липиды выделяли из каждой колонии.

**Липидомный анализ.** Общие липидные экстракты были получены в соответствии с методикой Фолча [20] с некоторыми модификациями. Образец (~2 г) свежих тканей колоний коралла гомогенизировали в 4 мл смеси хлороформ/метанол (2 : 1, v/v) диспергатором (IKA T25 digital Ultra-Turrax, Германия), фильтровали. Остатки промывали 2 мл смеси хлороформ/метанол (2 : 1, v/v), а затем 6 мл хлороформа. В экстракт добавляли дистиллированную воду (15 мл) и оставляли на ночь для разделения фаз при 4°C. Нижний слой отбирали, упаривали и перерастворяли в хлороформе до конечной концентрации 10 мг/мл. Экстракты хранили в среде аргона при –40°C.

К липидному экстракту добавляли внутренний стандарт ТГ 18:1/18:1/18:1 (Avanti Polar Lipids, США). Молекулярные виды ТГ разделяли методом сверхкритической флюидной хроматографии на оборудовании Nexera UC (Shimadzu, Япония) на двух последовательно соединенных колонках Shim-Pack XR-ODSII (2.0 × 150 мм; Shimadzu, Япония) при постоянной скорости элюирования (0.6 мл/мин) сверхкритическим CO<sub>2</sub> с добавлением 35% метанола; максимальное давление в колонке составляло 50 МПа, температура колонки 17°C. Для оценки содержания молекулярных видов ТГ использовали светорассеивающий детектор ELSD LT II (Shimadzu, Япония; температура испарительной трубки 40°C, давление распыляемого газа (N<sub>2</sub>) 0.4 МПа). Для идентификации молекулярных видов ТГ использовали масс-спектрометр с тройным квадрупольным масс-анализатором LCMS-8060 (Shimadzu, Япония); HCOOH (0.1% в MeOH) добавляли к элюенту, вытекающему из хроматографической колонки, с помощью микромиксера с прокачкой через постколону (0.2 мл/мин). Анализ проводили с помощью химической ионизации при атмосферном давлении (APCI) в режиме положительных ионов. Спектры регистрировали при  $m/z$  300–1200. Масс-спектры интерпретировали в соответствии со схемами фрагментации, опубликованными ранее [21, 22].

**Статистический анализ.** Значения приведены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение. После проверки на нормальность (тест Шапиро–Уилка) достоверные различия между выборками исследовали с помощью множественного однофакторного ANOVA с последующим парным  $t$ -тестом. Статистическую вероятность  $p < 0.05$  считали

значимой. Все статистические анализы проводили с использованием статистического программного обеспечения R (<https://www.r-project.org/>).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые была изучена динамика изменений профиля молекулярных видов запасных классов липидов (ТГ и МАДАГ) при восстановлении октокоралла *S. heterospiculata* после перенесенного теплового стресса (32°C). Показана повышенная потребность в энергии подверженного стрессу коралла *S. heterospiculata*. Насыщенные молекулярные виды МАДАГ, синтезируемые организмом-хозяином октокоралла, расходуются в первую очередь при стрессе. В период восстановления происходит качественная перестройка запасных классов липидов.

Данная работа показала, что липидомный анализ позволяет получить более детальную информацию о состоянии организма коралла в процессе обесцвечивания и восстановления. Полученные данные вносят важный вклад в изучение проблематики обесцвечивания и восстановления коралловых рифов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Spalding M.D., Grenfell A.M.* // *Coral Reefs*. 1997. V. 16. P. 225–230. <https://doi.org/10.1007/s003380050078>
2. *Fabricius K., Alderslade P.* // *Soft Corals and Sea Fans: a Comprehensive Guide to the Tropical Shallow Water Genera of the Central-West Pacific, the Indian Ocean and the Red Sea*. Townsville, Australia: Australian Institute of Marine Science, 2001. P. 77–103.
3. *Rowley S.J., Robert T.E., Coleman R.R., Spalding H.L., Joseph E., Dorricott M.K.L.* // Pohnpei, Federated States of Micronesia. In: *Mesophotic Coral Ecosystems* / Eds. Loya Y., Puglise K.A., Bridge T.C.L. Springer International Publishing, Cham, 2019. V. 12. P. 301–320. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-92735-0\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-319-92735-0_17)
4. *McLachlan R.H., Price J.T., Solomon S.L., Grottoli A.G.* // *Coral Reefs*. 2020. V. 39. P. 885–902. <https://doi.org/10.1007/s00338-020-01931-9>
5. *Oliver T.A., Palumbi S.R.* // *Coral Reefs*. 2011. V. 30. P. 429–440. <https://doi.org/10.1007/s00338-011-0721-y>
6. *Yamashiro H., Oku H., Higa H., Chinen I., Sakai K.* // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 1999. V. 122. P. 397–407. <https://doi.org/10.1016/S0305-0491%2899%2900014-0>
7. *Imbs A.B., Dang L.P.T., Nguyen K.B.* // *PLoS One*. 2019. V. 14. e0215759. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215759>
8. *Hamoutene D., Puestow T., Miller-Banoub J., Wareham V.* // *Coral Reefs*. 2008. V. 27. P. 237–246. <https://doi.org/10.1007/s00338-007-0318-7>
9. *Imbs A.B., Ermolenko E.V., Grigorchuk V.P., Dang L.T.P.* // *Coral Reefs*. 2021. V. 40. P. 719–734. <https://doi.org/10.1007/s00338-021-02073-2>
10. *Sikorskaya T.V., Ermolenko E.V., Efimova K.V.* // *Coral Reefs*. 2022. V. 41. P. 277–291. <https://doi.org/10.1007/s00338-022-02222-1>
11. *Imbs A.B.* // *Russ. J. Mar. Biol.* 2013. V. 39. P. 153–168. <https://doi.org/10.1134/s1063074013030061>
12. *Yamashiro H., Oku H., Onaga K.* // *Fisheries Science*. 2005. V. 71. P. 448–453. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2005.00983.x>
13. *Sikorskaya T.V., Ermolenko E.V., Imb, A.B.* // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2020. V. 524. 151295. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2019.151295>
14. *Imbs A.B.* // *Biochem. Syst. Ecol.* 2014. V. 54. P. 213–218. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2014.01.016>
15. *Imbs A.B., Latyshev N.A., Dautova T.N., Latypov Y.Y.* // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2010. V. 409. P. 65–75. <https://doi.org/10.3354/meps08622>
16. *Imbs A.B., Yakovleva I.M., Pham L.Q.* // *Fisheries Science*. 2010. V. 76. P. 375–380. <https://doi.org/10.1007/s12562-009-0213-y>
17. *Joseph J.D.* // *Prog. Lipid Res.* 1979. V. 18. P. 1–30. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(79\)90002-X](https://doi.org/10.1016/0163-7827(79)90002-X)
18. *Sikorskaya T.V., Ermolenko E.V., Boroda A.V., Ginanova T.T.* // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2021. V. 255. P. 110609. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2021.110609>
19. *Grottoli A.G., Warner M.E., Levas S.J., Aschaffenburg M.D., Schoepf V., McGinley M., Baumann J., Matsui Y.* // *Global Change Biology*. 2014. V. 20. P. 3823–3833. <https://doi.org/10.1111/gcb.12658>
20. *Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.A.* // *J. Biol. Chem.* 1957. V. 226. P. 497–509. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)
21. *Byrdwell W.C.* // *Lipids*. 2005. V. 40. P. 383–417. <https://doi.org/10.1007/s11745-006-1398-9>
22. *Sikorskaya T.V., Efimova K.V., Imbs A.B.* // *Phytochemistry*. 2021. V. 181. 112579. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112579>

## Dynamics of Storage Lipids during the Recovery of Partially Bleached Coral *Sinularia heterospiculata*

T. V. Sikorskaya<sup>\*, #</sup>, D. D. Solodiy<sup>\*, \*\*</sup>, and E. V. Maskin<sup>\*, \*\*</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (423) 231-09-05; e-mail: miss.tatyanna@yandex.ru

<sup>\*</sup>Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, ul. Palchevskogo 17, Vladivostok, 690041 Russia

<sup>\*\*</sup>Far Eastern Federal University, Department of Biochemistry and Biotechnology, Ajaks 10, Vladivostok, 690922 Russia

Global warming is causing the loss of coral symbionts and their bleaching. Researches of coral recovery are very important for the conservation of coral reefs. The lipidomic approach can provide detailed information about the processes that take place in the coral during bleaching and recovery. Using supercritical fluid chromatography in combination with mass-spectrometry, the dynamics of the main classes of storage lipids triacylglycerols (TG) and monoalkyldiacylglycerols (MADAG) during the recovery of the octocoral *Sinularia heterospiculata* after heat stress (32°C). It was shown that MADAG plays an important role in the energy balance of *S. heterospiculata* after heat stress. Under stress, the coral *S. heterospiculata* primarily consumed saturated MADAG molecular species. Changes in the profile of TG molecular species occurred only on the 16th day of the experiment. Probable, the stressed octocoral *S. heterospiculata* changes its energy strategy during recovery; therefore, the qualitative composition of reserve lipids is rearranged during the recovery period.

*Keywords: coral bleaching, octocorals, lipidomics, chromatography-mass-spectrometry, storage lipids*



## НОВЫЙ КОМПЛЕКС РИБОЗИМА С ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТИЗОМЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ И ФЕРМЕНТА ГЕКСОКИНАЗЫ В ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖАХ *Saccharomyces cerevisiae*

© 2023 г. О. Н. Соловьева\*, #

\*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,  
Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1с40

Поступила в редакцию 14.11.2022 г.

После доработки 19.11.2022 г.

Принята к публикации 20.11.2022 г.

Показано существование неизвестного ранее рибозима с каталитической активностью глюкозо-6-фосфатизомеразы. Рибозим катализирует взаимопревращение глюкозо-6-фосфата и фруктозо-6-фосфата. Рибозим обнаружен в пекарских дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* и выделен в комплексе с ферментом гексокиназой. Комплекс легко выделялся на иммуноаффинной колонке с антителами к гексокиназе. Рибозим состоит из 41–42 нуклеотидов и имеет молекулярную массу 14.15–14.5 кДа.  $K_m$  и  $V_{max}$  составляют, соответственно,  $0.14 \pm 0.02$  мМ и  $14.0 \pm 1.3$  ед./мг для глюкозо-6-фосфата и  $0.20 \pm 0.03$  мМ и  $15.4 \pm 1.4$  ед./мг для фруктозо-6-фосфата. Эти кинетические характеристики примерно одинаковы для рибозима в составе комплекса и для свободного рибозима. Гексокиназа в составе комплекса сохраняет свою каталитическую активность.

*Ключевые слова:* рибозимы, каталитическая РНК, рибонуклеопротеин, глюкозофосфатизомераза, *Saccharomyces cerevisiae*

DOI: 10.31857/S013234232305007X, EDN: BYLHBD

### ВВЕДЕНИЕ

Впервые сообщения о рибозимах были опубликованы в 1981–1983 г. [1–3]. Рибозимы катализируют различные реакции, но в основном ограничиваются реакциями переноса фосфорилла [4]. Рибозимы в основном участвуют в синтезе и расщеплении РНК [5–9] и белков [10]. Рибосомы функционируют как рибозимы [11–13]. РНКазы Р работает в белковом комплексе с рибозимом [14, 15]. Рибозим Glms участвует в биосинтезе аминокислот [16–18]. Существуют рибозимы, катализирующие реакции переноса аминокислот [19]. Эксперименты по селекции *in vitro* выявили рибозимы с активностью пероксидазы [20], синтазы мочевины [21], пируватдекарбоксилазы [22], алкогольдегидрогеназы [23, 24] и альдолазы [25, 26].

В то же время известно множество комплексов РНК с белками [27–29]. Вполне вероятно, что некоторые РНК могут быть рибозимами. В послед-

ние годы для выделения РНК-связывающих белков широко используются методы экстракции либо на иммобилизованных РНК-зондах для захвата белков, либо на иммобилизованных белках для захвата РНК [30, 31]. В 2020 г. мною показано существование природного рибозима с триозофосфатизомеразной активностью [32]. Рибозим был нековалентно связан с транскетолазой пекарских дрожжей и выделен на иммуноаффинной колонке с антителами к транскетолазе. Этот рибозим не только проявляет каталитическую активность, но и препятствует проявлению каталитической активности транскетолазы, переключая таким образом катализ с цикла Кребса на гликолиз и выполняя, соответственно, две функции – работу гликолитического фермента и блокирование фермента пентозофосфатного пути. После отделения рибозима от белка активность рибозима сохраняется, а активность транскетолазы восстанавливается. Интересно, что формирование комплекса носит сезонный характер. Наибольшее количество комплекса выделялось из декабрьских дрожжей.

В настоящей работе проведено исследование рибозима, связанного с гексокиназой (ГК) пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. ГК – один

Сокращения: АцN – ацетонитрил; ГК – гексокиназа (АТФ:Д-гексоза-6-фосфотрансфераза, КФ 2.7.1.1); Г6Ф – глюкозо-6-фосфат; Г6ФИ – глюкозо-6-фосфатизомераза; ГФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; Ф6Ф – фруктозо-6-фосфат.

# Автор для связи: (тел.: +7 (495) 939-14-56; эл. почта: soloveva\_o@list.ru).

из ~300 белков-совместителей [33–35]. Тот факт, что ГК может связываться с РНК, был показан ранее [36].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Комплекс ГК–РНК (вместе с возможной свободной ГК) выделяли из пекарских дрожжей *S. cerevisiae* на иммобилизованных антителах к ГК (Sigma, США). Соответственно, с антителами могла связываться только ГК. Возможные адсорбированные белки удаляли путем тщательной промывки колонки до тех пор, пока спектр поглощения не стал равным нулю. Для получения комплекса ГК–РНК без свободной ГК продукт пропускали через анионообменную колонку IRA-400. Комплекс ГК–РНК элюировали 10 мМ калий-фосфатным буфером, pH 7.6. Свободная ГК оставалась связанной с ионообменником даже при пропускании 500 мМ буфера через колонку (рис. 1). РНК отделяли от комплекса ГК–РНК с помощью ацетонитрила (АцN). Следовательно, РНК связана с ГК нековалентно. Наибольшее количество комплекса выделялось из декабрьских дрожжей. В летних дрожжах комплекс практически отсутствовал.

На рис. 2 представлены спектры поглощения комплекса ГК–РНК после элюции с колонки IRA-400 (кривая 1); РНК, полученной из комплекса ГК–РНК осаждением белка с использованием АцN (кривая 2); их дифференциальный спектр, представляющий собой свободную ГК (кривая 3). Спектр РНК после ее осаждения АцN был таким же, как и после удаления ГК кипячением (данные не приведены). Концентрацию белка в комплексе ГК–РНК определяли по методу Брэдфорд [37]. После осаждения этанолом белок в составе РНК не обнаружен.

После отделения РНК от комплекса ГК–РНК с помощью АцN соотношение поглощения при длинах волн 260/280 нм и 260/230 нм увеличилось, а после осаждения полученной РНК этанолом оба соотношения приблизились к значению 2.0, что соответствует чистой РНК (табл. 1) [38].

По поглощению при 260 нм концентрация нуклеотидов в РНК после АцN составила 17.08 мкг/мл, что соответствует 49.5 мкМ (см. подраздел “Концентрация свободных ГК и ГК в комплексе с РНК” в “Эксперим. части”). По измерению концентрации рибозо-5-фосфата с орцином концентрация нуклеотидов составила  $50 \pm 2$  мкМ. При этом концентрация ГК была равна 0.13 мг/мл или 1.204 мкМ (молекулярная масса ГК 108 кДа [39]). Соответственно, с одной молекулой ГК связан 41 нуклеотид, и расчетная молекулярная масса РНК составляет ~14.15 кДа (в случае равного количества пуриновых и пиримидиновых оснований). При условии, что одна молекула РНК свя-

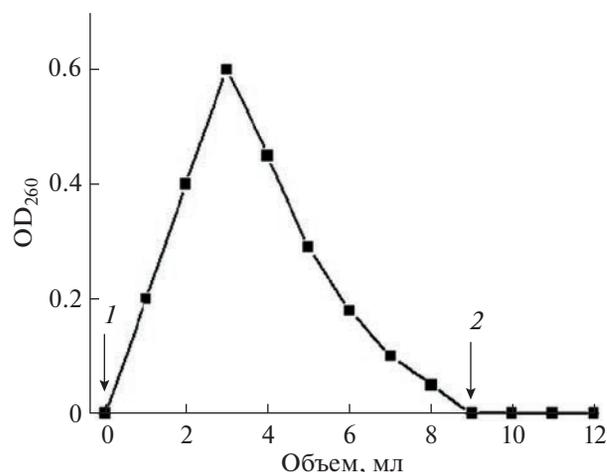


Рис. 1. Элюирование комплекса ГК–РНК на колонке IRA-400. На колонку наносили 2 мл ГК (смесь свободного фермента и его комплекса с РНК); 1 – через колонку пропускали 10 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7.6), 2 – через колонку пропускали 500 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7.6).

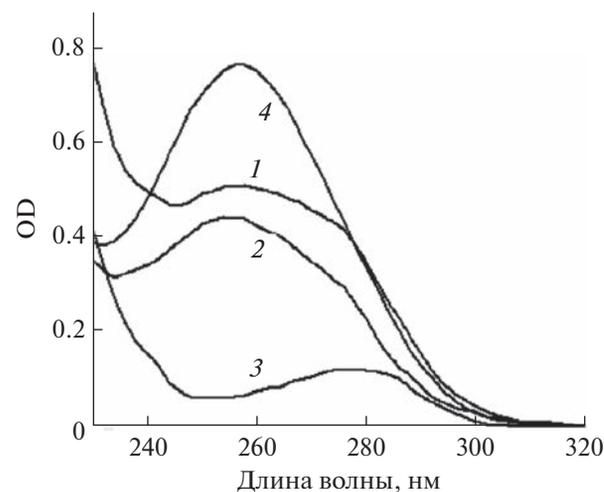


Рис. 2. Спектры поглощения: 1 – комплекс ГК–РНК после элюции на колонке IRA-400, 2 – РНК после осаждения белка с использованием АцN, 3 – ГК из комплекса ГК–РНК (спектр получен вычитанием 1 – 2), 4 – РНК после осаждения этанолом (разведено до исходного объема). Спектры регистрировали в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7.6.

зывается с одной молекулой димерной ГК, молекулярная масса РНК составит 14.15 кДа, что согласуется с определением ее молекулярной массы на сефадексе G-100 в 6 М мочеvine (14.5 кДа, что соответствует 42 нуклеотидам, рис. 3). До сих пор неясно, сколько молекул РНК может быть связано с димерной молекулой ГК – одна или две.

РНК в комплексе с ГК и в свободной форме катализирует взаимопревращение глюкозо-6-фосфа-

**Таблица 1.** Поглощение комплекса ГК–РНК, РНК и ГК (данные из рис. 2)

| № | Фермент/рибозим   | Длина волны, нм |       |       |       |         |         |         | Концентрация, мг/мл белка |
|---|-------------------|-----------------|-------|-------|-------|---------|---------|---------|---------------------------|
|   |                   | 230             | 260   | 280   | 290   | 260/280 | 260/230 | 260/290 |                           |
| 1 | Комплекс ГК–РНК   | 0.771           | 0.504 | 0.355 | 0.159 | 1.42    | 0.65    | 3.1     | 0.132*                    |
| 2 | РНК после АцN     | 0.354           | 0.427 | 0.232 | 0.089 | 1.84    | 1.21    | 4.8     | 0*                        |
| 3 | ГК                | 0.417           | 0.077 | 0.123 | 0.070 | 0.63    | 0.19    | 1.1     | 0.130**                   |
| 4 | РНК после этанола | 0.388           | 0.752 | 0.341 | 0.134 | 2.20    | 1.94    | 5.6     | 0*                        |

Примечание: концентрацию белка определяли \* по Брэдфорд [37] и \*\* спектрофотометрически, используя  $A_{1\text{см}}^{1\%}$  9.47 при 280 нм [46]. Все концентрации даны в соответствии с исходной концентрацией комплекса ГК–РНК.

**Таблица 2.** Кинетические характеристики для РНК по сравнению с Г6ФИ

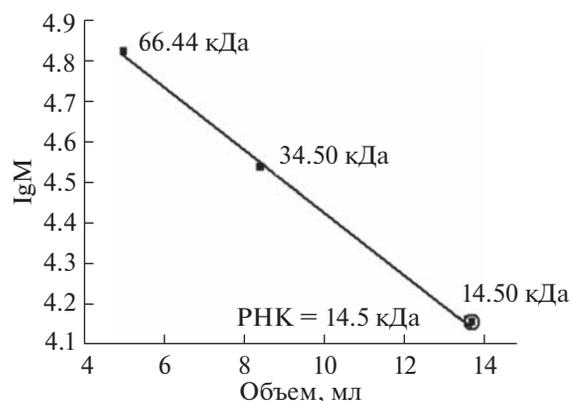
| Субстрат | № | Фермент/рибозим                 | $K_m$ , mM                       | $V_{\text{max}}$ , ед./мг* |
|----------|---|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| Г6Ф      | 1 | ГК–РНК                          | $0.128 \pm 0.002$                | $14.02 \pm 0.09$           |
|          | 2 | РНК                             | $0.132 \pm 0.002$                | $13.60 \pm 0.09$           |
|          | 3 | Г6ФИ (фермент) из дрожжей       | 0.3 [47]<br>$0.87 \pm 0.22$ [48] | –                          |
| Ф6Ф      | 4 | ГК–РНК                          | $0.200 \pm 0.005$                | $15.4 \pm 0.3$             |
|          | 5 | РНК                             | $0.198 \pm 0.005$                | $14.9 \pm 0.3$             |
|          | 6 | Г6ФИ (фермент) из дрожжей       | 0.15 [47]                        | –                          |
| Фруктоза | 7 | ГК–РНК                          | $6.03 \pm 0.10$                  | $11.03 \pm 0.06$           |
|          | 8 | ГК (фермент) из дрожжей (Sigma) | $0.104 \pm 0.002$                | $0.790 \pm 0.005$          |

\*  $V_{\text{max}}$  приведена в ед./мг на мг РНК для комплекса и рибозима и на мг белка для фермента.

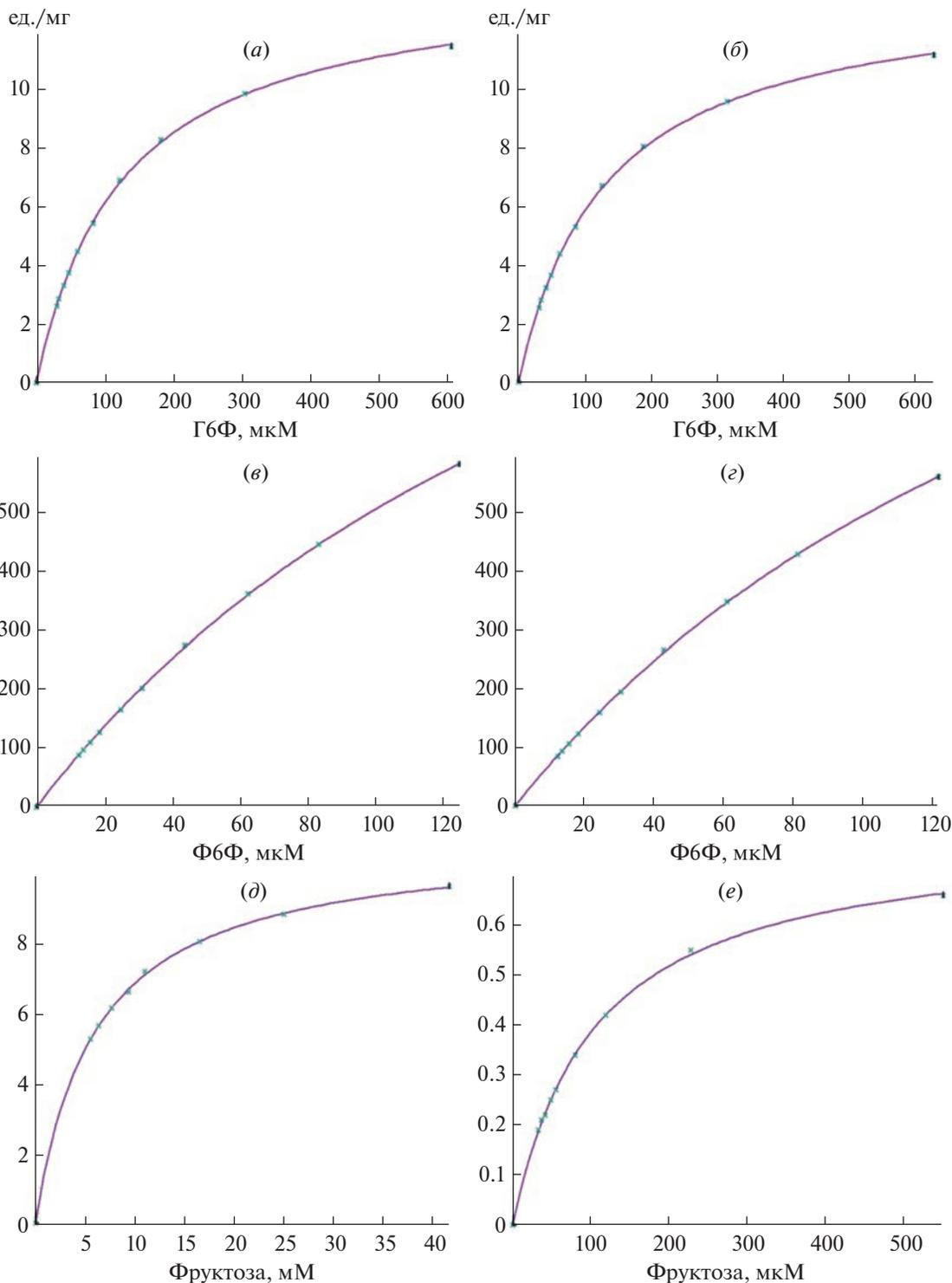
та (Г6Ф) в фруктозо-6-фосфат (Ф6Ф). Определены кинетические характеристики рибозима с Ф6Ф и Г6Ф (табл. 2). На рис. 4 показан фитинг по уравнению Михаэлиса для всех измеренных кривых (представлены результаты одного из однотипных опытов).  $K_m$  и  $V_{\text{max}}$  практически одинаковы для свободного рибозима и для рибозима в комплексе с ГК. При использовании фруктозы происходит цепочка реакций: ГК превращает фруктозу в Ф6Ф, затем Ф6Ф используется для катализа рибозимом.  $V_{\text{max}}$  для комплекса ГК–РНК различается незначительно при использовании рибозима непосредственно с его нативным субстратом (Ф6Ф, табл. 2, № 4 и 5) и такого же субстрата, продуцируемого ГК в комплексе с РНК (табл. 2, № 7). Это означает, что фермент и рибозим работают в тандеме. 30-Кратное увеличение  $K_m$  для фруктозы по сравнению с Ф6Ф при катализе комплекса ГК–РНК (табл. 2, № 4 и 7) может означать, что не все молекулы Ф6Ф, образующиеся в ходе реакции ГК, используются рибозимом, это подтверждает данные определения молекулярной массы рибозима (только один из двух активных центров ГК имеет связанную РНК). Второй активный центр может иметь более низкое сродство к рибозиму или вообще не связываться с ним. В таком случае Ф6Ф, образующийся во втором, свободном от рибозима, активном центре ГК, бу-

дет выделяться в среду, что снижает реальную концентрацию Ф6Ф для рибозима.

Схема гликолиза с тандемной реакцией ГК и глюкозо-6-фосфатизомеразы (Г6ФИ)-рибозима при использовании глюкозы представлена на рис. 5. Красными кружками на схеме обведены ферменты, функцию которых могут осуществлять рибозимы – охарактеризованный в настоя-



**Рис. 3.** Определение молекулярной массы РНК на колонке с сефадексом G-100 в присутствии 6 М мочевины. Маркеры молекулярной массы: альбумин человека (66.44 кДа), пепсин (34.5 кДа) и лизоцим (14.5 кДа).



**Рис. 4.** Фитинг экспериментальных кривых по уравнению Михаэлиса для реакций, представленных в табл. 2: Г6Ф с комплексом ГК–РНК (а), Г6Ф с РНК (б), Ф6Ф с комплексом ГК–РНК (в), Ф6Ф с РНК (г), фруктоза с комплексом ГК–РНК (д), фруктоза с ГК (е).

шей работе рибозим Г6ФИ и обнаруженный ранее рибозим триозофосфатизомераза [32].

Рибозим триозофосфатизомераза не только проявлял каталитическую активность, но и вы-

ключал работу транскетолазы – ключевого фермента пентозофосфатного пути. При этом оба рибозима замещают ферменты гликолиза (рис. 5). Эти данные указывают на возможность более ши-

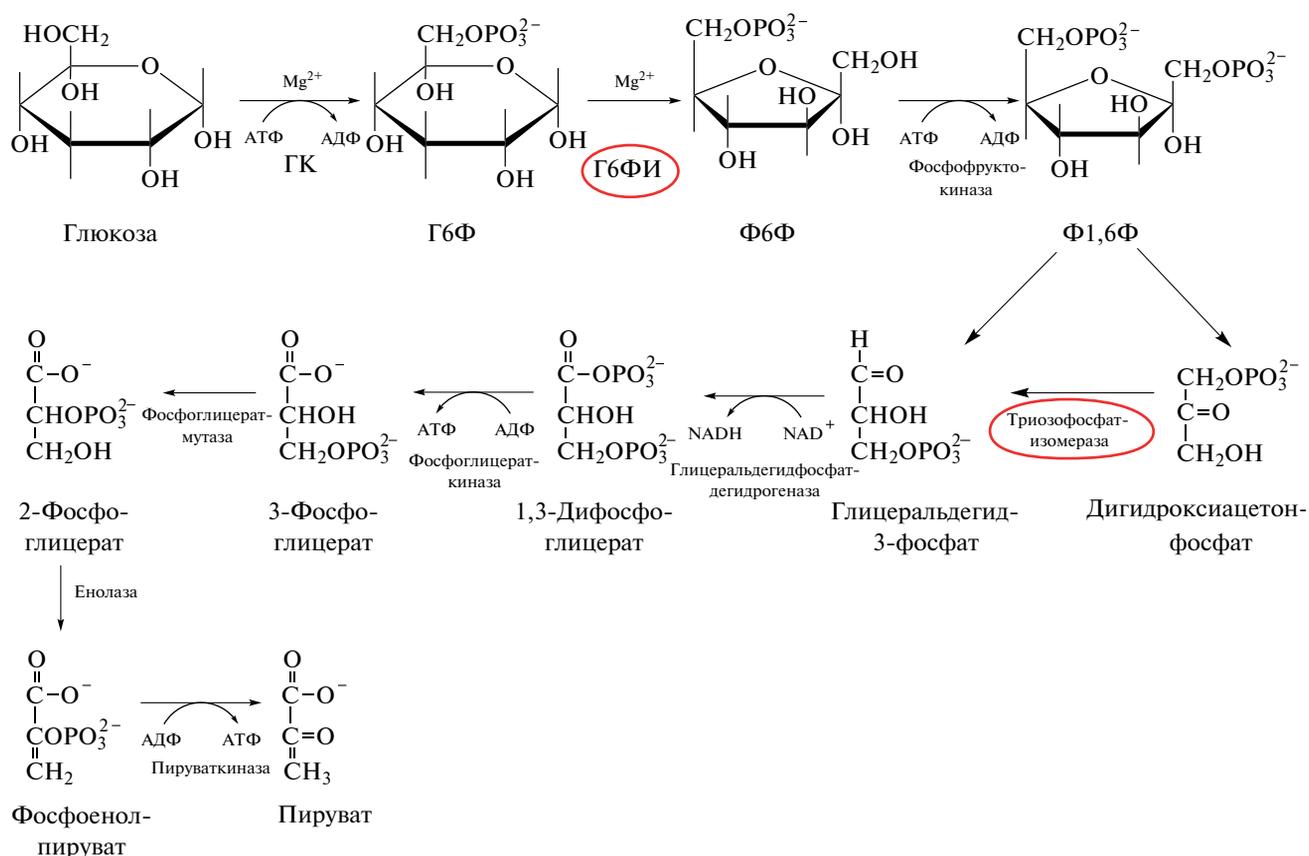


Рис. 5. Схема гликолиза. Рибозимы обведены красным.

рокого участия рибозимов в катализе в настоящее время. Кроме того, известно много рибонуклеопротеидов, в которых функция РНК не изучена. Показано, что с РНК связаны такие гликолитические ферменты, как фосфофруктокиназа [40], глицеральдегидфосфатдегидрогеназа [41, 42] и пируваткиназа [43, 44]. Другие гликолитические ферменты также могут быть рибозимами. Известно, что энолаза ингибируется РНК-лигандами [45]. В настоящее время РНК-связывающая активность показана для многих метаболических ферментов [45].

Оба исследованных нами рибозима в наибольшей степени образуют комплекс со своим ферментом в декабре, тогда как в остальное время количество комплексов составляет не более 1%. Причина этой сезонности переключения катализа на гликолиз в дрожжевых клетках еще предстоит выяснить. Это тем более интересно, что комплекс транскетолаза–рибозим был обнаружен в асците мышей (неопубликованные данные), что может иметь медицинское значение.

Предстоит еще выяснить, где именно РНК связывается с белком, а также определить последовательность нуклеотидов РНК, выяснить причину сезонности образования комплекса фермента с ри-

бозимом и определить, в каких еще организмах и при каких условиях встречается рибозим.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы.** Глицилглицин, NADP, NADH, MgCl<sub>2</sub>, глюкозофосфатдегидрогеназа (ГФДГ), фосфофруктокиназа, АТФ, α-глицерофосфатдегидрогеназа-триозофосфатизомераза, альдолаза из мышц кролика, гексокиназа-2 (ГК-2, КФ 2.7.1.1) из *Saccharomyces cerevisiae*, сефароза 4В, активированная бромцианом, сефадекс G-50, сефадекс G-100, фосфат калия, ацетонитрил (АцN) (Sigma, США); фруктоза, глюкоза, IRA-400, альбумин человека, пепсин и лизоцим (Reanal, Венгрия); *Saccharomyces cerevisiae* (Lesaffre, Франция). Остальные реактивы имели квалификацию о.с.ч.

**Гексокиназу** (смесь комплекса ГК–РНК и свободного фермента) выделяли из пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на колонке с иммобилизованными антителами к ГК. Получение дрожжевого экстракта, иммунизацию кролика дрожжевой ГК-2 (Sigma, США), забор крови, выделение и иммобилизацию антител проводили так же, как описано ранее [49]. После пропускания дрожжевого экстракта через иммуноаффинную колонку

ее тщательно промывали до нулевого поглощения в промывных водах. В процессе элюирования ГК с колонки рН поддерживали на уровне 7.6 добавлением к элюату 4 М HCl. Элюированный белок разделяли на аликвоты и хранили в замороженном виде при  $-20^{\circ}\text{C}$  не более трех месяцев.

ГК, выделенную на иммунноаффинной колонке (смесь свободной ГК и комплекса ГК–РНК), пропускали через колонку с сефадексом G-50 в 10 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7.6. Затем через колонку IRA-400 (2.4 мл), предварительно промытую 100 мл 0.1 М КОН и водой до нейтрального рН, пропускали 2 мл ГК + ГК–РНК и элюировали тем же буфером. Свободный фермент адсорбировался на колонке. Для анализа собирали объединенные фракции по 2 мл.

**Свободную РНК** из комплекса ГК–РНК выделяли с помощью AcN, который добавляли к комплексу ГК–РНК в соотношении 3 : 1, перемешивали и замораживали в течение 1–2 ч при  $-12^{\circ}\text{C}$ . Верхний слой AcN не содержал РНК, поэтому собирали только нижний водный слой после удаления денатурированного белка центрифугированием. Полученную таким образом РНК осаждали 96%-ным этанолом (5 : 1) и растворяли в 10 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7.6. Определение белка по методу Брэдфорд [37] показало отсутствие белка.

**Концентрацию свободных ГК и ГК в комплексе с РНК** определяли по методу Брэдфорд [37], используя свободную ГК для калибровки. Концентрацию свободной ГК также измеряли спектрофотометрически, используя  $A_{1\text{см}}^{1\%}$  9.47 при 280 нм [46]. Количество рибозы в РНК измеряли в реакции с орцином [50]. Количество нуклеотидов в свободной РНК рассчитывали согласно методике Varbas et al. [51], в которой оптическая плотность при 260 нм равна 1.0 для раствора РНК с концентрацией 40 мкг/мл при длине оптического пути 1 см. Молярную концентрацию нуклеотидов рассчитывали, взяв среднюю массу нуклеотидов 345 Да.

**Молекулярную массу РНК** определяли методом гель-хроматографии на колонке Sephadex G-100 в 6 М мочеvine. На колонку  $15 \times 1$  мл наносили 1 мл РНК. В качестве маркеров были взяты альбумин человека (66.44 кДа), пепсин (34.5 кДа) и лизоцим (14.5 кДа). Все соединения перед нанесением на колонку выдерживали в течение 2 ч в мочеvine.

**Каталитическую активность ГК** измеряли с фруктозой спектрофотометрически при 340 нм. Образующийся при этом Ф6Ф определяли по его превращению в реакции с фосфофруктокиназой [52]. Реакционная смесь состояла из 50 мМ глицилглицина, 1 мМ фруктозы, 2 мМ АТФ, 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0.3 мМ NADH, 1 ед./мл фосфофруктокиназы, 1 ед./мл альдолазы и 1 ед./мл триозофосфатизо-

меразы и глицерофосфатдегидрогеназы (рН 7.6), при этом на 1 моль образовавшегося фруктозо-1,6-фосфата окисляется 2 моль NADH.

**Глюкозофосфатизомеразную активность рибозима** измеряли спектрофотометрически при 340 нм двумя способами: 1) после образования Ф6Ф из Г6Ф; реакционная смесь состояла из 2 мМ АТФ, 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0.3 мМ NADH и по 1 ед./мл фосфофруктокиназы, альдолазы, триозофосфатизомеразы и глицерофосфатдегидрогеназы (рН 7.6) [53]; 2) после образования Г6Ф из Ф6Ф с ГФДГ,  $\text{MgCl}_2$ , NADP при тех же условиях, как при измерении активности ГК [52], перед добавлением фермента или рибозима инкубационную смесь выдерживали до исчезновения фоновой активности.  $K_m$  для субстратов измеряли в диапазоне концентраций Ф6Ф и Г6Ф 0.012–0.3 мМ.

Экспериментальные данные анализировали с использованием уравнения Михаэлиса:

$$v = V[S]/([S] + K_m),$$

где  $v$  – скорость реакции,  $V$  – максимальная скорость реакции,  $S$  – концентрация субстрата,  $K_m$  – константа Михаэлиса. Значения  $K_m$  определяли путем фитинга экспериментальной кривой зависимости скорости реакции от концентрации субстрата. Каждая точка на экспериментальной кривой представляет начальную скорость реакции при добавлении одной концентрации субстрата.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Принято считать, что мир РНК существовал до того, как катализ перешел к белковым молекулам [54, 55]. Однако в пекарских дрожжах *S. cerevisiae* по крайней мере два рибозима функционируют наряду с ферментами. Это обнаруженный ранее триозофосфатный рибозим [32] и охарактеризованный в настоящей статье глюкозофосфатизомеразный рибозим. Оба рибозима обнаружены впервые. Г6ФИ-рибозим образует нековалентный комплекс с ферментом гексокиназой, поэтому его легко получить в чистом виде на иммуноаффинной колонке с антителами к гексокиназе. Выделяющаяся при этом свободная ГК затем удаляется сорбцией на анионообменнике IRA-400. В спектрах поглощения РНК после осаждения этанолом соотношение поглощения при длинах волн 260/280 нм равнялось 2.2, а при 260/230 нм – 1.94, что соответствует чистой РНК. При этом измерение содержания белка в препарате свободной РНК показало его полное отсутствие.

Молекулярная масса Г6ФИ-рибозима составила ~14.15–14.5 кДа, что соответствует 41–42 нуклеотидам. Определение кинетических параметров свободного рибозима и рибозима в комплексе с белком показало, что они одинаковы как для Г6Ф,

так и для Ф6Ф. Средство к Г6Ф и Ф6Ф у рибозима того же порядка, что и для белкового фермента (табл. 2).

При использовании фруктозы осуществляется цепочка реакций: ГК превращает фруктозу в Ф6Ф, а рибозим изомеризует Ф6Ф в Г6Ф.  $V_{\max}$  такой тандемной реакции, определяемая активностью рибозима, практически не изменяется, а увеличение  $K_m$  может быть обусловлено тем, что часть фруктозы используется вторым, свободным активным центром ГК, выделяясь при этом в среду и уменьшая таким образом фактическую концентрацию фруктозы, используемой первым, связанным с рибозимом, активным центром.

Метод выделения рибозимов из их комплекса с ферментами на иммуноаффинной колонке быстр, точен и удобен и может быть использован для выделения других рибозимов.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Статья посвящается памяти моего дорогого учителя Германа Александровича Кочетова.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cech T.R., Zaig A.J., Grabowski P.I. // Cell. 1981. V. 27. P. 487–496.  
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90390-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90390-1)
2. Kruger K., Grabowski P.J., Zaig A.J., Sands J., Gottschling D.E., Cech T.R. // Cell. 1982. V. 31. P. 147–157.  
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90414-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90414-7)
3. Guerrier-Takada C., Gardiner K., Marsh T., Pace N., Altman S. // Cell. 1983. V. 35. P. 849–857.  
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90117-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90117-4)
4. Wilson T.J., Lilley D.M.J. // Wiley Interdiscip. Rev. RNA. 2021. V. 12. P. e1651.  
<https://doi.org/10.1002/wrna.165>
5. Lilley D.M. // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2011. V. 366. P. 2910–2917.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0132>
6. Lilley D.M. // Biochem. Soc. Trans. 2011. V. 39. P. 641–646.  
<https://doi.org/10.1042/BST0390641>
7. Wilson T.J., Lilley D.M. // RNA. V. 21. P. 534–537.  
<https://doi.org/10.1261/rna.049874.115>
8. Müller S., Appel B., Balke D., Hieronymus R., Nübel C. // F1000Res. 2016. V. 5. P. 1511.  
<https://doi.org/10.12688/f1000research.8601.1>
9. Kuznetsova S.A., Petrukov K.S., Pletnev F.I., Sergiev P.V., Dontsova O.A. // Biochemistry (Moscow). 2019. V. 84. P. 851–869.  
<https://doi.org/10.1134/S0006297919080029>
10. Suga H., Cowan J.A., Szostak J.W. // Biochemistry. 1998. V. 37. P. 10118–10125.  
<https://doi.org/10.1021/bi980432a>
11. DeRose V.J. // Chem. Biol. 2002. V. 9. P. 961–969.  
[https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(02\)00217-X](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00217-X)
12. Kingery D.A., Pfund E., Voorhees R.M., Okuda K., Wohlgemuth I., Kitchen D.E., Rodnina M.V., Strobel S.A. // Chem. Biol. 2008. V. 15. P. 493–500.  
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.04.005>
13. Wohlgemuth I., Brenner S., Beringer M., Rodnina M.V. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 32229–32235.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M805316200>
14. Kikovska E., Svard S.G., Kirsebom L.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 2062–2067.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0607326104>
15. Marvin M.C., Engelke D.R. // J. Cell. Biochem. 2009. V. 108. P. 1244–1251.  
<https://doi.org/10.1002/jcb.22367>
16. McCarthy T.J., Plog M.A., Floy S.A., Jansen J.A., Juliane K., Soukup J.K., Soukup G.A. // Chem. Biol. 2005. V. 12. P. 1221–1226.  
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.09.006>
17. Brooks K.M., Hampel K.J. // Biochemistry. 2011. V. 50. P. 2424–2433.  
<https://doi.org/10.1021/bi101842u>
18. Bingaman J.L., Zhang S., Stevens D.R., Yennawar N.H., Hammes-Schiffer S., Bevilacqua P.C. // Chem. Biol. 2017. V. 13. P. 439–445.  
<https://doi.org/10.1038/nchembio.2300>
19. Lohse P.A., Szostak J.W. // Nature. 1996. V. 381. P. 442–444.  
<https://doi.org/10.1038/381442a0>
20. Travascio P., Bennet A.J., Wang D.Y., Sen D. // Chem. Biol. 1999. V. 6. P. 779–787.  
[https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(99\)80125-2](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(99)80125-2)
21. Nieuwlandt D., West M., Cheng X., Kirshenheuter G., Eaton B.E. // ChemBioChem. 2003. V. 4. P. 651–654.  
<https://doi.org/10.1002/cbic.200300610>
22. Cernak P., Sen D. // Nat. Chem. 2013. V. 5. P. 971–977.  
<https://doi.org/10.1038/nchem.1777>
23. Tsukiji S., Pattnaik S.B., Suga H. // Nat. Struct. Biol. 2003. V. 10. P. 713–717.  
<https://doi.org/10.1038/nsb964>
24. Corley M., Burns M.C., Yeo G.W. // Mol. Cell. 2020. V. 78. P. 9–29.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.03.011>
25. Smith J.M., Sandow J.J., Webb A.I. // Biochem. Soc. Trans. 2021. V. 49. P. 393–403.  
<https://doi.org/10.1042/BST20200688>
26. Ramanathan M., Porter D.F., Khavari P.A. // Nat. Methods. 2019. V. 16. P. 225–234.  
<https://doi.org/10.1038/s41592-019-0330-1>
27. Tsukiji S., Pattnaik S.B., Suga H. // J. Am. Chem. Soc. 2004. V. 126. P. 5044–5045.  
<https://doi.org/10.1021/ja0495213>
28. Fusz S., Eisenführ A., Srivatsan S.G., Heckel A., Famulok M. // Chem. Biol. 2005. V. 12. P. 941–950.  
<https://doi.org/10.1021/ja0495213>
29. Fusz S., Srivatsan S.G., Ackermann D., Famulok M. // J. Org. Chem. 2008. V. 73. P. 5069–5077.  
<https://doi.org/10.1021/jo800639p>

30. Curtis N.J., Jeffery C.J. // *Biochem. Soc. Trans.* 2021. V. 49. P. 1099–1108.  
https://doi.org/10.1042/BST20200664
31. Gemmill D., D'souza S., Meier-Stephenson V., Patel T.R. // *Biochem. Cell Biol.* 2020. V. 98. P. 31–41.  
https://doi.org/10.1139/bcb-2019-0041
32. Solovjeva O.N. // *Open J. Anal. Bioanal. Chem.* 2020. V. 4. P. 020–028.  
https://doi.org/10.17352/ojabc.000020
33. Gancedo C., Flores C.L. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2008. V. 72. P. 197–210.  
https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-07
34. Ahuatzj D., Riera A., Pela Ez.R., Herrero P., Moreno F. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 4485–4493.  
https://doi.org/10.1074/jbc.M606854200
35. Rodríguez-Saavedra C., Morgado-Martínez L.E., Burgos-Palacios A., King-Díaz B., López-Coria M., Sánchez-Nieto S. // *Front. Mol. Biosci.* 2021. V. 8. P. 701975.  
https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.701975
36. Castello A., Hentze M.W., Preiss T. // *Trends Endocrinol. Metab.* 2015. V. 26. P. 746–757.  
https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.09.012
37. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.  
https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3
38. Wilfinger W.W., Mackey K., Chomczynski P. // *Biotechniques.* 1997. V. 22. P. 474–481.  
https://doi.org/10.2144/97223st01
39. Jacob L., Beecken V., Bartunik L.J., Rose M., Bartunik H.D. // *J. Chromatogr.* 1991. V. 587. P. 85–92.  
https://doi.org/10.1016/0021-9673(91)85201-p
40. Rabinovitz M. // *FEBS Lett.* 1992. V. 302. P. 113–116.  
https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80418-G
41. White M.R., Garcin E.D. // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 2016. V. 7. P. 53–70.  
https://doi.org/10.1002/wrna.1315
42. Arutyunova E.I., Danshina P.V., Domnina L.V., Pleten A.P., Mironetz V.I. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 307. P. 547–552.  
https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01222-1
43. Baranowska B., Baranowski T. // *Mol. Cell Biochem.* 1977. V. 16. P. 43–48.  
https://doi.org/10.1007/BF01769838
44. Baranowska B., Baranowski T. // *Mol. Cell Biochem.* 1977. V. 17. P. 75–83.  
https://doi.org/10.1007/BF01743430
45. Castello A., Hentze M.W., Preiss T. // *Trends Endocrinol. Metab.* 2015. V. 26. P. 746–757.  
https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.09.012
46. Schmidt E.E., Colowick S.P. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1973. V. 158. P. 458–470.  
https://doi.org/10.1016/0003-9861(73)90537-7
47. Salas M., Vinuela E., Sols A. // *J. Biol. Chem.* 1965. V. 240. P. 561–568.  
https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)45210-0
48. Bessell E.M., Thomas P. // *Biochem. J.* 1973. V. 131. P. 77–82.  
https://doi.org/10.1042/bj1300020p
49. Solovjeva O.N. // *Biochemistry (Moscow).* 2002. V. 67. P. 667–671.  
https://doi.org/10.1023/a:1016198321838
50. Brückner J. // *Biochem. J.* 1955. V. 60. P. 200–205.  
https://doi.org/10.1042/bj0600200
51. Barbas C.F., 3rd, Burton D.R., Scott J.K., Silverman G.J. // *CSH Protoc.* 2007. P. pdb.ip47.  
https://doi.org/10.1101/pdb.ip47
52. Mansour T.E. // *J. Biol. Chem.* 1963. V. 238. P. 2285–2292.  
https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)67967-6
53. Fromm H.J., Zewe V. // *J. Biol. Chem.* 1962. V. 237. P. 3027–3032.  
https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)50115-0
54. Cech T.R. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012. V. 4. P. a006742.  
https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006742
55. Robertson M.P., Joyce G.F. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012. V. 4. P. a003608.  
https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003608

## A New Complex of the Glucose Phosphate Isomerase Ribozyme with the Enzyme Hexokinase in Yeast

O. N. Solovjeva\*, #

#Phone: +7 (495) 939-14-56; e-mail: soloveva\_o@list.ru

\*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1/40, Moscow, 119234 Russia

The existence of a previously unknown ribozyme with the catalytic function of glucose phosphate isomerase was shown. It catalyzes the interconversion of glucose 6-phosphate and fructose 6-phosphate. This ribozyme was found in baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* and was isolated as a complex with the enzyme hexokinase. The complex was easily isolated on an immunoaffinity column with antibodies to hexokinase. The ribozyme consists of 41–42 nucleotides and has a molecular weight of about 14.15–14.5 kDa.  $K_m$  and  $V_{max}$  are accordingly  $0.14 \pm 0.02$  mM and  $14.0 \pm 1.3$  U/mg for glucose 6-phosphate and  $0.2 \pm 0.03$  mM and  $15.4 \pm 1.4$  U/mg for fructose 6-phosphate. These kinetic characteristics are approximately the same in the complex and for the free ribozyme. Hexokinase within the complex retains its catalytic activity.

*Keywords:* ribozymes, catalytic RNA, ribonucleoprotein, glucose phosphate isomerase, *Saccharomyces cerevisiae*



## БЕЛКОВЫЙ ПРОФИЛЬ И АЛЛЕРГЕННЫЕ СВОЙСТВА ТРОПОМИОЗИНА И ДРУГИХ АЛЛЕРГОКОМПОНЕНТОВ В СОСТАВЕ ВОДНО-СОЛЕВОГО ЭКСТРАКТА ГИГАНТСКОЙ ТИГРОВОЙ КРЕВЕТКИ (*Penaeus monodon*)

© 2023 г. В. М. Бержец\*, Г. И. Алаторцева\*, Л. Н. Нестеренко\*, С. В. Хлгатян\*, С. Ю. Петрова\*<sup>#,</sup>, Н. С. Петрова\*, А. В. Васильева\*, Л. А. Пищулина\*, О. Ю. Емельянова\*

\*ФГБНУ “Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова”

Министерства науки и высшего образования Российской Федерации,

Россия, 105064 Москва, Малый Казенный пер., 5а

Поступила в редакцию 27.11.2022 г.

После доработки 10.12.2022 г.

Принята к публикации 11.12.2022 г.

Несмотря на успехи в идентификации новых аллергенов ракообразных, отличных от тропомиозина, многие потенциальные аллергены остаются неидентифицированными. В настоящее время на российском рынке отсутствуют диагностические и лечебные аллергены ракообразных, в том числе тропомиозин беспозвоночных. Цель данного исследования – изучение аллергенных свойств тропомиозина и других белков водно-солевого экстракта из гигантских тигровых креветок (*Penaeus monodon*). Аллергенные экстракты готовили из сырого и вареного мяса тигровых креветок *P. monodon*. Для выявления специфической активности экспериментальных аллергенов использовали сыворотки пациентов с сенсibilизацией к ракообразным. Содержание специфических IgE в сыворотках составляло 3.50–17.49 МЕ/мл, что соответствует 3-му классу активности. С образцами аллергенов сырых и вареных креветок проводили ИФА и электрофорез в ПААГ с последующим вестерн-блоттингом с наиболее аллерген-специфичной сывороткой. Показано, что экстракты из сырых и вареных креветок обладают аллергенной активностью (связывают IgE). Термическая обработка креветок не оказывала влияния на изменение аллергенной активности экстрактов, кроме одного образца, у которого была обнаружена сильная реакция с антигенами из экстракта вареных креветок. Доказано, что подобранные условия экстрагирования позволяют выявлять многофракционный характер белкового профиля экстрактов сырых и вареных креветок. В вестерн-блоттинге экстракт из сырых креветок имел слабую реакцию, причем тропомиозин вообще не был выявлен. В то же время в препарате вареных креветок определено пять белковых компонентов, активно реагирующих с IgE-антителами пациента, страдающего аллергией к ракообразным. Полученные данные позволят расширить знания об аллергии к ракообразным и продолжить исследования по определению оптимальных условий очистки аллергенов креветок.

**Ключевые слова:** тропомиозин, аллергены ракообразных, *Penaeus monodon*, паналлергены, вестерн-блоттинг

**DOI:** 10.31857/S0132342323050111, **EDN:** BQJLKL

### ВВЕДЕНИЕ

Аллерген – многокомпонентная система, включающая несколько белков. Белки, имеющие доказанную аллергенную активность, называются аллергокомпонентами. Формирование сенсibilизации к отдельным белкам пищевого аллергена различно, что обуславливает выделение мажорных и минорных аллергокомпонентов [1–3].

При кожном тестировании и в прик-тестах используются нативные многокомпонентные экс-

тракты того или иного вида аллергенов [1]. При необходимости выявления аллергокомпонента, вызывающего аллергическую реакцию, проводят молекулярную аллергодиагностику. Данное исследование позволяет определить основной аллергенный триггер, прогнозировать возможную перекрестную реактивность, индивидуально назначать лечебное питание и аллерген-специфическую иммунотерапию [4, 5].

Молекулы аллергенов классифицируются по семействам белков в зависимости от их структуры и биологической функции. У различных молекул могут быть общие эпитопы (антиген-связывающие сайты), а одни и те же IgE-антитела способны взаимодействовать с молекулами аллергенов,

Сокращения: IgE – иммуноглобулин E; ФСБ-Т – 0.02 М фосфатный буфер (pH 7.2), содержащий 0.05% Tween 20.

<sup>#</sup> Автор для связи: (тел.: +7 (916) 463-32-97; эл. почта: petrovastanislava@yandex.ru).

имеющими сходную структуру, но различное происхождение. Изучение таких перекрестно-реагирующих аллергенов предоставляет ценную информацию о сенсibilизации к разным объектам [4]. И, напротив, некоторые молекулы – уникальные маркеры специфических аллергенов, что позволяет идентифицировать причинно-значимый аллерген. Перекрестно-реагирующий антиген, относящийся к белковому семейству, обнаруживаемый у дальнородственных видов биологических объектов, имеющий высококонсервативную структуру и способный инициировать связывание с антителами изотипа IgE, называют паналлергеном. Паналлергены нередко служат причиной перекрестной сенсibilизации к различным продуктам питания, а также к пыльцевым, бытовым и эпидермальным аллерегенам. Механизм формирования перекрестной сенсibilизации связан с высокой идентичностью в организации IgE-связывающих эпитопов белков разных групп аллергенов, что позволяет им перекрестно реагировать со специфическими IgE друг друга. Один из паналлергенов животного происхождения – тропомиозин беспозвоночных [1, 6–8].

Тропомиозин представляет собой миофибрилярный белок с молекулярной массой 34–38 кДа, это наиболее распространенный аллерген ракообразных. Одинаковые последовательности аминокислот в составе тропомиозина моллюсков, ракообразных, а также клещей домашней пыли и тараканов свидетельствуют о высокой консервативности данного белка. При контакте с аллерегенами клещей домашней пыли и при употреблении морепродуктов может возникнуть гиперчувствительность к тропомиозину, что вызывает тяжелые системные и местные аллергические реакции. Тропомиозин относится к термостабильным белкам, устойчивым к нагреванию и гидролизу. Его аллерегенные свойства не исчезают даже после кулинарной обработки [1, 9].

Помимо тропомиозина существуют и другие белки-аллергены в классе ракообразных, наиболее известные из них – аргининкиназа (40 кДа) [10], легкая цепь миозина (20 кДа) [11] и саркоплазматический кальций-связывающий белок (SCP) (20 кДа) [6]. В отличие от тропомиозина, SCP проявляет перекрестную реактивность только между ракообразными. Pibooprosanun et al. в 2011 г. [12] сообщили о гемоцианине гигантской речной креветки *Macrobrachium rosenbergii*, выявленном в гемолимфе ракообразных, где он транспортирует кислород [9].

На современном этапе обнаружено еще ~39 незарегистрированных аллергенов у различных видов креветок, включая белок теплового шока HSP70,  $\alpha$ -тубулин, химотрипсин (термостабилен), циклофилин,  $\beta$ -энолазу, альдолазу А и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу. Практиче-

ски все выявленные белки имеют высокую гомологию не только с белками ракообразных, моллюсков, домашних пылевых клещей и тараканов, но и рыб ( $\beta$ -энолаза и альдолаза А), грибов *Aspergillus fumigatus* и растений *Triticum aestivum* (циклофилин и G3PD). Вышеизложенное, безусловно, может свидетельствовать о разнонаправленной перекрестной реактивности аллергенов креветок [13].

Несмотря на успехи в идентификации новых аллергенов ракообразных, отличных от тропомиозина, многие потенциальные аллергены остаются неидентифицированными.

В настоящее время на российском рынке отсутствуют высокоочищенные аллергены ракообразных (в том числе тропомиозин беспозвоночных), предназначенные для постановки кожных аллергопроб и проведения аллерген-специфической иммунотерапии. Изучение перекрестно-реагирующих аллергенов может расширить информацию о перекрестной сенсibilизации к разным объектам и уменьшить количество диагностических тестов [4].

Цель данного исследования – изучение аллергенных свойств тропомиозина и других белков водно-солевого экстракта гигантских тигровых креветок *Penaeus monodon*, а также идентификация аллергенов из тигровых креветок *P. monodon*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Водно-солевые экстракты аллергенов.** Технология приготовления водно-солевых экстрактов аллергенов из сырых и вареных креветок была основана на ранее разработанном способе получения водно-солевых экстрактов из клещей домашней пыли [14]. В полученном экстракте из сырых креветок содержание белкового азота по Несслеру составило 27 500 PNU, из вареных креветок – 11 200 PNU. Концентрация белка по методу Бредфорд в полученных экстрактах составила 113 и 60 мкг/мл соответственно.

**Иммуноферментный анализ.** ИФА проводили с сыворотками четырех пациентов, страдающих аллергией к ракообразным. В лунки планшета сорбировали следующие образцы: 1) аллерген из сырых креветок, 2) аллерген из сырых креветок после концентрирования и ультрафильтрации, 3) аллерген из вареных креветок, 4) аллерген из вареных креветок после концентрирования и ультрафильтрации.

Показано, что экстракты из сырых и вареных креветок связывают IgE, т.е. обладают аллергенной активностью (табл. 1). Термическая обработка креветок не оказывала влияния на аллергенную активность экстрактов. Однако в ИФА с одной из четырех исследованных сывороток (477+) выявлена наиболее выраженная реакция с анти-

**Таблица 1.** Выявление специфических IgE-антител к белку тропомиозину в экстрактах из сырых и вареных тигровых креветок (*P. monodon*) методом ИФА

| Рабочие названия сывороток | ОП <sub>450</sub> (Cut-off = 0.04), о.е./мл |                  |                  |                  |
|----------------------------|---|------------------|------------------|------------------|
|                            | сырые креветки                              |                  | вареные креветки |                  |
|                            | до обработки                                | после обработки* | до обработки     | после обработки* |
| 477+                       | 0.183                                       | 0.165            | 1.550            | 1.877            |
| 1X                         | 0.154                                       | 0.143            | 0.064            | 0.060            |
| 2–                         | 0.138                                       | 0.116            | 0.041            | 0.060            |
| 3–                         | 0.125                                       | 0.106            | 0.036            | 0.071            |

\* Фильтрация и концентрирование препаратов с пределом исключения белков массой 10 кДа с последующим разведением полученного материала до 5 мкг/мл.

генами из экстракта вареных креветок. Также было выявлено незначительное усиление реакции антиген–антитело после обработки препаратов (фильтрации и концентрирования с пределом исключения белков массой 10 кДа).

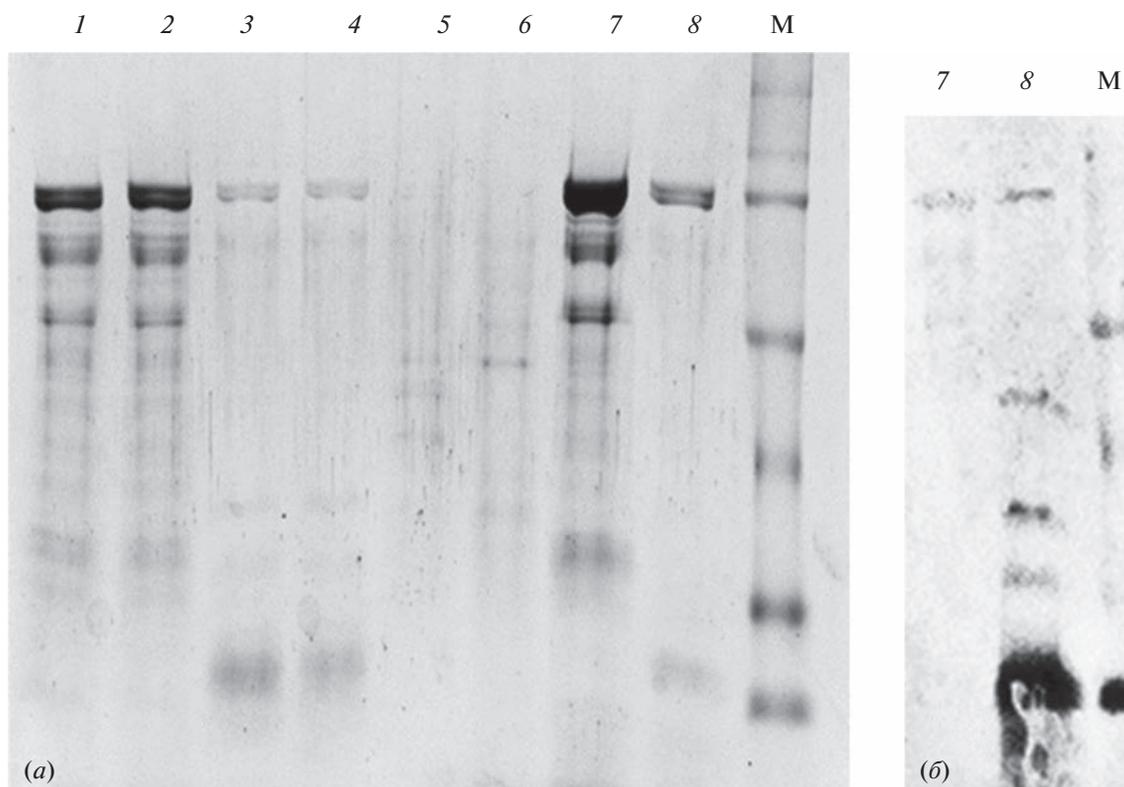
Исходя из полученных результатов, в вестерн-блоттинге использовали сыворотку 477+ с высоким титром аллерген-специфических антител.

**SDS-PAGE по Лэмбли.** Использование продуктов экстракции аллергенов из сырых и вареных креветок позволило оценить их белковый профиль. Анализ экстрактов сырых креветок до и после концентрирования выявил большее количество белковых фракций (~12), чем в экстракте вареных креветок (~5). Полученная нами электрофореграмма белкового профиля водно-солевого экстракта сырых креветок (рис. 1а, дорожки 1 и 2) соответствует профилю аллергенов гигантских тигровых креветок *P. monodon*, представленному в литературе [15]. На электрофореграмме в образцах сырых креветок представлены фракции 38 и 39–40 кДа, по-видимому, соответствующие тропомиозину и аргининкиназе, 41–46 кДа – β-актину, 50 кДа – α-тубулину, 75 кДа – гемоглобину и высокомолекулярные фракции, вероятно, соответствующие белку, подобному гликогенфосфорилазе (95 кДа), и парамиозину (100 кДа). Низкомолекулярные фракции: легкая цепь миозина (20 кДа) и саркоплазматический кальций-связывающий белок (20 кДа) – не визуализировались. Электрофореграмма образцов вареных креветок (рис. 1а, дорожки 3 и 4) отличается по белковому профилю. Некоторые белки в диапазоне 40–100 кДа не визуализировались на электрофореграмме, что, по-видимому, связано с их денатурацией в результате термической обработки. На профиле образцов из вареных креветок наиболее выраженные полосы соответствуют фракциям 27–30 и 99–100 кДа. Менее заметны на электрофореграмме белки 38 кДа (тропомиозин), 40 кДа (аргининкиназа) и 95 кДа (белок, подобный гликогенфосфорилазе) [13, 15].

Анализ белковых фракций после концентрирования и ультрафильтрации выявил более выраженные и четкие полосы в образцах сырых креветок в отличие от образцов вареных креветок (рис. 1а, дорожки 7 и 8). Кроме того, необходимо отметить незначительные потери белков в ультрафильтрате данных аллергенов (рис. 1а, дорожки 5 и 6).

**Вестерн-блоттинг.** Вестерн-блоттинг проводили с исследуемыми экстрактами сырых и вареных креветок, прошедшими ультрафильтрацию и концентрирование. Примечательно, что в иммуноблоттинге с сыворотками пациентов со специфическими антителами в образцах сырых креветок определялись только высокомолекулярные белки с молекулярными массами ~75, 95 и 100 кДа, обладающие невысокой аллергенной активностью. В то же время с помощью тех же сывороток в образцах вареных креветок выявлены белки 100, 55–60, 40, 38 и 27–31 кДа, причем фракция белка 27–31 кДа имеет высокую антигенную активность (рис. 1б).

Аллергия на морепродукты из беспозвоночных: ракообразных (креветки, крабы, лобстеры, раки, омары), моллюсков (кальмары, осьминоги, гребешки, улитки, устрицы, мидии и др.) – достаточно распространена. Основной способ приготовления креветок – отваривание, однако, согласно данным литературы, аллергенная активность креветок при термической обработке не снижается, а в некоторых случаях даже повышается [16]. В литературе имеются и иные данные. Так, Liu et al. показали с помощью ИФА, что экстракты сырых креветок имеют более высокое связывание IgE, чем экстракты вареных креветок. Однако результаты дот-блоттинга указывали на более высокое связывание IgE с очищенным тропомиозином из вареных креветок, чем из сырых [17]. Необходимо отметить, что технология приготовления экстракта как очищенных, так и вареных креветок в цитируемой работе значительно отличалась от используемой нами. Влияние кипячения на реактивность креветок согласуется с результатами Carnes et al., которые также обнаружили, что экстракты вареных креветок были бо-



**Рис. 1.** Результаты электрофореза в 10%-ном ПААГ (а) и вестерн-блоттинга (б) препаратов сырых (113 мкг/мл) и вареных (60 мкг/мл) тигровых креветок (*P. monodon*) до и после концентрирования: (а) – 1 и 2 – сырые креветки, 3 и 4 – вареные креветки, 5 – ультрафильтрат сырых креветок, 6 – ультрафильтрат вареных креветок, 7 – препарат сырых креветок (концентрат); 8 – препарат вареных креветок (концентрат), М – маркер молекулярных масс (сверху вниз): 250, 150, 100, 75, 50, 37 и 25 кДа; (б) – 7 – препарат сырых креветок (концентрат), 8 – препарат вареных креветок (концентрат), М – маркер молекулярных масс (сверху вниз): 100, 75, 50, 37 и 25 кДа.

лее реактивными как в исследованиях *in vivo*, так и в результатах, полученных *in vitro* методом прямого ИФА [18].

Вышеизложенные результаты ИФА были подтверждены вестерн-блоттингом. Определено пять белков, реагирующих с IgE-антителами пациента, страдающего аллергией к ракообразным. В отличие от экстрактов из вареных креветок, экстракт из сырых креветок показывал слабую реакцию, причем тропомиозин вообще не был выявлен. Среди термостабильных белков, согласно данным литературы, были идентифицированы парамиозин (100 кДа), аргининкиназа (40 кДа) и тропомиозин (38 кДа). Белок 55–60 кДа не определен в связи с отсутствием доступных литературных данных. В зарубежной литературе имеются публикации об идентификации у тигровой креветки 44 аллергенов, что свидетельствует о значительном многообразии минорных аллергенов даже в термостабильном спектре белка. Всего в настоящее время обнаружено семь термостабильных белков у гигантской черной тигровой креветки [19]. Яркое пятно в области 27–31 кДа на электрофореграмме образцов вареных креветок, вероятно, может свиде-

тельствовать о скоплении денатурированных белковых фрагментов, образовавшихся после термической обработки. Необходимо отметить, что белки сохранили аллергенную активность даже после потери конформационной структуры.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы.** Все реактивы были высокой степени очистки: 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, компоненты буферных растворов (Sigma, Fluka, Helicon, США), конъюгат стрептавидин–пероксидаза (Sigma, США), антитела против IgE, меченные биотином (RIDA® AllergyScreen, США).

Растворы готовили на деионизированной воде (Milli-Q System, Millipore, США). Для проведения ИФА использовали 96-луночные планшеты для иммунологических исследований (Costar, США). Планшеты инкубировали на термостатируемом планшетном встряхивателе (Eppendorf, Германия). Концентрирование препаратов проводили в ячейках для ультрафильтрации Amicon Ultra-15 Ultracel 10K (Sigma-Aldrich, США) с пределом исключения 10 кДа. Состав препаратов изучали с

применением прибора для электрофореза Mini-Protean Tetra Cell System, прибора для переноса Transfer System Trans-Blot Turbo и прибора для визуализации гелей Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, США).

**Серологический материал.** Для выявления специфической активности экспериментальных аллергенов из сырых и вареных креветок *P. monodon* использовали образцы сывороток крови четырех пациентов, прошедших наблюдение в Клинико-диагностическом центре НИИВС им. И.И. Мечникова, с аллергией к ракообразным. С помощью метода RIDA® AllergyScreen (R-Biopharm AG, Германия) подбирали сыворотки с установленной степенью активности (3-й класс), что соответствует содержанию специфических IgE, равному 3.50–17.49 МЕ/мл.

**Получение водно-солевых экстрактов аллергенов.** Технология приготовления водно-солевых экстрактов аллергенов из сырых и вареных креветок была основана на ранее разработанном способе получения водно-солевых экстрактов из клещей домашней пыли [14].

Тигровые креветки вида *Penaeus monodon* фирмы ARK Sea Foods Ltd. были получены от ООО “Альянс-СПБ” (г. Санкт-Петербург, Россия) в замороженном виде. Прошли дополнительную фенотипическую экспертизу по видовой принадлежности у д.б.н. профессора В.М. Бержец и к.б.н. О.Ю. Емельяновой. Креветки размораживали при 5°C. Затем половину партии отваривали в течение 8 мин, далее охлаждали при комнатной температуре.

Сырые и вареные креветки измельчали на лабораторном миксере NHJJ (Tianjin Nithons Technology Co., Ltd., Китай). Измельченное сырье обезжиривали этиловым эфиром в соотношении 1 : 3 с последующим высушиванием.

Высушенные образцы (5 г) помещали в 200 мл раствора Эванса–Кока (0.08 М NaCl, 0.01 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4% фенола), pH 7.2.

Экстракцию проводили в течение 72 ч при 4°C. Для более полного извлечения гликопротеиновых комплексов из субстрата емкость с экстрагируемым материалом 3 раза в сутки с интервалом 1.5 ч помещали на 30 мин на аппарат для встряхивания жидкости (шейкер орбитальный лабораторный ПЭ-6500, Экросхим, Россия) при комнатной температуре (17–23°C). Затем экстракт центрифугировали на рефрижераторной центрифуге PC-6 (ОАО “ТНК “Дастан”, Киргизия) в течение 45 мин при 5000–6000 об/мин.

Для стерилизующей фильтрации использовали мембранные фильтры из политетрафторэтилена с диаметром пор 0.2 мкм (МФАС-Б, ЗАО НТЦ “Владипор”, Россия). После фильтрации в экстрактах определяли содержание белкового азота. Полученные объемы каждого аллергена составили

150 мл. Единицы белкового азота полученных экстрактов аллергенов определяли методом Несслера согласно ОФС.1.7.2.0026.15, количество белка – методом Бредфорд согласно ОФС.1.7.2.0034.15, величину pH – потенциометрическим методом согласно ОФС.1.7.2.0034.15.

**Иммуноферментный анализ (ИФА).** На первой стадии изучаемые образцы сорбировали в лунках цельного прозрачного 96-луночного планшета (высокое связывание, полистирол, Nest, Китай) по 100 мкл путем пассивной иммобилизации в концентрации 5 мкг/мл в 0.1 М карбонатно-бикарбонатном буфере (КББ), pH 9.6. Планшеты выдерживали в течение 19–22 ч при 4°C, затем промывали 0.02 М фосфатным буфером (pH 7.2), содержащим 0.05% Tween 20 (ФСБ-Т). Образцы сывороток вносили в лунки в разведении 1 : 50, инкубировали в течение 1 ч, отмывали ФСБ-Т. Затем вносили по 100 мкл раствора меченных биотином антител к IgE человека, выдерживали 1 ч при 37°C и промывали ФСБ-Т. Далее добавляли по 100 мкл раствора конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена и выдерживали 1 ч при 37°C. После промывания в лунки вносили по 100 мкл 33 мМ цитратного буферного раствора (pH 4.0) с 0.01%-ной перекисью водорода и 0.5 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидином. Через 15 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2 н. серной кислоты. Измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм (ОП<sub>450</sub>) и длине волны сравнения 680 нм на приборе Multiskan Ascent (Thermo LabSystems, Финляндия).

**Электрофорез в ПААГ.** Электрофорез препаратов аллергенов сырых и вареных креветок проводили в 10%-ном ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE по Лэммли) согласно ОФС.1.2.1.0023.15 на приборе Mini-Protean Tetra System (Bio-Rad, США).

**Вестерн-блоттинг.** После проведения электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану с помощью прибора Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, США). Мембраны блокировали 1%-ным раствором казеината натрия в фосфатно-солевом буфере (ФСБ-Т) и выдерживали с исследуемой сывороткой в разведении 1 : 100 в растворе 1%-ного БСА в ФСБ-Т в течение 1 ч при 37°C в шейкере-инкубаторе (New Brunswick, США) при скорости вращения 30 об/мин. После промывания ФСБ-Т мембрану инкубировали 1 ч при 37°C с раствором конъюгата антител против IgE с биотином, промывали и добавляли раствор конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена, выдерживали еще 1 ч при 37°C. Мембрану промывали ФСБ-Т и помещали в раствор цитратного буферного раствора (pH 4.0) с 0.01%-ной перекисью водорода и 0.5 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидином (1-Step™ TMB-Blotting, Thermo Scientific, США). Результаты оценивали визуально.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе были изучены аллергенные свойства белков водно-солевого экстракта тигровых креветок *P. monodon*. В результате ИФА с аллергоспецифичными сыворотками и электрофореза с последующим вестерн-блоттингом был оценен белковый профиль экстрактов креветок. На электрофореграмме визуальное определено ~12 белков в составе экстракта из сырых креветок и 5 белков в экстракте вареных креветок. При этом только три белковые фракции из экстракта сырых креветок слабо связывали IgE больших, тропомиозин не был выявлен. В то же время пять белковых фракций в экстракте вареных креветок продемонстрировали высокоаффинное связывание. Вышеизложенное свидетельствует не только о сохранности аллергенных свойств белков креветок после термической обработки, но и об их высокой аллергенной активности. Выявленная аллергенная активность белковой фракции 55–60 кДа требует дальнейшего исследования, как и фракции 27–31 кДа. В состав последней фракции могут входить как денатурированные белковые фрагменты, образовавшиеся после термической обработки образцов и сохранившие аллергенную активность, так и один из аллергенов данных креветок – триозофосфатизомераза [11].

Для упрощения диагностики поливалентной аллергии целесообразно получение очищенного паналлергена тропомиозина. Получение основного аллергена – тропомиозина в виде водно-солевого экстракта креветки *P. monodon* – позволит повысить эффективность диагностических тестов и методов изучения механизмов развития аллергии. В совокупности понимание перекрестной иммунологической реактивности имеет большое значение для расширения наших знаний об аллергии. Кроме того, эти знания могут помочь в разработке интеллектуальных инструментов для прогнозирования аллергенности новых белков или пищевых продуктов.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование “Разработка нативных и молекулярных форм аллергенов, предназначенных для диагностики и лечения аллергических заболеваний в педиатрической практике” выполнено в рамках темы № АААА-А19-119021890056-4 при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации с использованием оборудования Центра коллективного пользования ФГБНУ “НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова”.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не включала каких-либо исследований с участием пациентов. Исследования с коллекцией сывороток одобрены на заседании Этического

комитета ФГБНУ “НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова (протокол № 2 от 19 февраля 2019 г.).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Альбанова В.И., Петрова С.Ю.* // Атопический дерматит: учебное пособие для врачей. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2022. С. 50–83.  
<https://doi.org/10.33029/9704-6852-4-ATD-2022-1-168>
2. *Альбанова В.И., Пампура А.Н.* // Атопический дерматит, 2-е издание. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2020. С. 55–88.  
<https://doi.org/10.33029/9704-5640-8-ATP-2020-1-144>
3. *Лепешкова Т.С., Бельтюков Е.К., Наумова В.В., Смоленская О.Г., Царькова С.А., Савельева Е.В., Закирова Л.Р.* // Пищевая аллергия. Диагностика, лечение и профилактика: учебное пособие. Екатеринбург: УГМУ, 2021. С. 20–21.
4. *Гамбаров С.С., Кюоян Л.А.* // Трудный пациент. 2019. Т. 17. С. 47–50.  
<https://doi.org/10.24411/2074-1995-2019-10020>
5. *Грищенко Е.А.* // Аллергология и иммунология в педиатрии. 2017. Т. 48. С. 36–48.  
<https://doi.org/10.24411/2500-1175-2017-00006>
6. *Canonica G.W., Ansotegui I.J., Pawankar R., Schmid-Grendelmeier P., van Hage M., Baena-Cagnani C.E., Melioli G., Nunes C., Passalacqua G., Rosenwasser L., Sampson H., Sastre J., Bousquet J., Zuberbier T., Allen K., Asero R., Bohle B., Cox L., de Blay F., Ebisawa M., Maximiliano-Gomez R., Gonzalez-Diaz S., Haahela T., Holgate S., Jakob T., Larche M., Matricardi P.M., Oppenheimer J., Poulsen L.K., Renz H.E., Rosario N., Rothenberg M., Sanchez-Borges M., Scala E., Valenta R.* // World Allergy Organ. J. 2020. V. 13. P. 100091.  
<https://doi.org/10.1016/j.wao-jou.2019.100091.13>
7. *Chafen J.J.S., Newberry S.J., Riedl M.A., Bravata D.M., Maglione M., Suttrop M.J., Sundaram V., Paige N.M., Towfigh A., Hulley B.J., Shekelle P.G.* // JAMA. 2010. V. 303. P. 1848–1856.  
<https://doi.org/10.1001/jama.2010.582>
8. *Sicherer S.H.* // J. Allergy Clin. Immunol. 2011. V. 127. P. 594–602.  
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.11.044>
9. *Leung N.Y., Wai C.Y., Shu S., Wang J., Kenny T.P., Chu K.H., Leung P.S.* // Clin. Rev. Allergy Immunol. 2014. V. 46. P. 180–197.  
<https://doi.org/10.1007/s12016-012-8336-9>
10. *Insects as sustainable food ingredients: production, processing and food applications / Ed. Dossey A.T., Morales-Ramos J.A., Rojas M.G.* New York: Acad. Press, 2016. P. 252–272.  
<https://doi.org/10.1016/C2014-0-03534-4>
11. Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee. <http://www.allergen.org>
12. *Piboonpocanun S., Jirapongsananuruk O., Tipayanon T., Boonchoo S., Goodman R.E.* // Mol. Nutr. Food Res. 2011. V. 55. P. 1492–1498.  
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201000602>

13. Karnaneedi S., Huerlimann R., Johnston E.B., Nugraha R., Ruethers T., Taki A.C., Kamath S.D., Wade N.M., Jerry D.R., Lopata A.L. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. 32. <https://doi.org/10.3390/ijms22010032>
14. Бержец В.М., Петрова Н.С., Хлгатьян С.В., Емельянова О.В. // Патент RU 2331437 C1, опубл. 20.08.2008. [https://yandex.ru/patents/doc/RU2331437C1\\_20080820](https://yandex.ru/patents/doc/RU2331437C1_20080820)
15. Sahabudin S., Misnan R., Yadzir Z.H., Mohamad J., Abdullah N., Bakhtiar F., Murad S. // Malaysian J. Med. Sci. 2011. V. 18. P. 2732.
16. Faisal D., Vasiljevic T., Osaana D. // Int. J. Food Sci. Technol. 2019. V. 54. P. 183–193. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13922>
17. Liu G.-M., Cheng H., Nesbit J.B., Su W.-J., Gao M.-J., Maleki S.J. // J. Food. Sci. 2010. V. 75. P. 1–5.
18. Carnes J., Ferrer A., Huertas A.J., Andreu C., Larramendi C.H., Fernandez-Caldas E. // Ann. Allergy Asthma Immunol. 2007. V. 98. P. 349–354.
19. Kamath S.D., Rahman A.M., Voskamp A., Komoda T., Rolland J.M., O'Hehir R.E., Lopata A.L. // Mol. Nutr. Food Res. 2014. V. 58. P. 1144–1155. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300584>

## **Research of the Protein Profile and Allergenic Properties of the Tropomyosin and Other Allergenic Components in the Composition of Water-Salt Extract of Giant Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*)**

**V. M. Berzhets\*, G. I. Alatortseva\*, L. N. Nesterenko\*, S. V. Khlgatian\*, S. Yu. Petrova\*<sup>#,</sup>,  
N. S. Petrova\*, A. V. Vasilyeva\*, L. A. Pishulina\*, and O. Yu. Emelyanova\***

<sup>#</sup>Phone: +7 (916) 463-32-97; e-mail: [petrovastanislava@yandex.ru](mailto:petrovastanislava@yandex.ru)

<sup>\*</sup>*Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Maly Kazenny per. 5a, Moscow, 105064 Russia*

Despite the success in identifying new crustacean allergens other than tropomyosin, many potential allergens remain unidentified. At present there are no diagnostic and treatment crustaceans allergens on the Russian market, including tropomyosin of invertebrates. The aim of the research was to explore allergenic properties of tropomyosin and other proteins in water-salt extract from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Raw and boiled meat of giant tiger shrimp was used to prepare allergenic extracts. To identify the specific activity of experimental allergens, sera from patients allergic to crustaceans with an established degree of activity (class 3) were used. The levels of specific IgE were from 3.5 to 17.5 IU/mL. ELISA was performed with the allergen samples. Polyacrylamide gel electrophoresis of raw and boiled shrimp allergen preparations was followed by Western blotting with the most allergen-specific serum. It has been shown that the extracts from raw and boiled shrimp have allergenic activity (bind IgE). The heat treatment of shrimp had no effect on allergenic activity except for one sample, where a strong reaction with the antigens was found. It is proved that the selected extraction conditions make it possible to reveal the multifractional nature of the protein profile of raw and boiled shrimp extracts. In Western blotting experiments the raw shrimp extract showed a weak reaction; tropomyosin was not detected. At the same time five protein fractions were identified in the boiled shrimp samples which reacted with IgE antibodies of a patient with crustaceans' allergy. The data obtained will allow us expanding the knowledge about crustacean allergy and continueing our research to determine the optimal conditions for cleaning shrimp allergens.

*Keywords: tropomyosin, crustacean allergens, Penaeus monodon, pan-allergens, western blotting*



УДК 547.914.2

## СИНТЕТИЧЕСКИЕ ТРАНСФОРМАЦИИ ВЫСШИХ ТЕРПЕНОИДОВ. 42. СИНТЕЗ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 18-НОР-4-(КАРБОКСИЭТИЛ)ИЗОПИМАРА-7,15-ДИЕНА И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ НА ЛИНИЯХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК MCF7, U-87 MG и DU 145

© 2023 г. М. А. Громова\*, \*\*, Ю. В. Харитонов\*\*, Т. В. Рыбалова\*\*, В. А. Ларионов\*\*\*, Т. С. Голубева\*\*\*\*, Э. Э. Шульц\*\*, #

\*Новосибирский государственный педагогический университет,  
Россия, 630126 Новосибирск, ул. Вилюйская, 28

\*\*Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН,  
Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 9

\*\*\*Институт элементорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН,  
Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 28

\*\*\*\*Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики” СО РАН,  
Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 10

Поступила в редакцию 08.11.2022 г.

После доработки 17.11.2022 г.

Принята к публикации 18.11.2022 г.

Кросс-сочетанием производных изопимаровой кислоты с замещенными иодаренами, катализируемым ацетатом палладия в присутствии карбоната серебра, синтезированы (*E*)-16-арилзамещенные производные трициклических дитерпеноидов. Конденсация полученного *in situ* дихлорангидрида (*E*)-18-нор-4-(карбоксиэтил)-16-(2-карбоксиэтил)изопимара-7,15-диена с гидрохлоридом пропаргиламина приводит к получению соответствующего диалкина, который легко вступает в реакцию азид-алкинового циклоприсоединения (CuAAC) с диазидом. Основным продуктом этой реакции – макрогетероциклическое соединение, включающее фрагмент трициклического дитерпеноида пимаранового типа и 1,2,3-триазольные кольца в линкерной цепи. Взаимодействие полученного *in situ* хлорангидрида (*E*)-18-нор-16-азидо-4-(карбоксиэтил)изопимара-7,15-диена с гидрохлоридом пропаргиламина или алкинилзамещенным производным защищенного Gly-Gly-дипептида приводило к получению соответствующих азидоалкинов. В результате внутримолекулярной CuAAC-реакции азидодипептидиалкина получили макрогетероциклическое производное, содержащее дипептидный и триазольный фрагменты в линкерной цепи. Синтезированные соединения обладали большей (по сравнению с изопимаровой кислотой) цитотоксичностью на моделях опухолевых клеток MCF7, U-87 MG и DU 145 и были менее токсичны для нераковых клеток, чем препарат сравнения доксорубинин. Значение GI<sub>50</sub> наиболее активного соединения составляет 6.3 мкМ (индекс селективности >15) (МТТ-тест). Синтезированные производные трициклического дитерпеноида изопимаровой кислоты могут быть использованы для разработки новых противоопухолевых агентов.

**Ключевые слова:** изопимаровая кислота, дитерпеноиды, дипептид, CuAAC-реакция, макрогетероциклы, цитотоксичность

**DOI:** 10.31857/S0132342323050032, **EDN:** VLXESA

### ВВЕДЕНИЕ

Дитерпеновые кислоты хвойных растений проявляют разнообразную биологическую актив-

ность [2–4]. Было обнаружено, что трициклический дитерпеноид пимаранового типа – изопимаровая кислота (**I**) – достоверно обладает антибактериальным [5, 6], противовоспалительным [7] действием и способностью предотвращать повышение кровяного давления за счет активации Ca<sup>2+</sup>/K<sup>+</sup>-каналов (BK-каналов) [8, 9]. Модуляция активности BK-каналов в возбудимых и невозбудимых клетках имеет большое значение для разработки терапевтических агентов. В последнее

\* Сообщение 41 – см. статью Gromova et al. [1].

Сокращения: CuAAC – реакция азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемая соединениями меди; GI<sub>50</sub> – концентрация, при которой наблюдается 50%-ное ингибирование роста клеток; IS – индекс селективности.

# Автор для связи: (тел.: +7 (383) 330-85-33; эл. почта: schultz@nioch.nsc.ru).

время ионные каналы становятся важными мишенями для терапии рака [10, 11]. Превращения по атому С4 изопимаровой кислоты позволили значительно изменить биологическую активность ее производных. Так, ацилгидразоны, полученные из гидразида изопимаровой кислоты и производных бензальдегида, тиофенальдегидов [12] или замещенных пиридинальдегидов [13], обладали большей цитотоксичностью в отношении клеточных линий гепатокарциномы Нер G2 и рака молочной железы MDA-MB-231, чем препарат сравнения 5-фторурацил. Производные изопимаровой кислоты с ацилтиоуреидным фрагментом (наиболее активно ацилпроизводное изопимаровой кислоты с фрагментом *N*-(4-фторфенил)тиомочевины ингибировали рост клеток злокачественной меланомы A375 и карциномы простаты PC-3, вызывая более чем 90%-ную гибель клеток в концентрации 50 мкМ [14]. Нами было показано, что замена карбоксильной группы в положении С4 на оксазолильный заместитель позволила увеличить цитотоксичность и селективность действия в отношении клеточных линий рака молочной железы MCF7 и MDA-MB-231 [15]. Интересные результаты были также получены при введении дополнительных заместителей в положение С16. Так, для 16-(2-азидофенил)изопимаровой кислоты выявлена селективная цитотоксичность ( $IS = 9$ ) в отношении клеточной линии рака молочной железы MCF7 [16]. Дополнительная более глубокая модификация с введением дипептидного фрагмента по кислотной функции или макрогетероциклизация дитерпеноида с линкерной группой в положениях С4 и С16 позволила синтезировать ингибиторы роста опухолевых клеток рака молочной железы MCF7 и рака простаты DU 145 [16]. Таким образом, синтетические превращения изопимаровой кислоты по положениям С4 и С16 представляют интерес для изучения цитотоксического воздействия на клетки и получения новых противоопухолевых агентов.

Цель настоящей работы – синтез новых производных изопимаровой кислоты, концевая карбоксильная группа в которых удалена на два метиленовых звена от трициклического остова, получение продуктов их модификации по атому С16 азидным или алкинильными заместителями, построение структурно-оригинальных макрогетероциклических соединений на их основе, а также оценка цитотоксичности новых С4-дигомоаналогов в сравнении с ранее синтезированными производными изопимаровой кислоты на моделях опухолевых клеток MCF7, U-87 MG, DU 145 и легочных фибробластов hTERT (нераковый контроль).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве метода для направленной модификации 18-нор-4-карбоксиэтил)изопимара-7,15-диенов (II) и (III) по экзоциклической терминальной двойной связи нами изучена реакция

кросс-сочетания с производными иодбензола (IVa, b), катализируемая ацетатом палладия в присутствии карбоната серебра (схема 1). В ранее предложенных условиях реакции изопимаровой кислоты (I) с иодаренами (кипячение в *трет*-бутиловом спирте в присутствии  $Pd(OAc)_2$  (0.1 экв.) и  $Ag_2CO_3$  (1 экв.)) [17, 18] соответствующие (*E*)-16-арилзамещенные производные дитерпеноидов (V) и (VIa, b) синтезированы с выходом 57–83% (после колоночной хроматографии на силикагеле), при этом полная конверсия исходного метилового эфира (II) достигалась за 8 ч (контроль ТСХ). Для полной конверсии кислоты (III) в реакции с иодаренами (IVa, b) требовалось значительное увеличение продолжительности реакции (17–21 ч). Следует отметить, что в реакции кросс-сочетания изопимаровой кислоты (I) и ее метилового эфира с иодаренами указанного различия в условиях не наблюдалось [17]. Можно предположить, что удаление карбоксильной группы от терпенового остова увеличивает ее стерическую доступность и обуславливает возможность дополнительного комплексообразования с палладием на стадии окислительного присоединения.

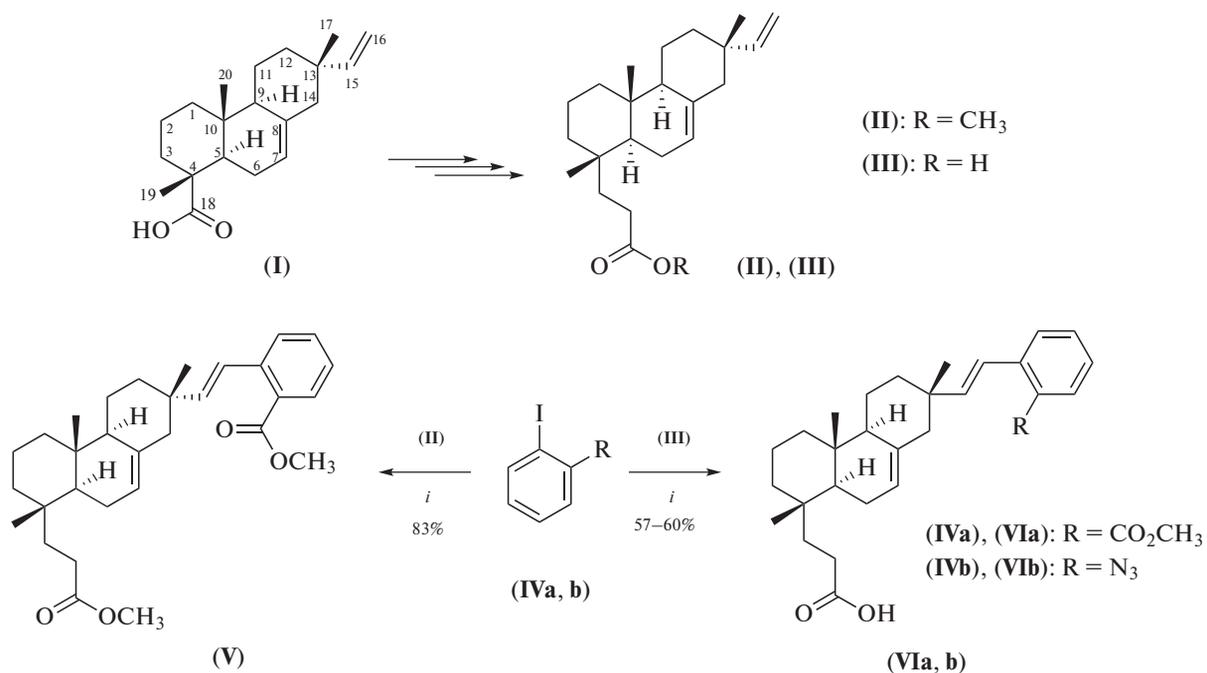
Гидролиз диэфира (V) протекал под действием LiOH в растворе THF/ $H_2O$  (1 : 1) и приводил к образованию дикислоты (VII), которую выделяли с выходом 51% после колоночной хроматографии на силикагеле (схема 2). Соединение (VII) также получали реакцией гидролиза моноэфира (VIa) при кипячении с КОН в водном метаноле (выход 57%).

Для получения *бис*(*N*-пропинил)замещенных амидов трициклического дитерпеноида (IX) исследовано взаимодействие соответствующего дихлорангидрида из соединения (VII) с гидрохлоридом пропаргиламина (VIII). Однореакторный синтез соединения (IX) включал последовательное получение дихлорангидрида действием избытка (7 экв.) хлористого оксалила в присутствии каталитического количества ДМФА и конденсацию последнего с гидрохлоридом пропаргиламина (VIII) (2.1 экв., дробное добавление, контроль ТСХ) в присутствии триэтиламина в хлористом метиле при комнатной температуре (схема 2). Выход соединения составил 72% в расчете на исходную дикислоту (VII).

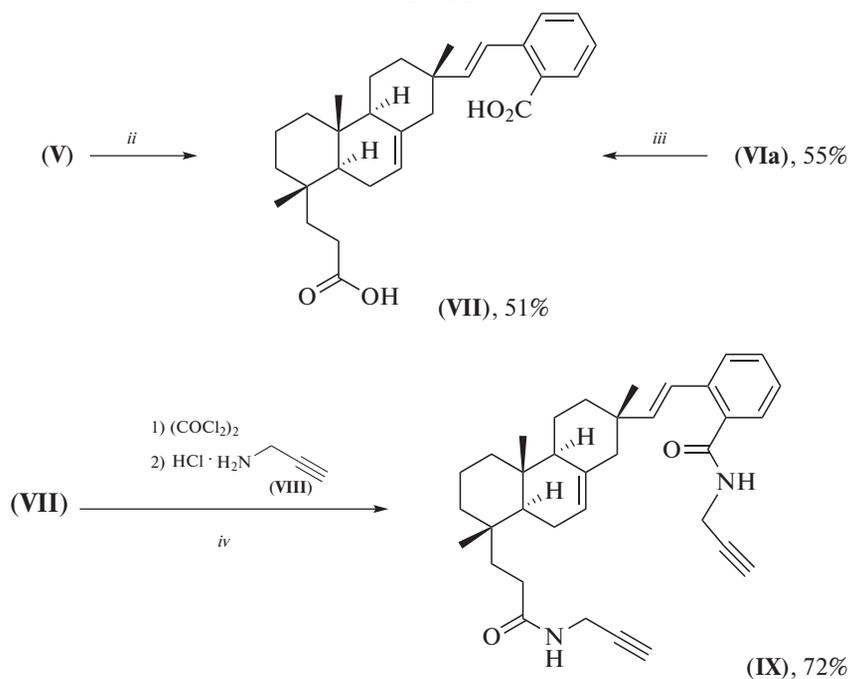
На основе азидокислоты (VIb) хлорангидридным методом синтезировали соответствующие алкинилзамещенные амидные и пептидные производные (схема 3). По вышеописанной методике *in situ* получали хлорангидрид азидокислоты, в результате взаимодействия которого с метиловым эфиром L-пропаргилглицина (XI) синтезировали амид (XII). Выход соединения после колоночной хроматографии составил 48%. Следует отметить, что однореакторный двухстадийный синтез производного азиды изопимаровой кислоты (XIII) конденсацией хлорангидрида 16-(2-азидофенил)изопимаровой кислоты (X) [16] с метиловым эфиром L-пропаргиламина (XI) протекал эффективно, выход продукта конденсации (XIII) составил 68%.

Реакцией хлорангидрида 16-(2-азидофенил)замещенной дитерпеноидной кислоты (**VIb**) с трифтораммонийной солью дипептида *N*-пропаргиламиноглицин-глицина (**XIV**) [19] в хлористом метиле

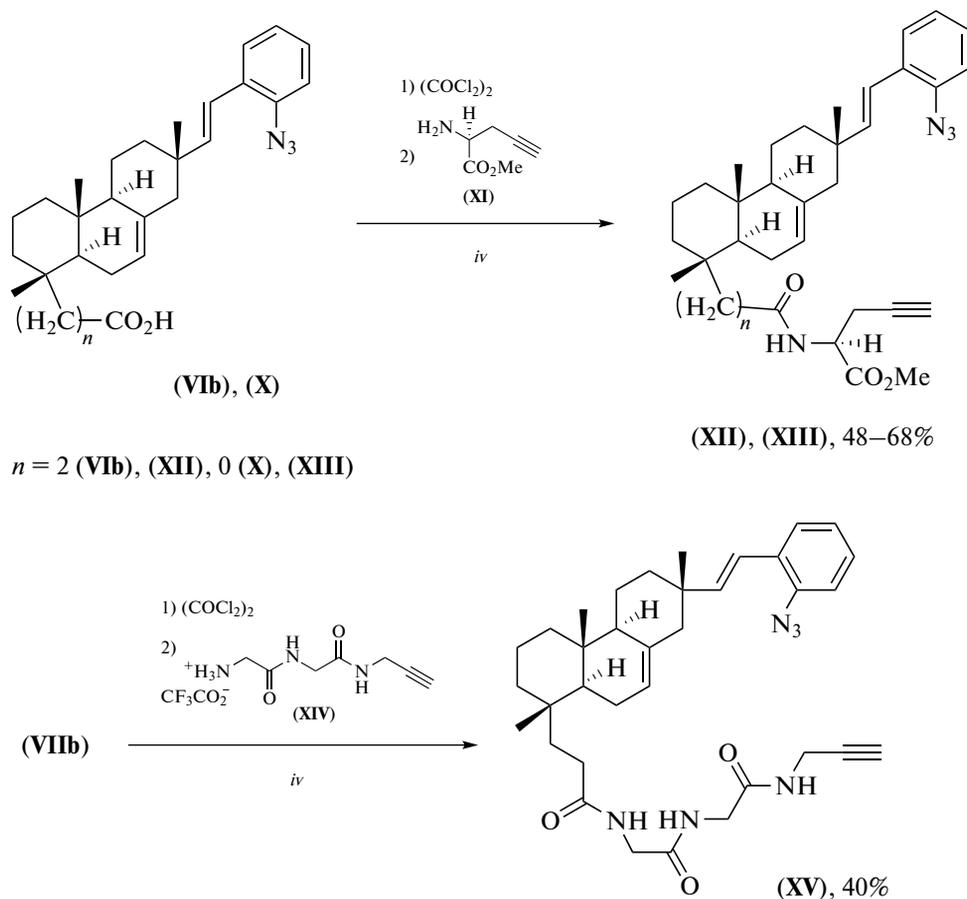
в присутствии триэтиламина синтезировали дипептидное производное (**XV**), выделенное после колоночной хроматографии с выходом 40% (на две стадии) (схема 3).



**Схема 1.** Получение (*E*)-16-арилзамещенных производных дитерпеноидов (**V**) и (**VIa, b**).  
Условия: *i* – Pd(OAc)<sub>2</sub>, Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, *t*-BuOH, 80°C.



**Схема 2.** Синтез бис(*N*-пропинил)замещенного трициклического дитерпеноида (**IX**). Условия и реагенты:  
*ii* – LiOH, ТГФ : H<sub>2</sub>O (1 : 1), комн. т., 48 ч; *iii* – KOH, MeOH–H<sub>2</sub>O, кипячение 6 ч; *iv* – *a* – (COCl)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ДМФА, 0°C, 1 ч; *b* – соединение (**VIII**), Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, комн. т., 24 ч.



**Схема 3.** Генерирование хлорангидридов трициклических дитерпеноидов и их реакции с метиловым эфиром L-пропаргилглицина (XI) и с трифторацетатной солью дипептида N-пропаргиламиноглицин-глицина (XIV). Условия: *iv* – 1)  $(\text{COCl})_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , ДМФА,  $0^\circ\text{C}$ , 1 ч; 2) соединение (XI) или (XIV),  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , комн. т., 24 ч.

Доступность синтезированных производных диалкина (IX) и азидоалкина (XV) обусловила наш интерес к получению макрогетероциклических производных на их основе. В качестве синтетического подхода использовали реакцию азидалкинового циклоприсоединения, катализируемую соединениями меди (CuAAC-реакцию). Следует отметить, что разработка методов селективного синтеза макрогетероциклов, содержащих 1,2,3-триазольный фрагмент и амидный или пептидный фрагмент в линкерной цепи, представляет значительный интерес, поскольку им отводится важная роль в биохимии и медицинской химии благодаря высокой эффективности и селективности связывания, а также большей биодоступности и клеточной проницаемости по сравнению с исходными молекулами [20].

Реакцию диалкина (IX) с 1,2-бис(2-азидоэтоксид)этаном (XVI) [21] (0.5 экв., добавление порци-

ями по 0.1 экв. через каждые 10 ч) проводили в системе растворителей  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{--H}_2\text{O}$  (20 : 1) в присутствии  $\text{CuSO}_4$  (0.4 экв.) и аскорбата натрия (2 экв.) при  $40^\circ\text{C}$  в условиях сильного разбавления (0.01 М раствор соединения (IX)). После введения в реакцию 0.5 экв. диазида (XVI) в реакционную смесь дополнительно добавляли 0.6 экв.  $\text{CuSO}_4$  и 3 экв. аскорбата натрия и нагревали при перемешивании еще 40 ч. Общее время реакции составило 90 ч (контроль ТСХ). Соединение (XVII) выделяли колоночной хроматографией на силикагеле с выходом 43% (схема 4).

Внутримолекулярную CuAAC-реакцию азидоалкина (XV) проводили в аналогичных условиях. Полная конверсия соединения (XV) наблюдалась за 80 ч (ТСХ), выход соединения (XVII) после колоночной хроматографии составил 42% (схема 4).

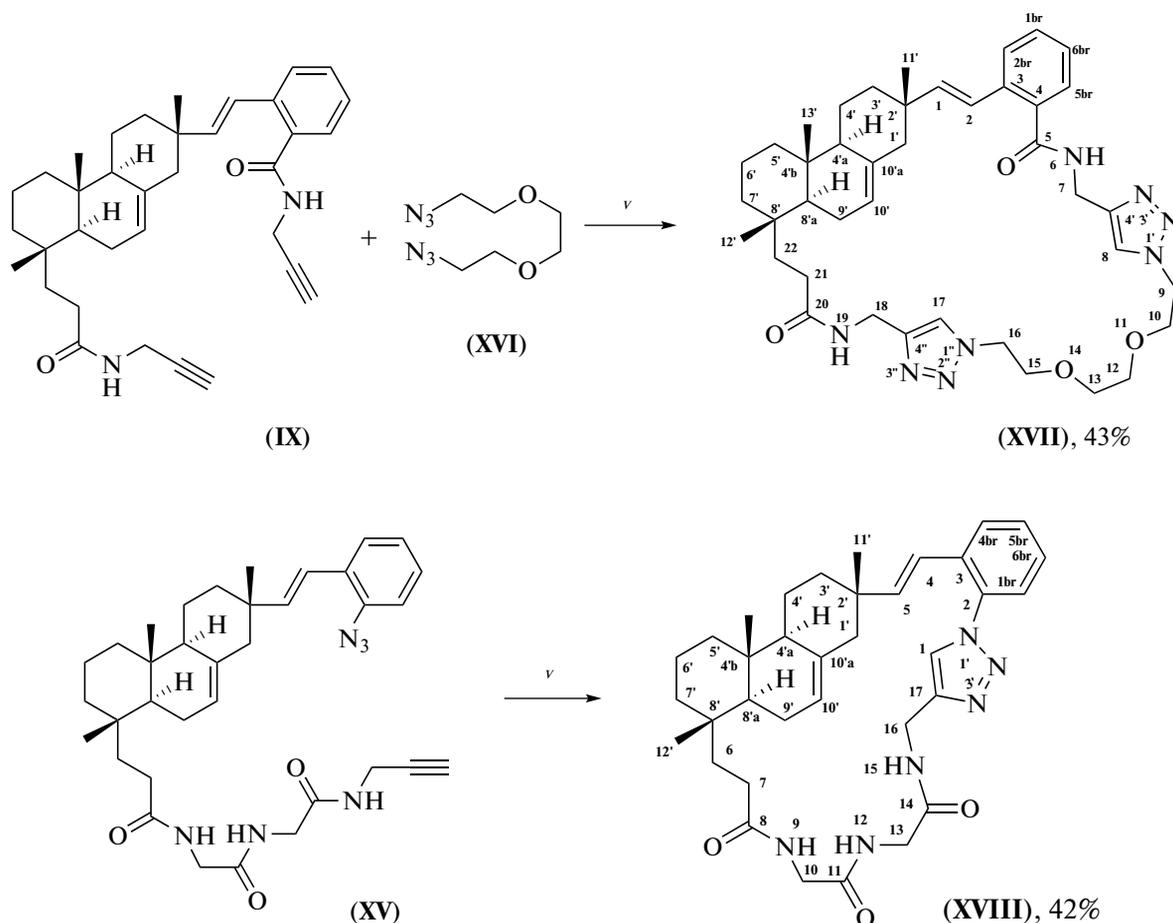


Схема 4. Диалкинил- и азидоалкинилдитерпеноиды (IX) и (XV) в CuAAC-реакции. Условия:  $\nu$  – CuSO<sub>4</sub>, NaAsc, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–H<sub>2</sub>O, 40°C.

Состав и строение новых соединений (V), (VIa), (VIb), (VII), (IX), (X), (XII), (XIII), (XV) и макрогетероциклических соединений (XVII), (XVIII) подтверждены данными элементного анализа, масс-спектров, ИК-, УФ- и ЯМР-спектров. В ИК-спектрах бис-алкина (IX) присутствуют характерные полосы поглощения (C≡C) и (≡CH) при 2119 и 3305 см<sup>-1</sup>. Характерные полосы валентных колебаний азидов (XI), (XIII) и (XV), содержащих алкинильный заместитель, – это сильные полосы концевой тройной связи (C≡C) 2068 см<sup>-1</sup> (XI), 2088 см<sup>-1</sup> (XIII), (XV), (≡CH) 3305 см<sup>-1</sup> (XI), 3307 см<sup>-1</sup> (XII), 3293 см<sup>-1</sup> (XV), а также азидогруппы (N<sub>3</sub>) при 2121 см<sup>-1</sup> (XI), (XIII) и (XV). Спектры <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-ЯМР полученных соединений полностью соответствуют их структуре. (E)-Конфигурация двойной связи всех соединений подтверждена КССВ 16.1–16.3 Гц в области 5.60–6.17 и 6.31–7.10 м.д. Строение дикислоты (VII) установлено на основании данных рентгеноструктурного анализа. Молекулярная структура соединения приведена на рис. 1. Для анализа молекулярной геометрии использовали программу PLATON

[22]. Циклогексановые кольца A и C трициклического остова молекулы находятся в конформации “кресло”, тогда как *транс*-сочлененное циклогексановое кольцо B принимает конформацию “полукресло” с отклонением атомов C5 и C10 от плоскости остальных атомов цикла, равным 0.388 и 0.441 Å соответственно. Карбоксильная группа на C2' лежит почти в плоскости фенильной группы C1'–C6', угол между ними, равный 5.2°, благоприятен для образования общей π-системы, а также слабой внутримолекулярной водородной связи C3'–H3'...O3. Напротив, *транс*-двойная связь C15=C16 развернута из плоскости фенильного кольца на 39.8°, что обуславливает образование слабой внутримолекулярной водородной связи C16–H...O4.

Цитотоксичность новых соединений была изучена в сравнении с ранее синтезированными производными изопимаровой кислоты. На рис. 2 представлены структуры производных изопимаровой кислоты (XIX) [1], (XX) [1], (XXI) [17], (XXII) [18] и макрогетероциклических соединений (XXIIIa–d) [18], которые были синтезированы CuAAC-реак-

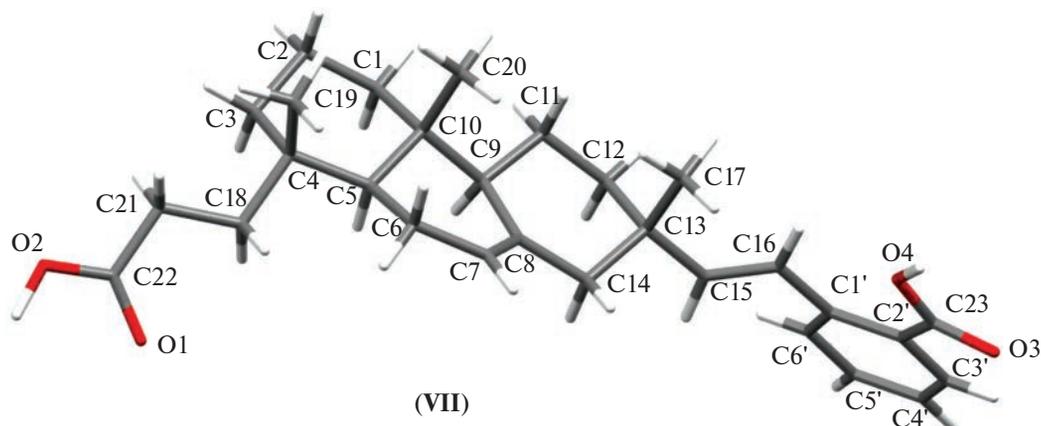


Рис. 1. Молекулярная структура и номера атомов углерода соединения (VII).

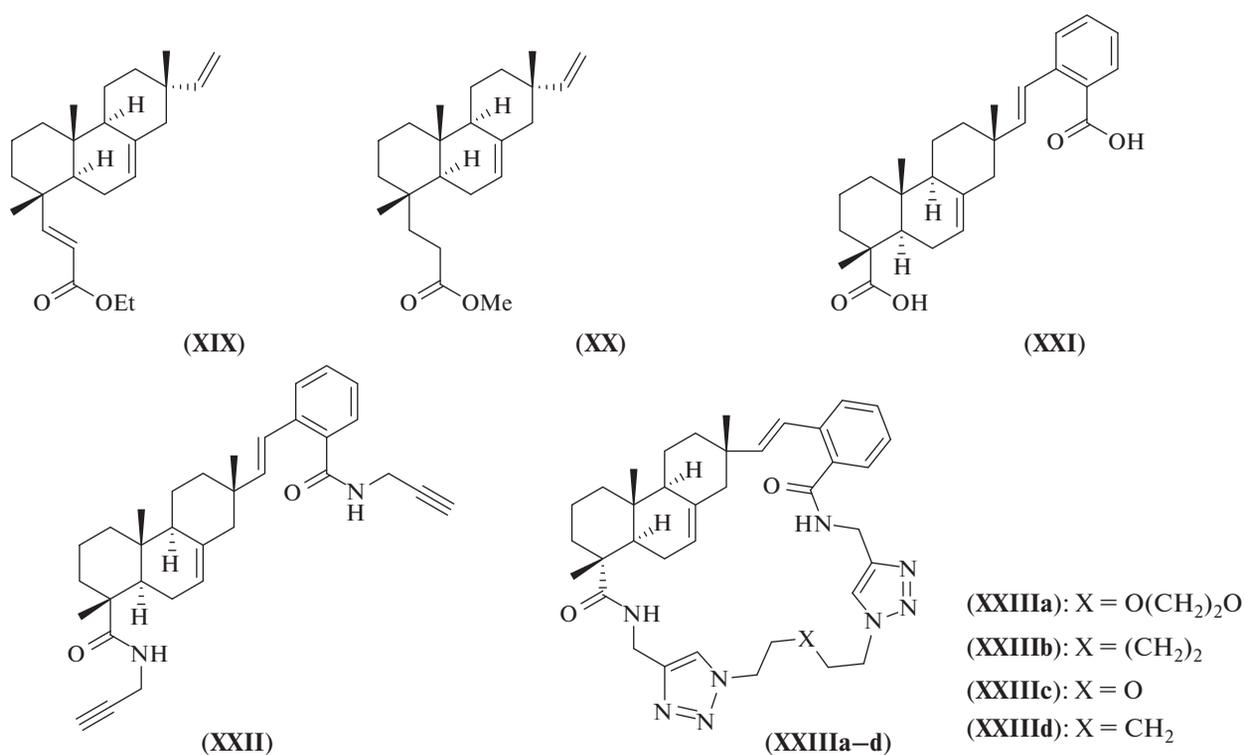


Рис. 2. Структуры производных изоимаровой кислоты (XIX–XXII) и бис(триазолил)содержащих макрогетероциклов (XXIIIa–d).

цией диалкинилпроизводного (XXII) с различными диазидами.

Экспериментальное исследование антипролиферативной активности *in vitro* производных трициклических дитерпеноидов (III), (V), (VIa), (VIb), (VII), (IX), (X), (XII), (XIII), (XV), (XIX–XXII) и макрогетероциклических соединений (XVII), (XVIII), (XXIIIa–d) проведено с использованием МТТ-теста на клетках аденокарциномы молочной железы MCF7, мультиформной глиобластомы U-87 MG и рака простаты DU 145 [23]. В качестве нера-

кового контроля использовали клетки легочных фибробластов hTERT, в качестве препарата сравнения – противоопухолевый препарат доксорубицин, проявляющий цитотоксичность в отношении широкого ряда клеток. Результаты исследования приведены в табл. 1.

Обращает внимание увеличение цитотоксичности в отношении опухолевых клеток при переходе от изоимаровой кислоты (I) и ее производных (XIII), (XXI), (XXII) к C4-модифицированным производным (III), (V), (VIa), (VIb), (VII),

**Таблица 1.** Цитотоксичность замещенных дитерпеноидов (III), (V), (VIa), (VIb), (VII), (IX), (X), (XII), (XIII), (XV), (XIX–XXII), макрогетероциклических соединений (XVII), (XVIII), (XXIIIa–d), изопимаровой кислоты (I) и доксорубина

| Соединение | Ингибирование роста клеток ( $GI_{50}$ , мкМ)* |              |                |                            |
|------------|--|--------------|----------------|----------------------------|
|            | MCF7   | U-87 MG      | DU 145         | легочные фибробласты hTERT |
| (I)        | >100   | >100         | 135.56 ± 25.76 | >100                       |
| (III)      | 38.99 ± 4.53                                   | 54.17 ± 7.02 | 66.43 ± 7.32   | >100                       |
| (V)        | 45.15 ± 6.02                                   | 37.72 ± 1.71 | 29.45 ± 4.11   | >100                       |
| (VIa)      | 33.83 ± 2.53                                   | 22.57 ± 0.97 | 44.56 ± 2.74   | 68.53 ± 7.14               |
| (VIb)      | >100   | 30.17 ± 4.45 | 44.72 ± 5.03   | >100                       |
| (VII)      | >100   | >100         | >100           | >100                       |
| (IX)       | 11.09 ± 1.17                                   | 8.08 ± 1.32  | 16.42 ± 3.05   | 28.45 ± 3.02               |
| (X)        | 10.25 ± 2.17                                   | >100         | >100           | 72.77 ± 3.47               |
| (XII)      | 27.43 ± 3.67                                   | 32.44 ± 4.59 | 36.29 ± 4.82   | >100                       |
| (XIII)     | >100   | >100         | >100           | >100                       |
| (XV)       | 34.18 ± 4.17                                   | 26.09 ± 2.48 | 28.56 ± 3.14   | 25.33 ± 1.17               |
| (XVII)     | 47.72 ± 3.74                                   | 26.76 ± 3.17 | 52.81 ± 2.15   | 34.12 ± 1.34               |
| (XVIII)    | 15.01 ± 2.12                                   | 14.15 ± 2.08 | 43.17 ± 2.96   | 24.53 ± 0.98               |
| (XIX)      | 21.52 ± 3.13                                   | 12.66 ± 1.72 | 57.13 ± 6.58   | 43.15 ± 5.08               |
| (XX)       | 48.57 ± 5.11                                   | 13.77 ± 2.24 | 55.61 ± 7.03   | 63.11 ± 4.08               |
| (XXI)      | 63.97 ± 2.19                                   | >100         | >100           | >100                       |
| (XXII)     | 31.03 ± 2.22                                   | >100         | >100           | 65.33 ± 4.11               |
| (XXIIIa)   | 6.33 ± 1.42                                    | 28.44 ± 3.16 | >100           | >100                       |
| (XXIIIb)   | 8.94 ± 0.47                                    | 18.45 ± 2.02 | 40.78 ± 5.33   | 28.15 ± 1.44               |
| (XXIIIc)   | 64.25 ± 3.12                                   | >100         | 17.33 ± 2.05   | 26.67 ± 2.03               |
| (XXIIId)   | 78.15 ± 4.51                                   | >100         | >100           | 41.08 ± 5.77               |
| Доксорубин | 3.55 ± 1.02                                    | 2.33 ± 0.57  | 4.88 ± 0.63    | 3.03 ± 0.44                |

\*  $GI_{50}$  – концентрация, при которой наблюдается 50%-ное ингибирование роста клеток при инкубировании в среде DMEM, содержащей 10% сыворотки крови эмбрионов крупного рогатого скота (Gibco, США) в течение 72 ч.

(IX), (XII), (XIX) и (XX). При этом азидокислота (X) проявила избирательную цитотоксичность в отношении клеток MCF7 ( $IS > 7$ ). В ряду макрогетероциклических производных (XVII), (XVIII), (XXIIIa–d) выделяется бис-триазольное производное (XXIIIa), которое селективно ингибировало рост опухолевых клеток MCF7 ( $IS > 15$ ) и обладало значительно меньшей токсичностью ( $GI_{50} > 100$  мкМ) в отношении неракового контроля по сравнению с макрогетероциклом (XVII). Для макрогетероциклических соединений (XVII), (XVIII) и (XXIIIb–d) наблюдалось увеличение цитотоксичности в отношении как опухолевых, так и нераковых клеток. Макрогетероциклическое производное (XVIII), синтезированное на основе дипептида (XV), обладало значительной цитотоксичностью в отношении опухолевых клеток MCF7 и U-87 MG. Все производные изопимаровой кислоты были менее токсичны для нераковых клеток, чем препарат сравнения доксорубин.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР регистрировали на спектрометрах AV-300 (рабочие частоты 300.13 ( $^1H$ ) и 75.47 МГц ( $^{13}C$ )), AV-400 (рабочие частоты 400.13 ( $^1H$ ) и 100.78 МГц ( $^{13}C$ )), DRX-500 (рабочие частоты 500.13 МГц для  $^1H$  и 125.7 МГц для  $^{13}C$ ) и AV-600 (рабочие частоты 600.30 ( $^1H$ ) и 150.96 МГц ( $^{13}C$ )) (Bruker, Германия). Мультиплетность сигналов в спектрах  $^{13}C$ -ЯМР определяли при записи спектров в режиме JMOD. При описании спектров  $^1H$ - и  $^{13}C$ -ЯМР использовали систему нумерации атомов, приведенную в макроциклах (XVII) и (XVIII). ИК-спектры регистрировали на приборе Vector-22 (Bruker, Германия) для образцов в таблетках с KBr (или в чистом виде). УФ-спектры поглощения записывали на спектрометре HP 8453 UV Vis (Hewlett-Packard, Германия) в этаноле. Масс-спектры регистрировали на спектрометре Thermo Scientific (температура испарителя 240–270°C). Температуры плавления опре-

деляли с помощью термосистемы Mettler Toledo FP900 (США). Величины удельного вращения  $[\alpha]_D^{25}$  измеряли на поляриметре PolAAG3005 в этаноле при 20–25°C. Данные рентгеноструктурного анализа для соединения (VII) получали при комнатной температуре на приборе Карра Apex II CCD (Bruker, Германия) с Mo- $K_\alpha$ -излучением ( $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$ ) и графитовым монохроматором. Продукты реакции выделяли колоночной хроматографией на силикагеле КСК 60 (0.063–0.200 мм, Merck, Германия), элюент хлороформ, хлороформ–метанол (от 100 : 1 до 25 : 1), петролейный эфир–Et<sub>2</sub>O (1 : 10 до 1 : 1). Протекание реакций контролировали методом ТСХ на пластинах Silufof UV-254 (Kavalier, Чехия) (пятна определяли с помощью облучения ультрафиолетом или опрыскиванием пластин 10%-ным водным раствором H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> с последующим нагреванием до 100°C). Изопимаровую кислоту (I) выделяли из живицы сосны сибирской *Pinus sibirica* R. Maug. (Республика Алтай) по литературной методике [24]. 1-Азидо-2-иодбензол (IVb) [25], 1,2-бис(2-азидоэтокси)этан (XVI) [26], 2-оксо-2-((2-оксо-2-(проп-2-ен-1-иламино)этил)амино)этан-1-аминиум 2,2,2-трифторацетат (XIV) [16], метиловый эфир L-пропаргилглицина (XI) [27] и 16-(2-азидофенил)изопимаровую кислоту (X) [17] получали по известным методикам.

**Общая методика синтеза соединений (V) и (VIa).** Раствор (2.48 ммоль) соединения (II) или (III), 0.64 г (2.48 ммоль) метилового эфира 2-иодбензойной кислоты, 0.06 г (0.25 ммоль) Pd(OAc)<sub>2</sub> и 0.68 г (2.48 ммоль) Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в 5 мл *t*-BuOH перемешивали при 80°C в течение 17 ч (для соединения (III)), 8 ч (для соединения (II)), контроль ТСХ. К охлажденному раствору добавляли 50 мл CHCl<sub>3</sub> и промывали водой (3 × 15 мл). Объединенный органический слой сушили над MgSO<sub>4</sub>. Растворитель упаривали, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (элюент – петролейный эфир–Et<sub>2</sub>O, от 1 : 10 до 1 : 1) с выделением соединений (V) и (VIa).

**Метиловый эфир 2-{(E)-2-[(2S,4aS,4bS,8S,8aS)-8-(3-метокси-3-оксопропил)-2,4b,8-триметил-1,2,3,4,4a,4b,5,6,7,8,8a,9-додекагидрофенантрен-2-ил]винил}-бензойной кислоты (V).** Бесцветное маслообразное вещество, 0.98 г (83%).  $[\alpha]_D^{25} = +6.04$  ( $c = 0.53$  в CHCl<sub>3</sub>). ESI-HRMS ( $m/z$ ): ( $M + H$ )<sup>+</sup> вычислено для C<sub>31</sub>H<sub>42</sub>O<sub>4</sub>: 478.3078, найдено 478.3076. ИК-спектр (пленка),  $\nu_{\max}$ , см<sup>-1</sup>: 754, 970, 1078, 1130, 1166, 1189, 1203, 1253, 1280, 1292, 1382, 1434, 1479, 1722, 1737, 2846, 2865, 2923, 2948. УФ-спектр (этанол),  $\lambda_{\max}$  (lgε), нм: 299 (3.49), 254 (4.11). <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, 298 К, δ<sub>H</sub>, м.д., *J*, Гц): 0.87 (3H, с, CH<sub>3</sub>-20), 0.89 (3H, с, CH<sub>3</sub>-19), 0.98 (3H, с, CH<sub>3</sub>-17), 1.11 (2H, м, H-1,18), 1.22 (1H, м, H-11), 1.35 (1H, д, *J* 13.4, H-12), 1.44–1.62 (9H,

м, H-18,11,2,2,6,12,3,9,3), 1.76 (1H, д, *J* 12.8, H-1), 1.85 (2H, м, H-5,6), 1.97–2.08 (2H, м, 2H-14), 2.18 (2H, т, *J* 7.8, CH<sub>2</sub>), 3.63 (3H, с, CO<sub>2</sub>Me), 3.87 (3H, с, CO<sub>2</sub>Me), 5.34 (1H, уш.с, H-7), 6.04 (1H, д, *J* 16.1, H-15), 7.10 (1H, д, *J* 16.1, H-16), 7.19 (1H, т, *J* 7.5, H-4'), 7.38 (1H, т, *J* 7.5, H-5'), 7.48 (1H, д, *J* 7.5, H-6'), 7.81 (1H, д, *J* 7.5, H-3'). <sup>13</sup>C-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, 298 К, δ<sub>C</sub>, м.д.): 15.18 (C<sup>20</sup>), 18.21 (C<sup>2</sup>), 19.92 (C<sup>11</sup>), 20.56 (C<sup>19</sup>), 21.75 (C<sup>17</sup>), 22.90 (C<sup>6</sup>), 28.43 (C<sup>18</sup>), 34.65 (C<sup>10</sup>), 35.21 (C<sup>13</sup>), 36.19 (C<sup>12</sup>), 36.63 (C<sup>3</sup>), 37.23 (CH<sub>2</sub>), 38.71 (C<sup>1</sup>), 39.26 (C<sup>4</sup>), 46.14 (C<sup>14</sup>), 47.89 (C<sup>5</sup>), 51.30 (OMe), 51.71 (OMe), 51.85 (C<sup>9</sup>), 121.39 (C<sup>7</sup>), 123.78 (C<sup>16</sup>), 126.19 (C<sup>4</sup>), 126.95 (C<sup>6</sup>), 127.89 (C<sup>2</sup>), 130.16 (C<sup>3</sup>), 131.72 (C<sup>5</sup>), 135.03 (C<sup>8</sup>), 139.88 (C<sup>1</sup>), 144.80 (C<sup>15</sup>), 167.72 (CO<sub>2</sub>Me), 174.70 (CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Me).

**3-[(1S,4aS,4bS,7S,10aS)-7-[(E)-2-(Метокси-карбонил)стирил]-1,4a,7-триметил-1,2,3,4,4a,4b,5,6,7,8,10,10a-додекагидрофенантрен-1-ил]пропановая кислота (VIa).** Бесцветное маслообразное вещество.  $[\alpha]_D^{25} = +50.21$  ( $c = 0.47$  в CHCl<sub>3</sub>). Найдено: С 77.52%, Н 8.59%. С<sub>30</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub> вычислено: С 77.55%, Н 8.68%. ИК-спектр (пленка),  $\nu_{\max}$ , см<sup>-1</sup>: 752, 968, 1076, 1128, 1164, 1189, 1207, 1253, 1278, 1294, 1382, 1432, 1448, 1479, 1704, 1722, 2819, 2846, 2863, 2923, 2948, 3062, 3428. УФ-спектр (этанол),  $\lambda_{\max}$  (lgε), нм: 299 (3.45), 254 (4.10). <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, 298 К, δ<sub>H</sub>, м.д., *J*, Гц): 0.89 (3H, с, CH<sub>3</sub>-20), 0.91 (3H, с, CH<sub>3</sub>-19), 0.91 (3H, с, CH<sub>3</sub>-17), 1.13 (3H, м, H-1,18,11), 1.35 (1H, д, *J* 12.1, H-12), 1.43–1.65 (9H, м, H-18,11,2,2,6,12,3,9,3), 1.79 (1H, д, *J* 12.1, H-1), 1.85 (2H, м, H-5,6), 2.01 (1H, д, *J* 14.1, H-14), 2.07 (1H, д, *J* 14.1, H-14), 2.24 (2H, т, *J* 8.3, CH<sub>2</sub>), 3.86 (3H, с, CO<sub>2</sub>Me), 5.35 (1H, уш.с, H-7), 6.05 (1H, д, *J* 16.1, H-15), 7.08 (1H, д, *J* 16.1, H-16), 7.21 (1H, т, *J* 7.4, H-4'), 7.40 (1H, т, *J* 7.4, H-5'), 7.50 (1H, д, *J* 7.4, H-6'), 7.81 (1H, д, *J* 7.4, H-3'). <sup>13</sup>C-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, 298 К, δ<sub>C</sub>, м.д.): 15.19 (C<sup>20</sup>), 18.23 (C<sup>2</sup>), 19.97 (C<sup>11</sup>), 20.53 (C<sup>19</sup>), 21.80 (C<sup>17</sup>), 21.99 (C<sup>6</sup>), 28.52 (C<sup>18</sup>), 34.69 (C<sup>10</sup>), 35.27 (C<sup>13</sup>), 36.24 (C<sup>12</sup>), 36.66 (C<sup>3</sup>), 37.31 (CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H), 38.52 (C<sup>1</sup>), 39.29 (C<sup>4</sup>), 46.20 (C<sup>14</sup>), 48.03 (C<sup>5</sup>), 51.77 (OMe), 51.90 (C<sup>9</sup>), 121.38 (C<sup>7</sup>), 123.83 (C<sup>16</sup>), 126.23 (C<sup>4</sup>), 127.00 (C<sup>6</sup>), 127.99 (C<sup>2</sup>), 130.19 (C<sup>3</sup>), 131.76 (C<sup>5</sup>), 135.11 (C<sup>8</sup>), 139.91 (C<sup>1</sup>), 144.88 (C<sup>15</sup>), 167.89 (CO<sub>2</sub>Me), 180.71 (CO<sub>2</sub>H).

**3-[(1S,4aS,4bS,7S,10aS)-7-((E)-2-Азидостерил)-1,4a,7-триметил-1,2,3,4,4a,4b,5,6,7,8,10,10a-додекагидрофенантрен-1-ил]пропионовая кислота (VIb).** Раствор 0.82 г (2.48 ммоль) соединения (III), 0.61 г (2.48 ммоль) 1-азидо-2-иодбензола (IVb), 0.06 г (0.25 ммоль) Pd(OAc)<sub>2</sub> и 0.68 г (2.48 ммоль) Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в 5 мл *t*-BuOH перемешивали при 80°C в течение 21 ч, контроль ТСХ. К охлажденному раствору добавляли 50 мл CHCl<sub>3</sub> и промывали водой (3 × 15 мл). Объединенный органический слой сушили над MgSO<sub>4</sub>. Растворитель упаривали, остаток хрома-

тографировали на колонке с силикагелем (элюент – петролейный эфир–Et<sub>2</sub>O, от 1 : 10 до 1 : 1), выделяли соединение (VIb). Коричневый порошок. Т. пл. 109.9°C.  $[\alpha]_D^{25} = +9.50$  ( $c = 0.40$  в CHCl<sub>3</sub>). HRMS (EI),  $m/z$ : ( $M + H$ )<sup>+</sup> вычислено для C<sub>28</sub>H<sub>37</sub>O<sub>2</sub>N (C<sub>28</sub>H<sub>37</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>-N<sub>2</sub>): 419.2819, найдено 419.2816. ИК-спектр (KBr),  $\nu_{\max}$ , см<sup>-1</sup>: 748, 970, 1201, 1218, 1228, 1290, 1382, 1413, 1425, 1448, 1484, 1706, 2088, 2121, 2431, 2848, 2865, 2923. УФ-спектр (этанол),  $\lambda_{\max}$  (lgε), нм: 263 (4.26). <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, 298 К, δ<sub>H</sub>, м.д., J, Гц): 0.90 (3H, с, CH<sub>3</sub>-17), 0.93 (3H, с, CH<sub>3</sub>-19), 0.96 (3H, с, CH<sub>3</sub>-20), 1.14 (2H, м, H-1,18), 1.24 (1H, м, H-11), 1.36 (2H, м, H-12,11), 1.42, 1.47, 1.56, 1.65 (9H, м, H-2,2,6,12,18,3,9,3,1), 1.82 (1H, д, J 12.7, H-5), 1.88 (1H, д, J 4.5, H-6), 1.90 (1H, д, J 13.7, H-14), 2.05 (1H, д, J 13.7, H-14), 2.26 (2H, т, J 8.4, CH<sub>2</sub>), 5.36 (1H, с, H-7), 6.17 (1H, д, J 16.2, H-15), 6.53 (1H, д, J 16.2, H-16), 7.06 (1H, т, J 7.9, H-4'), 7.08 (1H, д, J 7.9, H-3'), 7.22 (1H, д, J 7.9, H-5'), 7.47 (1H, д, J 7.9, H-6'). <sup>13</sup>C-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, 298 К, δ<sub>C</sub>, м.д.): 15.26 (C<sup>20</sup>), 17.27 (C<sup>2</sup>), 19.36 (C<sup>11</sup>), 20.61 (C<sup>19</sup>), 21.74 (C<sup>17</sup>), 22.99 (C<sup>6</sup>), 28.56 (C<sup>18</sup>), 34.74 (C<sup>10</sup>), 35.32 (C<sup>12</sup>), 36.27 (C<sup>13</sup>), 36.76 (C<sup>3</sup>), 37.33 (CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H), 38.51 (C<sup>4</sup>), 39.33 (C<sup>1</sup>), 46.21 (C<sup>14</sup>), 48.01 (C<sup>5</sup>), 51.91 (C<sup>9</sup>), 118.22 (C<sup>6</sup>), 119.12 (C<sup>4</sup>), 121.47 (C<sup>7</sup>), 124.61 (C<sup>16</sup>), 126.66 (C<sup>3</sup>), 127.78 (C<sup>5</sup>), 129.70 (C<sup>2</sup>), 135.08 (C<sup>8</sup>), 136.52 (C<sup>1</sup>), 144.18 (C<sup>15</sup>), 181.04 (CO<sub>2</sub>H).

**2-((E)-2-((2S,4aS,4bS,8S,8aS)-8-(2-Карбоэтил)-2,4b,8-триметил-1,2,3,4,4a,4b,5,6,7,8,8a,9-додекагидрофенантрен-2-ил)винил)бензойная кислота (VII).**

**Метод 1.** К раствору 0.46 г (0.97 ммоль) соединения (V) в системе 9 мл ТГФ/Н<sub>2</sub>O добавляли 0.14 г (5.82 ммоль) LiOH. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 48 ч до полной конверсии (контроль <sup>1</sup>H-ЯМР). Далее по каплям добавляли HCl до pH 2.0, затем 50 мл EtOAc и промывали водой (3 × 15 мл). Органический слой сушили над MgSO<sub>4</sub>. Растворитель упаривали, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (элюент – CHCl<sub>3</sub>–MeOH, от 100 : 1 до 10 : 1) с выделением продукта (VII) (0.37 г, 51%).

**Метод 2.** К раствору 0.76 г (1.63 ммоль) соединения (VIa) в 8 мл MeOH добавляли 4 мл KOH (1 M). Реакционную смесь кипятили 6 ч до полной конверсии (контроль ТСХ). К охлажденному раствору добавляли HCl до pH 2.0, образующийся белый осадок отфильтровали, промывали водой и сушили на воздухе. Осадок хроматографировали (элюент – CHCl<sub>3</sub>–MeOH, 1 : 1), последовательно элюировали соединениями (VIa) (0.10 г, 14%) и (VII) (0.40 г, 55%). Получили соединение (VII), белые кристаллы. Т. пл. 221.9–225.5°C.  $[\alpha]_D^{25} = +15.52$  ( $c = 0.67$  в CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 1 : 1). ESI-HRMS,  $m/z$ : ( $M + H$ )<sup>+</sup> вычислено для C<sub>29</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>: 450.2765, най-

дено 450.2763. ИК-спектр (KBr),  $\nu_{\max}$ , см<sup>-1</sup>: 752, 968, 1230, 1243, 1267, 1276, 1299, 1388, 1423, 1440, 1454, 1695, 2807, 2821, 2846, 2867, 2921, 2952, 2964, 2996, 3060, 3077, 3405. УФ-спектр (этанол),  $\lambda_{\max}$  (lgε), нм: 297 (3.39), 255 (4.13). <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub> + CD<sub>3</sub>OD, 298 К, δ<sub>H</sub>, м.д., J, Гц): 0.67 (3H, с, CH<sub>3</sub>-20), 0.69 (3H, с, CH<sub>3</sub>-19), 0.73 (3H, с, CH<sub>3</sub>-17), 0.91 (3H, м, H-1,18,11), 1.00 (2H, м, H-12,11), 1.11, 1.20, 1.23, 1.26, 1.33, 1.42 (8H, все м, H-2,2,6,12,3,3,1,9), 1.57 (1H, уш.д, J 12.6, H-5), 1.92 (2H, м, H-6,18), 1.77 (1H, д, J 13.8, H-14), 1.82 (1H, д, J 13.8, H-14), 1.95 (2H, т, J 8.4, CH<sub>2</sub>), 5.11 (1H, уш.с, H-7), 5.84 (1H, д, J 16.1, H-15), 6.87 (1H, д, J 16.1, H-16), 6.98 (1H, т, J 7.8, H-4'), 7.17 (1H, т, J 7.8, H-5'), 7.27 (1H, д, J 7.8, H-6'), 7.59 (1H, д, J 7.8, H-3'). <sup>13</sup>C-ЯМР (CDCl<sub>3</sub> + CD<sub>3</sub>OD, 298 К, δ<sub>C</sub>, м.д.): 14.64 (C<sup>20</sup>), 17.80 (C<sup>2</sup>), 19.55 (C<sup>11</sup>), 19.98 (C<sup>19</sup>), 21.07 (C<sup>17</sup>), 22.51 (C<sup>6</sup>), 28.09 (C<sup>18</sup>), 34.35 (C<sup>10</sup>), 34.86 (C<sup>13</sup>), 35.82 (C<sup>12</sup>), 36.22 (C<sup>3</sup>), 36.89 (CH<sub>2</sub>), 38.48 (C<sup>1</sup>), 38.92 (C<sup>4</sup>), 45.76 (C<sup>14</sup>), 47.66 (C<sup>5</sup>), 51.57 (C<sup>9</sup>), 120.96 (C<sup>7</sup>), 123.38 (C<sup>16</sup>), 125.79 (C<sup>4</sup>), 126.34 (C<sup>6</sup>), 128.45 (C<sup>2</sup>), 129.80 (C<sup>3</sup>), 131.21 (C<sup>5</sup>), 134.75 (C<sup>8</sup>), 139.19 (C<sup>1</sup>), 144.17 (C<sup>15</sup>), 169.95 (CO<sub>2</sub>H), 176.99 (CO<sub>2</sub>H).

**Кристаллографические данные для соединения (VII):** C<sub>29</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>,  $M$  450.59, кристаллы моноклинные,  $P2_1$ ,  $a$  11.955(2),  $b$  6.3127(6),  $c$  16.588(2) Å,  $\beta$  95.999(4)°,  $V$  1245.0(2) Å<sup>3</sup>,  $Z$  2,  $D_{\text{calcd}}$  1.202 г/см<sup>3</sup>,  $\mu(\text{Mo-K}\alpha)$  0.078 мм<sup>-1</sup>,  $F(000)$  488, ( $\theta$  2.21°–25.1°, полнота ( $\theta$  50°) 99.5%), бесцветные, размер 0.90 × 0.16 × 0.05 мм<sup>3</sup>, пропускание 0.805–0.8619, 25391 измеренных отражений в диапазоне показателей  $-14 \leq h \leq 14$ ,  $-7 \leq k \leq 7$ ,  $-19 \leq l \leq 19$ , 4416 независимых ( $R_{\text{инт}} = 0.037$ ), 309 параметров, 3 ограничения,  $R_1 = 0.0391$  (для 3549 наблюдаемых  $I > 2\sigma(I)$ ),  $wR_2 = 0.1006$  (все данные).

Данные рентгеноструктурного анализа получали при комнатной температуре на CCD-дифрактометре Карра Apex II (Bruker, Германия) с Mo-K<sub>α</sub>-излучением ( $\lambda = 0.71073$  Å) и графитовым монохроматором. Поглощение корректировали эмпирически по программе SADABS-2016 [28]. Структуру соединения расшифровывали прямым методом по программе SHELXT-2014/5 [29] и уточняли полноматричным методом наименьших квадратов по всем F<sub>2</sub> в анизотропном приближении (у атомов H) с использованием комплекса программ SHELXL-2018/3. Позиции водородов рассчитывали геометрически, параметры атомов водорода уточняли в изотропном приближении в модели наездника. Атомные координаты, длины связей и углы для соединения (VII) депонированы в Кембриджскую базу структурных данных под номером CCDC 2202328. Данные в свободном доступе представлены на сайте: <http://www.ccdc.cam.ac.uk/cgi-bin/catreq.cgi>.

***N*-(Проп-2-ин-1-ил)-2-*[(E)*-2-*[(2S,4aS,4bS,8S,8aS)*-2,4*b*,8-триметил-8-(3-оксо-3-(проп-2-ин-1-иламино)пропил)-1,2,3,4,4*a*,4*b*,5,6,7,8,8*a*,9-додекагидрофенантрен-2-ил]винил]бензамид (IX).** К раствору 0.53 г (1.18 ммоль) соединения (VII) в 10 мл безводного хлористого метилена в токе аргона при охлаждении льдом и интенсивном перемешивании в течение 15 мин добавляли 0.70 мл (8.26 ммоль) хлористого оксалила в 10 мл хлористого метилена и каталитическое количество ДМФА (две капли). Температуру реакционной смеси поднимали до комнатной, перемешивали 1 ч. Растворитель отгоняли в вакууме, к остатку добавляли 10 мл хлористого метилена и снова удаляли растворитель. Эту процедуру повторяли 4 раза. В остатке получили хлорангидрид дикислоты (VII), который использовали далее без очистки. К раствору соединения (VII) в 15 мл безводного хлористого метилена в токе аргона добавляли 0.89 мл (5.90 ммоль) триэтиламина, затем постепенно добавляли 0.24 г (2.60 ммоль) гидрохлорида пропаргиламина. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч (контроль <sup>1</sup>H-ЯМР). Растворитель удаляли в вакууме, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (элюент – CHCl<sub>3</sub>–MeOH, от 100 : 1 до 10 : 1), выделили соединение (IX) (0.45 г, 72%). Бесцветное маслообразное вещество.  $[\alpha]_D^{25} = +5.47$  ( $c = 1.17$  в CHCl<sub>3</sub>). ESI-HRMS ( $m/z$ ): ( $M + H$ )<sup>+</sup> вычислено для C<sub>35</sub>H<sub>44</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>: 524.3397, найдено 524.3399. ИК-спектр (пленка),  $\nu_{\max}$ , см<sup>-1</sup>: 644, 665, 754, 1214, 1263, 1295, 1382, 1448, 1469, 1527, 1646, 1722, 2121, 2852, 2923, 3305, 3419. УФ-спектр (этанол),  $\lambda_{\max}$  (lgε), нм: 253 (3.99). <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, 298 К,  $\delta_H$ , м.д.,  $J$ , Гц): 0.82 (6H, с, CH<sub>3</sub>-17,20), 0.89 (3H, с, CH<sub>3</sub>-19), 1.04 (3H, м, H-1,18,11), 1.23, 1.28, 1.37, 1.49, 1.56 (10H, все м, H-12,11,2,2,6,12,18,3,3,1), 1.80 (3H, м, H-6,5,9), 1.98, 2.01 (4H, оба м, CH<sub>2</sub>, H-14,14), 2.12 (1H, с, C≡CH), 2.20 (1H, с, C≡CH), 3.88 (2H, м, CH<sub>2</sub>C≡CH), 4.11 (1H, д,  $J$  4.9, CH<sub>2</sub>C≡CH), 4.13 (1H, д,  $J$  4.9, CH<sub>2</sub>C≡CH), 5.27 (1H, уш.с, H-7), 6.05 (1H, д,  $J$  16.1, H-15), 6.55 (2H, д,  $J$  16.1, H-16, NH), 6.63 (1H, т,  $J$  4.9, NH), 7.13 (1H, т,  $J$  7.5, H-6'), 7.27 (1H, т,  $J$  7.5, H-4'), 7.38 (2H, т,  $J$  7.5, H-3',5'). <sup>13</sup>C-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, 298 К,  $\delta_C$ , м.д.): 15.27 (C<sup>20</sup>), 18.31 (C<sup>2</sup>), 19.97 (C<sup>11</sup>), 20.79 (C<sup>19</sup>), 21.77 (C<sup>17</sup>), 23.02 (C<sup>6</sup>), 29.08 (C<sup>18</sup>), 29.52 (CH<sub>2</sub>C≡CH), 30.69 (CH<sub>2</sub>C≡CH), 34.87 (C<sup>10</sup>), 35.34 (C<sup>13</sup>), 36.24 (C<sup>12</sup>), 36.85 (C<sup>3</sup>), 37.45 (CH<sub>2</sub>), 39.37 (C<sup>1</sup>), 39.40 (C<sup>5</sup>), 46.12 (C<sup>14</sup>), 48.03 (C<sup>4</sup>), 51.96 (C<sup>9</sup>), 71.45, 71.90 (2C≡CH), 79.21, 79.52 (2C≡CH), 121.67 (C<sup>7</sup>), 122.55 (C<sup>16</sup>), 126.63 (C<sup>3</sup>), 126.82 (C<sup>4</sup>), 127.81 (C<sup>6</sup>), 130.37 (C<sup>5</sup>), 133.72 (C<sup>2</sup>), 134.95 (C<sup>8</sup>), 136.27 (C<sup>1</sup>), 145.95 (C<sup>15</sup>), 168.82 (CON), 173.20 (CON).

**Общая методика синтеза (XII) и (XIII).** К раствору (1.19 ммоль) соединения (VIb) или (X) в

10 мл безводного хлористого метилена в токе аргона при охлаждении льдом и интенсивном перемешивании в течение 15 мин добавляли 0.20 мл (2.38 ммоль) хлористого оксалила в 10 мл хлористого метилена и каталитическое количество ДМФА (две капли). Температуру реакционной смеси поднимали до комнатной, перемешивали в течение 4 ч. Растворитель отгоняли в вакууме, к остатку добавляли 10 мл хлористого метилена и снова удаляли растворитель. Эту процедуру повторяли 4 раза. В остатке получили соответствующие хлорангидриды кислот, которые использовали далее без очистки. К раствору хлорангидрида кислоты (VIb) или (X) в 15 мл безводного хлористого метилена в токе аргона добавляли одной порцией 0.33 мл (2.38 ммоль) триэтиламина, затем постепенно добавляли 0.17 г (1.31 ммоль) (XI). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 24 ч (контроль <sup>1</sup>H-ЯМР). Растворитель удаляли в вакууме, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (элюент CHCl<sub>3</sub>–MeOH, от 100 : 1 до 10 : 1), выделили соединение (XI) или (XIII).

**Метилевый эфир 2-*[(1S,4aS,4bS,7S,10aS)*-7-*[(E)*-2-азидостерил]-1,4*a*,7-триметил-1,2,3,4,4*a*,4*b*,5,6,7,8,10,10*a*-додекагидрофенантрен-1-ил]пропанамид}пент-4-ин карбоновой кислоты (XI).** Бесцветное маслообразное вещество, 0.32 г, 48%.

$[\alpha]_D^{25} = +35.79$  ( $c = 0.57$  в CHCl<sub>3</sub>). HRMS (EI),  $m/z$ : ( $M + H$ )<sup>+</sup> вычислено для C<sub>34</sub>H<sub>44</sub>O<sub>3</sub>N<sub>4</sub>: 556.3408, найдено 556.3401. ИК-спектр (пленка),  $\nu_{\max}$ , см<sup>-1</sup>: 754, 973, 1180, 1216, 1288, 1344, 1363, 1382, 1446, 1484, 1506, 1662, 1743, 2088, 2121, 2848, 2865, 923, 2952, 3307. УФ-спектр (этанол),  $\lambda_{\max}$  (lgε), нм: 242 (4.29), 264 (4.23). <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, 298 К,  $\delta_H$ , м.д.,  $J$ , Гц): 0.90 (3H, с, CH<sub>3</sub>-17), 0.93 (3H, с, CH<sub>3</sub>-19), 0.96 (3H, с, CH<sub>3</sub>-20), 1.14 (2H, м, H-1,18), 1.24 (1H, м, H-11), 1.36–1.66 (11H, м, H-12,11,2,2,6,12,18,3,9,3,1), 1.82 (1H, д,  $J$  12.2, H-5), 1.88 (2H, м, H-6,14), 2.01 (1H, м, H-14), 2.16 (2H, т,  $J$  8.4, CH<sub>2</sub>), 2.25 (1H, т,  $J$  8.4, C≡CH), 2.75 (2H, м, CH<sub>2</sub>C≡CH), 3.77 (3H, с, CO<sub>2</sub>Me), 4.72 (1H, м, CH), 5.36 (1H, с, H-7), 6.17 (1H, д,  $J$  16.3, H-15), 6.24 (1H, д,  $J$  7.7, NH), 6.52 (1H, д,  $J$  16.3, H-16), 7.05 (1H, т,  $J$  7.6, H-4'), 7.09 (1H, дд,  $J$  7.6, 1.0, H-3'), 7.20 (1H, дд,  $J$  7.6, 1.0, H-5'), 7.46 (1H, д,  $J$  7.6, H-6'). <sup>13</sup>C-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, 298 К,  $\delta_C$ , м.д.): 15.30 (C<sup>20</sup>), 18.34 (C<sup>2</sup>), 20.03 (C<sup>11</sup>), 20.86 (C<sup>19</sup>), 21.78 (C<sup>17</sup>), 22.36 (CH<sub>2</sub>C≡CH), 23.04 (C<sup>6</sup>), 30.79 (C<sup>18</sup>), 34.92 (C<sup>10</sup>), 35.36 (C<sup>12</sup>), 36.32 (C<sup>13</sup>), 36.79 (C<sup>3</sup>), 37.49 (CH<sub>2</sub>), 39.29 (C<sup>4</sup>), 39.40 (C<sup>1</sup>), 46.24 (C<sup>14</sup>), 47.95 (C<sup>5</sup>), 50.34 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 51.97 (C<sup>9</sup>), 52.72 (CH), 71.47 (C≡CH), 78.39 (C≡CH), 118.26 (C<sup>6</sup>), 119.14 (C<sup>4</sup>), 121.61 (C<sup>7</sup>), 124.65 (C<sup>16</sup>), 126.17 (C<sup>3</sup>), 127.81 (C<sup>5</sup>), 129.76 (C<sup>2</sup>), 135.10 (C<sup>8</sup>), 136.57 (C<sup>1</sup>), 144.27 (C<sup>15</sup>), 170.91 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 181.04 (CONH).

**Метилловый эфир 2-[(1*R*,4*aR*,4*bS*,7*S*,10*aR*)-7-(*E*)-2-азидостирил]-1,4*a*,7-триметил-1,2,3,4,4*a*,4*b*,5,6,7,8,10,10*a*-додекагидрофенантрен-1-карбоксамидо]пент-4-ин карбоновой кислоты (XIII).** Коричневое масло, 0.43 г, 68%.  $[\alpha]_D^{25} = +50.00$  ( $c = 0.50$  в  $\text{CHCl}_3$ ). HRMS (EI),  $m/z$ : ( $M + H$ )<sup>+</sup> вычислено для  $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{O}_3\text{N}_4$ : 528.3095, найдено 528.3098. ИК-спектр (пленка),  $\nu_{\text{max}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ : 663, 754, 968, 1159, 1180, 1218, 1286, 1349, 1384, 1440, 1506, 1654, 2088, 2121, 2848, 2867, 2923, 2950, 3307, 3448. УФ-спектр (этанол),  $\lambda_{\text{max}}$  (lg $\epsilon$ ), нм: 241 (4.28), 264 (4.21).

<sup>1</sup>H-ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 298 К,  $\delta_{\text{H}}$ , м.д.,  $J$ , Гц): 0.91 (3H, с,  $\text{CH}_3$ -17), 0.94 (3H, с,  $\text{CH}_3$ -19), 1.18 (1H, м, H-1), 1.22 (1H, м, H-11), 1.32 (3H, с,  $\text{CH}_3$ -20), 1.39 (2H, м, H-12,11), 1.53 (8H, уш.м, H-2,2,6,12,3,9,3,1), 1.70 (1H, дд,  $J$  11.6, 4.9, H-5), 1.76–1.86 (2H, м, H-6,14), 1.90 (1H, м, H-14), 2.01 (1H, т,  $J$  2.7,  $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 2.73 (1H, ддд,  $J$  17.0, 4.3, 2.7,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 2.80 (1H, ддд,  $J$  17.0, 4.9, 2.7,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 3.76 (3H, с,  $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 4.67 (1H, м, CH), 5.30 (1H, д,  $J$  4.5, H-7), 6.14 (1H, д,  $J$  16.2, H-15), 6.50 (1H, д,  $J$  16.2, H-16), 6.61 (1H, д,  $J$  7.4, NH), 7.03 (1H, т,  $J$  7.5, H-4'), 7.07 (1H, д,  $J$  7.5, H-3'), 7.20 (1H, т,  $J$  7.8, H-5'), 7.45 (1H, д,  $J$  7.8, H-6'). <sup>13</sup>C-ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 298 К,  $\delta_{\text{C}}$ , м.д.): 15.23 ( $\text{C}^{20}$ ), 17.05 ( $\text{C}^{19}$ ), 17.90 ( $\text{C}^2$ ), 19.76 ( $\text{C}^{11}$ ), 21.69 ( $\text{C}^{17}$ ), 21.92 ( $\text{C}^6$ ), 24.57 ( $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 34.95 ( $\text{C}^{10}$ ), 36.17 ( $\text{C}^{12}$ ), 36.67 ( $\text{C}^{13}$ ), 36.78 ( $\text{C}^3$ ), 38.56 ( $\text{C}^1$ ), 45.44 ( $\text{C}^5$ ), 46.16 ( $\text{C}^{14}$ ), 50.70 ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 51.74 ( $\text{C}^9$ ), 52.59 (CH), 60.42 ( $\text{C}^4$ ), 71.35 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 78.43 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 118.18 ( $\text{C}^6$ ), 119.15 ( $\text{C}^4$ ), 121.03 ( $\text{C}^7$ ), 124.59 ( $\text{C}^{16}$ ), 126.12 ( $\text{C}^3$ ), 127.76 ( $\text{C}^5$ ), 129.66 ( $\text{C}^2$ ), 135.11 ( $\text{C}^8$ ), 136.49 ( $\text{C}^1$ ), 144.08 ( $\text{C}^{15}$ ), 170.97 ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 178.16 ( $\text{C}^{18}$ ).

**3-[(1*S*,4*aS*,4*bS*,7*S*,10*aS*)-7-(*E*)-2-азидостирил]-1,4*a*,7-триметил-1,2,3,4,4*a*,4*b*,5,6,7,8,10,10*a*-додекагидрофенантрен-1-ил)-*N*-(2-оксо-2-((2-оксо-2-проп-2-ин-1-иламино)этил)амино)этил]пропанамид (XV).** К раствору 0.53 г (1.19 ммоль) соединения (VIIb) в 10 мл безводного хлористого метилена в токе аргона при охлаждении льдом и интенсивном перемешивании в течение 15 мин добавили 0.20 мл (2.38 ммоль) хлористого оксалила в 10 мл хлористого метилена и каталитическое количество ДМФА (две капли). Температуру реакционной смеси поднимали до комнатной, перемешивали в течение 4 ч. Растворитель отгоняли в вакууме, к остатку добавляли 10 мл хлористого метилена и снова удаляли растворитель. Эту процедуру повторяли 4 раза. В остатке получили хлорангидрид дикислоты (VIIb), который использовали далее без очистки. К раствору соединения (VIIb) в 15 мл безводного хлористого метилена в токе аргона добавляли одной порцией 0.33 мл (2.38 ммоль) триэтиламина, затем постепенно добавляли 0.37 г (1.31 ммоль) соединения (XIV). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч (контроль <sup>1</sup>H-ЯМР). Растворитель

удаляли в вакууме, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (элюент  $\text{CHCl}_3$ –MeOH, от 100 : 1 до 10 : 1), выделили соединение (XV) (0.28 г, 40%). Коричневый порошок. Т. пл. 150.2°C.

$[\alpha]_D^{25} = +6.00$  ( $c = 0.50$  в  $\text{CHCl}_3$ ). ESI-HRMS,  $m/z$ : ( $M + H$ )<sup>+</sup> вычислено для  $\text{C}_{35}\text{H}_{46}\text{O}_3\text{N}_6$ : 598.3626, найдено 598.3622. ИК-спектр (KBr),  $\nu_{\text{max}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ : 665, 750, 1253, 1286, 1336, 1365, 1380, 1446, 1484, 1523, 1631, 1693, 2088, 2121, 2848, 2861, 2921, 3293. УФ-спектр (этанол),  $\lambda_{\text{max}}$  (lg $\epsilon$ ), нм: 226 (4.12), 242 (4.19), 263 (4.14), 305 (3.15). <sup>1</sup>H-ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 298 К,  $\delta_{\text{H}}$ , м.д.,  $J$ , Гц): 0.79 (3H, с,  $\text{CH}_3$ -17), 0.81 (3H, с,  $\text{CH}_3$ -19), 0.84 (3H, с,  $\text{CH}_3$ -20), 1.00–1.09 (3H, м, H-1,11,18), 1.24–1.53 (10H, м, H-12,11,2,2,6,12,3,9,3,18), 1.70 (1H, уш.д,  $J$  12.8, H-1), 1.77 (2H, м, H-5,6), 1.88, 1.91 (2H, оба м, H-14,14), 2.04 (2H, т,  $J$  8.5,  $\text{CH}_2$ ), 2.13 (1H, т,  $J$  2.4,  $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 3.72, 3.75, 3.85, 3.92 (9H, все м, 2H-5",8",2", 3NH), 5.24 (1H, уш.с, H-7), 6.04 (1H, д,  $J$  16.3, H-15), 6.40 (1H, д,  $J$  16.3, H-16), 6.93 (1H, д,  $J$  7.8, H-3'), 6.97 (1H, д,  $J$  7.8, H-4'), 7.10 (1H, м, H-5'), 7.34 (1H, д,  $J$  7.8, H-6'). <sup>13</sup>C-ЯМР ( $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ , 298 К,  $\delta_{\text{C}}$ , м.д.): 14.97 ( $\text{C}^{20}$ ), 18.05 ( $\text{C}^2$ ), 19.73 ( $\text{C}^{11}$ ), 20.29 ( $\text{C}^{19}$ ), 21.43 ( $\text{C}^{17}$ ), 22.70 ( $\text{C}^6$ ), 28.44 ( $\text{C}^{8''}$ ), 30.10 ( $\text{C}^{18}$ ), 34.56 ( $\text{C}^{10}$ ), 35.08 ( $\text{CH}_2$ ), 36.00 ( $\text{C}^{13}$ ), 36.49 ( $\text{C}^{12}$ ), 37.15 ( $\text{C}^3$ ), 39.11 ( $\text{C}^1$ ), 39.31 ( $\text{C}^4$ ), 42.00 ( $\text{C}^{5''}$ ), 42.52 ( $\text{C}^{2''}$ ), 45.96 ( $\text{C}^{14}$ ), 47.95 ( $\text{C}^5$ ), 51.72 ( $\text{C}^9$ ), 70.84 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 78.77 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 117.95 ( $\text{C}^6$ ), 118.86 ( $\text{C}^4$ ), 121.25 ( $\text{C}^7$ ), 124.41 ( $\text{C}^{16}$ ), 125.87 ( $\text{C}^3$ ), 127.58 ( $\text{C}^5$ ), 129.41 ( $\text{C}^2$ ), 134.87 ( $\text{C}^8$ ), 136.24 ( $\text{C}^1$ ), 143.89 ( $\text{C}^{15}$ ), 169.01 ( $\text{C}^{6''}$ ), 170.12 ( $\text{C}^{3''}$ ), 175.69 (CON).

**(2'*S*,4'*aS*,4'*bR*,8'*R*,8'*aR*)-2',4'*b*,8'-Триметил-1',2',3',4',4'*a*,4'*b*,5',6',7',8',8'*a*,9'-додекагидро-8H,14H-11,14-диокса-6,19-диаза-8-(4,1),17(1,4)-триазол-1-(2',8')-фенантрен-4(1,2)-бензоликлоикозафан-1-ен-5,20-дион (XVII).** К раствору 0.52 г (1.01 ммоль) соединения (IX) в 101 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  при перемешивании последовательно добавляли 0.02 г (0.10 ммоль) 1,2-бис(2-азидоэтокси)этана (XVI), раствор 0.10 г (0.40 ммоль)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в 1 мл  $\text{H}_2\text{O}$ , раствор 0.40 г (2.02 ммоль) аскорбата натрия в 1 мл  $\text{H}_2\text{O}$ ; перемешивали при 40°C в течение 10 ч; затем добавляли 0.02 г (0.10 ммоль) азидида и перемешивали при 40°C в течение 10 ч. Процедуру повторяли 3 раза, затем добавляли раствор 0.05 г (0.20 ммоль)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в 1 мл  $\text{H}_2\text{O}$ , раствор 0.20 г (1.01 ммоль) NaAsc в 1 мл  $\text{H}_2\text{O}$ , 0.02 г (0.10 ммоль) диазида (XVI); перемешивали при 40°C в течение 10 ч, добавляли 0.02 г (0.10 ммоль) диазида (XVI) и снова перемешивали при 40°C в течение 10 ч. Процедуру повторяли 3 раза. Смесь перемешивали при 40°C оставшиеся 20 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры. Органический слой отделяли, промывали водой (3 × 50 мл), сушили над  $\text{MgSO}_4$ . Растворитель удалили в вакууме,

остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (элюент  $\text{CHCl}_3\text{--MeOH}$ , от 100 : 1 до 10 : 1), выделили соединение (**XVII**) (0.49 г, 43%).

Бесцветное маслообразное вещество.  $[\alpha]_D^{25} = -23.71$  ( $c = 0.70$  в  $\text{CHCl}_3\text{--MeOH}$ , 1 : 1). ESI-HRMS,  $m/z$ :  $(M + H)^+$  вычислено для  $\text{C}_{41}\text{H}_{56}\text{O}_4\text{N}_8$ : 724.4419, найдено 724.4410. ИК-спектр (пленка),  $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ : 665, 754, 970, 1049, 1133, 1216, 1238, 1299, 1351, 1365, 1380, 1429, 1456, 1525, 1596, 1650, 2865, 2921, 3293, 3305. УФ-спектр (этанол),  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ), нм: 253 (3.94).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 298 К,  $\delta_{\text{H}}$ , м.д.,  $J$ , Гц): 0.82 (3H, с,  $\text{CH}_3\text{-11}'$ ), 0.84 (3H, с,  $\text{CH}_3\text{-13}'$ ), 0.89 (3H, с,  $\text{CH}_3\text{-12}'$ ), 1.05–1.30 (7H, м, H-5', 22, 4', 4', 9', 7', 3'), 1.42–1.59 (7H, м, H-6', 6', 7', 4'a, 22, 9', 3'), 1.72–1.82 (4H, м, H-8'a, 5', 1', 1'), 2.08 (2H, м, 2H-21), 3.47 (4H, м, 2H-12, 13), 3.76 (4H, м, 2H-10, 15), 4.33 (1H, дд,  $J$  15.0, 5.3, H-18), 4.40–4.46 (4H, м, 2H-9, 16), 4.53 (2H, дд,  $J$  14.9, 5.3, H-7, 7), 4.71 (1H, дд,  $J$  15.0, 5.3, H-18), 5.26 (1H, м, H-10'), 6.06 (1H, д,  $J$  16.1, H-1), 6.31 (1H, д,  $J$  16.1, H-2), 6.74 (2H, т,  $J$  5.3, NH-6, 19), 7.18 (1H, т,  $J$  7.4, H-2br), 7.29 (1H, т,  $J$  7.4, H-6br), 7.39 (1H, д,  $J$  7.4, H-5br), 7.43 (1H, д,  $J$  7.4, H-1br), 7.67 (1H, с, H-17), 7.72 (1H, с, H-8).  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 298 К,  $\delta_{\text{C}}$ , м.д.): 15.26 ( $\text{C}^{13}$ ), 18.21 ( $\text{C}^6$ ), 19.86 ( $\text{C}^4$ ), 20.96 ( $\text{C}^{12}$ ), 22.80 ( $\text{C}^{11}$ ), 23.02 ( $\text{C}^9$ ), 30.79 ( $\text{C}^{22}$ ), 34.78 ( $\text{C}^7$ ), 35.06 ( $\text{C}^{4b}$ ), 35.22 ( $\text{C}^{18}$ ), 36.23 ( $\text{C}^2$ ), 36.35 ( $\text{C}^3$ ), 36.68 ( $\text{C}^7$ ), 37.50 ( $\text{C}^{21}$ ), 39.40 ( $\text{C}^5$ ), 39.77 ( $\text{C}^8$ ), 43.82 ( $\text{C}^1$ ), 47.95 ( $\text{C}^{8a}$ ), 50.09, 50.24 ( $\text{C}^{9,16}$ ), 52.08 ( $\text{C}^{4a}$ ), 69.24, 69.47 ( $\text{C}^{10,15}$ ), 70.47, 70.49 ( $\text{C}^{12,13}$ ), 121.24 ( $\text{C}^{10}$ ), 121.61 ( $\text{C}^2$ ), 122.92 ( $\text{C}^{17}$ )\*, 123.69 ( $\text{C}^8$ )\*, 126.03 ( $\text{C}^{5br}$ ), 126.68 ( $\text{C}^{6br}$ ), 127.56 ( $\text{C}^{2br}$ ), 129.96 ( $\text{C}^{1br}$ ), 134.42 ( $\text{C}^3$ ), 135.69 ( $\text{C}^{10a}$ ), 135.71 ( $\text{C}^4$ ), 144.08 ( $\text{C}^4$ ), 144.94 ( $\text{C}^1$ ), 145.05 ( $\text{C}^{4'}$ ), 169.45 ( $\text{C}^5$ ), 173.66 ( $\text{C}^{20}$ ).

**( $1^4Z, 5^2S, 5^4aS, 5^4bS, 5^8S, 5^8aS, 5^{10}Z, 3E$ )- $5^2, 5^{4b}, 5^8$ -Триметил- $5^1, 5^2, 5^3, 5^4, 5^{4a}, 5^{4b}, 5^5, 5^6, 5^7, 5^8, 5^{8a}, 5^9$ -додекагидро-11H-9, 12, 15-триаза-1(1, 4)-триазол-5(2, 8)-фенантрен-2(1, 2)-бензолпиклогексадекафан-3-ен-8, 11, 14-трион (**XVIII**). Смесь 0.12 г (0.60 ммоль)  $\text{NaAsc}$  в 1 мл  $\text{H}_2\text{O}$  (1.0 мл) и 0.03 г (0.12 ммоль)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в  $\text{H}_2\text{O}$  (1.0 мл) добавляли при интенсивном перемешивании к раствору 0.36 г (0.60 ммоль) соединения (**XV**) в 60 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Реакционную смесь перешивали при 40°C в течение 80 ч (контроль ТСХ и  $^1\text{H}$ -ЯМР). После охлаждения добавляли 5 мл воды, органический слой отделяли, промывали водой (3  $\times$  30 мл) и сушили над  $\text{MgSO}_4$ . Растворитель удаляли в вакууме, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (элюент  $\text{CHCl}_3\text{--MeOH}$ , от 100 : 1 до 10 : 1), выделили соединение (**XVIII**) (0.15 г, 42%).**

Белый порошок. Т. пл. 111.2°C.  $[\alpha]_D^{25} = +27.00$  ( $c = 0.20$  в  $\text{CHCl}_3$ ). ESI-HRMS,  $m/z$ :  $(M + H)^+$  вычислено для  $\text{C}_{35}\text{H}_{46}\text{O}_3\text{N}_6$ : 598.3626, найдено

598.3624. ИК-спектр (KBr),  $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ : 759, 1041, 1241, 1257, 1382, 1457, 1527, 1660, 2852, 2923, 3295. УФ-спектр (этанол),  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ), нм: 242 (3.95).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 298 К,  $\delta_{\text{H}}$ , м.д.,  $J$ , Гц): 0.81 (3H, с,  $\text{CH}_3\text{-11}'$ ), 0.86 (3H, с,  $\text{CH}_3\text{-13}'$ ), 0.90 (3H, с,  $\text{CH}_3\text{-12}'$ ), 1.23 (7H, м, H-5', 6, 4', 7', 7', 4', 6'), 1.41–1.53 (4H, м, H-6, 9', 3', 4a'), 1.70–1.98 (7H, м, H-8a', 3', 1', 1', 5', 9', 6'), 2.15, 2.24 (2H, оба м, 2H-7), 3.82–4.02 (4H, м, H-13, 13, 16, NH-15), 4.06 (1H, дд,  $J$  16.7, 5.8, H-16), 4.56 (2H, м, 2H-10), 5.25 (1H, уш.с, H-10'), 5.90 (1H, д,  $J$  16.3, H-4), 6.12 (1H, д,  $J$  16.3, H-5), 6.75 (1H, уш.с, NH-9), 7.17 (1H, уш.с, NH-12), 7.29 (1H, м, H-4br), 7.43 (1H, т,  $J$  8.3, H-5br), 7.48 (1H, м, H-6br), 7.61 (1H, д,  $J$  7.7, H-1br), 7.74 (1H, с, H-1).  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 298 К,  $\delta_{\text{C}}$ , м.д.): 15.13 ( $\text{C}^{13}$ ), 18.27 ( $\text{C}^6$ ), 19.84 ( $\text{C}^4$ ), 23.16 ( $\text{C}^{11}$ ), 23.25 ( $\text{C}^9$ ), 24.21 ( $\text{C}^{12}$ ), 30.71 ( $\text{C}^6$ ), 34.67 ( $\text{C}^{4b}$ ), 35.14 ( $\text{C}^7$ ), 35.73 ( $\text{C}^{16}$ ), 36.33 ( $\text{C}^7$ ), 36.62 ( $\text{C}^3$ ), 37.19 ( $\text{C}^2$ ), 37.40 ( $\text{C}^5$ ), 39.24 ( $\text{C}^{13}$ ), 43.22 ( $\text{C}^{10}$ ), 43.29 ( $\text{C}^1$ ), 43.50 ( $\text{C}^8$ ), 44.77 ( $\text{C}^{8a}$ ), 51.60 ( $\text{C}^{4a}$ ), 118.26 ( $\text{C}^4$ ), 121.55 ( $\text{C}^{10}$ ), 124.83 ( $\text{C}^1$ ), 126.29 ( $\text{C}^{4br}$ ), 126.82 ( $\text{C}^{1br}$ ), 127.46 ( $\text{C}^{5br}$ ), 129.91 ( $\text{C}^{6br}$ ), 133.74 ( $\text{C}^3$ ), 134.26 ( $\text{C}^2$ ), 135.15 ( $\text{C}^{10a}$ ), 144.08 ( $\text{C}^{17}$ ), 146.40 ( $\text{C}^5$ ), 168.85 ( $\text{C}^{14}$ ), 169.99 ( $\text{C}^{11}$ ), 174.69 ( $\text{C}^8$ ).

**Культуры клеток.** Линии опухолевых клеток человека MCF7 (ATCC HTB-22, аденокарцинома молочной железы), U-87 MG (ATCC HTB-14, мультиформная глиобластома), DU 145 (ATCC HTB-81, рак простаты), а также иммортализованные клетки легочных фибробластов hTERT (ATCC CRL-4058) (нераковый контроль) были приобретены из коллекции ATCC (США). Клетки культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% сыворотки крови эмбрионов крупного рогатого скота, 2 мМ/л L-глутамин, 80 мкг/мл гентамицина и 30 мкг/мл линкомицина при 37°C в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе. Исследуемые соединения и препарат сравнения доксорубин (Сандоз, Австрия) растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) и добавляли к клеточной культуре в концентрациях 0.15–160 мкг/мл. Клетки, инкубируемые без препаратов, использовали в качестве контроля.

**МТТ-тест.** Для определения  $\text{GI}_{50}$  (дозы, на 50% ингибирующей рост клеток) использовали стандартный МТТ-тест [16, 23]. Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Microsoft Excel-2007, STATISTICA 6.0, GraphPad Prism 5.0. По результатам трех независимых экспериментов (4–5 повторностей в каждом) рассчитывали среднее значение  $\text{GI}_{50}$  и стандартное отклонение (Mean  $\pm$  SD). Полученные данные представлены в табл. 1.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированы новые производные изопимаровой кислоты, содержащие алкилкарбоксиль-

ные заместители в положении С4 и азидоарильные фрагменты в положении С16 трициклического остова. Предложены методики получения новых макроциклических дитерпеноидов пимаранового типа, содержащих бис-1,2,3-триазольный или дипептидный и 1,2,3-триазольный фрагменты в линкерной цепи. Выявлено макрогетероциклическое соединение (**XXIIIa**), обладающие селективной цитотоксичностью в отношении опухолевых клеток линии MCF7, имеющее перспективы для дальнейшего изучения механизма противоопухолевого действия.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Химическому исследовательскому центру коллективного пользования СО РАН за проведение спектральных и аналитических измерений.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-33-60043) и государственного задания (тема № 1021051503128-9-1.4.1).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gromova M.A., Kharitonov Yu.V., Borisov S.A., Rybalova T.V., Tolstikova T.G., Shults E.E. // *Chem. Nat. Compd.* 2022. V. 58. P. 55–64. <https://doi.org/10.1007/s10600-022-03596-y>
- Keeling C.I., Bohlmann J. // *Phytochemistry*. 2006. V. 67. P. 2415–2423. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.08.019>
- Толстиков Г.А., Толстикова Т.Г., Шульц Э.Э., Толстиков С.Е., Хвостов М.В. // Смоляные кислоты хвойных России. Химия и фармакология / Ред. Трофимов Б.А. Новосибирск: Гео, 2011. С. 207–242.
- Kugler S., Ossowicz P., Malarczyk-Matusiak K., Wierzbicka E. // *Molecules*. 2019. V. 24. P. 1651. <https://doi.org/10.3390/molecules24091651>
- Smith E., Williamson E., Zloh M., Gibbons S. // *Phytother. Res.* 2005. V. 19. P. 538–542. <https://doi.org/10.1002/ptr.1711>
- Coté H., Boucher M.-A., Pichette A., Roger B., Legault J. // *J. Ethnopharmacology*. 2016. V. 194. P. 684–689. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.10.035>
- Pferschy-Wenzig E.M., Kunert O., Presser A., Bauer R. // *J. Agric. Food Chem.* 2008. V. 56. P. 11688–11693. <https://doi.org/10.1021/jf8024002>
- Imaizumi Y., Sakamoto K., Yamada A., Hotta A., Ohya S., Muraki K., Uchiyama M., Ohwada T. // *Mol. Pharmacol.* 2002. V. 62. P. 836–846. <https://doi.org/10.1124/mol.62.4.836>
- Salari S., Silvera Ejneby M., Brask J., Elinder F. // *Acta Physiol. (Oxf.)*. 2018. V. 222. P. e12895. <https://doi.org/10.1111/apha.12895>
- Ge L., Hoa N.T., Wilson Z., Arismendi-Morillo G., Kong X.-T., Tajhya R.B., Beeton C., Jadus M.R. // *Int. Immunopharmacol.* 2014. V. 22. P. 427–443. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.06.040>
- Sizemore G., McLaughlin S., Newman M., Brundage K., Ammer A., Martin K., Pugacheva E., Coad J., Mattes M.D., Yu H.-G. // *BMC Cancer*. 2020. V. 20. P. 595. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07071-1>
- Lu Y., Zhao Z., Chen Y., Wang J. // *Lett. Org. Chem.* 2021. V. 18. P. 950–956. <https://doi.org/10.2174/1570178618666210813121953>
- Lu Y.-J., Zhao Z.-D., Chen Y.-X., Wang J., Xu S.-C., Gu Y. // *J. Asian Nat. Prod. Res.* 2020. V. 23. P. 545–555. <https://doi.org/10.1080/10286020.2020.1810668>
- Liu J., Lu Y., Wang J., Bi L., Zhao Z. // *Chin. J. Org. Chem.* 2017. V. 37. P. 731–738. <https://doi.org/10.6023/cjoc201610017>
- Gromova M.A., Kharitonov Yu.V., Pokrovskii M.A., Bagryanskaya I.Yu., Pokrovskii A.G., Shul'ts E.E. // *Chem. Nat. Compd.* 2019. V. 55. P. 20–59. <https://doi.org/10.1007/s10600-019-02613-x>
- Gromova M.A., Kharitonov Yu.V., Golubeva T.S., Shults E.E. // *Macrocyclics*. 2021. V. 14. P. 231–239. <https://doi.org/10.6060/mhc210945s>
- Gromova M.A., Kharitonov Yu.V., Rybalova T.V., Shults E.E. // *Monatsh. Chem.* 2020. V. 151. P. 1817–1827. <https://doi.org/10.1007/s00706-020-02713-3>
- Gromova M.A., Kharitonov Y.V., Rybalova T.V., Shults E.E. // *Macrocyclics*. 2021. V. 14. P. 105–111. <https://doi.org/10.6060/mhc200817s>
- Zhao S., Wang Z.-P., Wen X., Li S., Wei G., Guo J., He Y. // *Org. Lett.* 2020. V. 22. P. 6632–6636. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c02403>
- Thirumurugan P., Matusiak D., Jozwiak K. // *Chem. Rev.* 2013. V. 113. P. 4905–4979. <https://doi.org/10.1021/cr200409f>
- Klein E., DeBonis S., Thiede B., Skoufias D.A., Kozielski F., Lebeau L. // *Bioorg. Med. Chem.* 2007. V. 15. P. 6474–6488. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.06.016>
- Spek A.L. // *J. Appl. Cryst.* 2003. V. 36. P. 7–13. <https://doi.org/10.1107/S0021889802022112>
- Wilson J.K., Sargent J.M., Elgie A.W., Hill J.G., Taylor C.G. // *Br. J. Cancer*. 1990. V. 62. P. 189–194. <https://doi.org/10.1038/bjc.1990.258>
- Kharitonov Yu.V., Shakirov M.M., Shul'ts E.E. // *Chem. Nat. Compd.* 2014. V. 49. P. 1067–1075. <https://doi.org/10.1007/s10600-014-0823-1>

25. Zhang Z., Xiao F., Huang B., Hu J., Fu B., Zhang Z. // *Org. Lett.* 2016. V. 18. P. 908–911. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b00607>
26. Wang H., He C., Pan Y., Yao C., Wu Q., Deng H. // *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 2012. V. 73. P. 177–183. <https://doi.org/10.1007/s10847-011-0040-5>
27. Larionov V.A., Adonts H.V., Gugkaeva Z.T., Smol'yakov A.F., Saghyan A.S., Miftakhov M.S., Kuznetsova S.A., Maleev V.I., Belokon Yu.N. // *ChemistrySelect.* 2018. V. 3. P. 3107–3110. <https://doi.org/10.1002/slct.201800228>
28. Krause L., Herbst-Irmer R., Sheldrick G.M., Stalke D. // *J. Appl. Cryst.* 2015. V. 48. P. 3–10. <https://doi.org/10.1107/S1600576714022985>
29. Sheldrick G.M. // *Acta Crystallogr.* 2015. A71. P. 3–8. <https://doi.org/10.1107/S2053273314026370>

## Synthetic Transformations of Higher Terpenoids. 42. Synthesis of New 18-Nor-4-(Carboxyethyl)Isopimara-7,15-Diene Derivatives and Study of Their Cytotoxicity on MCF7, U-87 MG and DU 145 Cancer Cell Lines

M. A. Gromova\*, \*\*, Y. V. Kharitonov\*\*, T. V. Rybalova\*\*, V. A. Larionov\*\*\*, T. S. Golubeva\*\*\*\*, and E. E. Shults\*\*,\*

# Phone +7 (383) 330-85-33; e-mail: schultz@nioch.nsc.ru

\*Novosibirsk State Pedagogical University (NSPU), ul. Vilyuskaja 28, Novosibirsk, 630126 Russia

\*\*Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. Akad. Lavrentyeva 9, Novosibirsk, 630090 Russia

\*\*\*Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of Russian Academy of Sciences (INEOS RAS), ul. Vavilova 28, Moscow, 119334 Russia

\*\*\*\*The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS (ICG SB RAS), prosp. Akad. Lavrentyeva 9, Novosibirsk, 630090 Russia

(*E*)-16-Aryl-substituted derivatives of tricyclic diterpenoids were synthesized by cross-coupling of isopimaric acid derivatives with substituted iodorenes catalyzed by palladium acetate in the presence of silver carbonate. Condensation of (*E*)-18-nor-4-(carboxyethyl)-16-(2-carboxyethyl)isopimar-7,15-diene dichloride with propargylamine hydrochloride leads to the corresponding dialkine, which readily reacts with diazide in the Cu(I) catalyzed cycloaddition (CuAAC) reaction, with the formation of macroheterocyclic compound containing a pimarane type tricyclic diterpenoid core and 1,2,3-triazole rings in the linker chain. Reaction of in situ prepared (*E*)-18-nor-16-azido-4-(carboxyethyl)isopimar-7,15-diene acid chloride with propargylamine hydrochloride or an alkynyl-substituted derivative of the protected Gly-Gly dipeptide leads to the corresponding azidoalkynes. The intramolecular CuAAC reaction of azidodipeptidylalkine afforded a macroheterocyclic derivative containing a dipeptide and triazole moiety in the linker chain. The obtained compounds showed higher (compared with the isopimaric acid) cytotoxicity on tumor cells MCF-7 and were less toxic to non-cancer cells than the reference drug doxorubicin. The GI<sub>50</sub> value of the most active compound is 6.3 μM, selectivity index >15) (MTT test). The synthesized derivatives of the tricyclic diterpenoid isopimaric acid can be used to develop new antitumor agents.

*Keywords:* isopimaric acid, diterpenoids, dipeptide, CuAAC-reaction, macrocycles, cytotoxicity



УДК 547.1-32-304.2:543.551.4:546.23

## ИНДУКЦИЯ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ СОЕДИНЕНИЯМИ СЕЛЕНА В МИЦЕЛИИ *Aspergillus niger*

© 2023 г. П. А. Полубояринов\*., А. В. Кузнецова\*, И. Я. Моисеева\*,  
Н. И. Микуляк\*, А. П. Каплун\*\*

\*ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет», Россия, 440026 Пенза, ул. Красная, 40

\*\*Московский технологический университет (Институт тонких химических технологий  
имени М.В. Ломоносова), Россия, 125190 Москва, Ленинградский просп., 80, к. 5

Поступила в редакцию 28.09.2022 г.

После доработки 10.10.2022 г.

Принята к публикации 12.10.2022 г.

Исследование индукции антиоксидантной активности соединениями селена ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , диацетофенонилселенид (ДАФС-25), L-селеноцистин) в различных организмах представляет интерес как механизм защиты клеточных мембран от окислительного стресса. Методом кулонометрического определения электрогенерированными титрантами (бромом и иодом) проведена сравнительная оценка антиоксидантной активности 23 аминокислот. Показано, что активность уменьшается в следующем ряду: цистин > триптофан > L-селеноцистин > тирозин > 3,3'-диметил-L-селеноцистин > метионин. С иодом взаимодействуют только аминокислоты-антиоксиданты, которые содержат более активные восстановители – сульфгидрильные и селенольные группы: цистеин > селеноцистеин > трео-3-метил-L-селеноцистеин. Вероятно, коррекция антиоксидантного статуса на уровне аминокислот реализуется за счет наличия сульфгидрильных и селенольных групп в радикалах. Если сульфгидрильных и селенольных групп окажется недостаточно, в роли перехватчиков-восстановителей будут действовать цистин, L-селеноцистин, а также триптофан, тирозин и метионин. Обнаружено, что селенсодержащие соединения дозозависимо индуцируют как общую антиоксидантную активность мицелия гриба *Aspergillus niger* Tiegh., так и показатели активности антиоксидантной системы (аминокислотный состав и фермент каталазы), что в свою очередь стимулирует накопление биомассы. Наибольший эффект в индукции общей антиоксидантной активности (3.4–5.5 раза) оказывали ДАФС-25 и селенит натрия в самой высокой концентрации (0.025 мг Se/л), более низкие концентрации (0.0025–0.00025 мг Se/л) оказывали меньший эффект (25.8–41.7%). Антиоксидантная активность в пробах с L-селеноцистином повышалась на 1.6–43.3%. Отмечается, что иодная антиоксидантная активность в мицелии в целом была ниже бромной. Все исследуемые соединения селена стимулировали рост биомассы мицелия *A. niger* (селенит натрия и L-селеноцистин при 0.025 мг Se/л), эффект липофильного ДАФС-25 проявлялся при более низкой концентрации. Также в пробах с ДАФС-25 отмечено более высокое общее содержание аминокислот, активация каталазы и накопление аминокислот-антиоксидантов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в присутствии соединений селена дозозависимо активируется антиоксидантная система мицелия гриба *A. niger*, что связано с влиянием этих соединений на систему белкового обмена и накопление биомассы.

*Ключевые слова:* соединения селена, антиоксидантная активность, каталаза, мицелий

DOI: 10.31857/S0132342323040371, EDN: ODQTVF

### ВВЕДЕНИЕ

Снижение активности антиоксидантной системы, которая не позволяет преодолевать негативные последствия окислительного стресса (избыточный уровень свободных радикалов в клетках) – основная причина старения и гибели

организмов [1]. Следует отметить, что свободные радикалы (в частности, кислородсодержащие) обладают неоднозначным влиянием на биохимические процессы и обмен веществ в клетках. С одной стороны, практически все системы жизнеобеспечения, системы обмена липидов и активности мембраносвязанных ферментов, ионного транспорта, энергопродуцирующих процессов, репликации ДНК требуют определенной концентрации свободных радикалов, с другой – избыток свободных радикалов приводит к окислительно-

Сокращения: GPX – глутатионпероксидаза; ДАФС-25 – диацетофенонилселенид.

# Автор для связи: (тел.: +7 (950) 230-48-76; эл. почта: poluboyarinovpavel@yandex.ru).

му стрессу и повреждению клеточных структур. Показано, что низкая активность антиоксидантной системы – ограничитель ростостимулирующих процессов [2].

В норме в организме действует сбалансированная система антиоксидантной регуляции свободнорадикальных процессов, один из компонентов которой – селен (Se). Селен – это единственный ультрамикроэлемент, включенный в полипептидную цепь белков в виде остатка аминокислоты селеноцистеина (Sec). Белки, которые содержат остаток Sec, определяются как селенопротеины, присутствуют во всех таксонах живых организмов (археи, бактерии, эукариоты) и имеют ключевое значение из-за их антиоксидантной активности [3].

Роль селена заключается в повышении степени надежности функционирования клеточных мембран на фоне высокой концентрации радикалов. Это достигается активацией селеном работы ферментов глутатионпероксидаз (GPX). У человека различают восемь форм GPX, пять из которых (GPX1, 2, 3, 4 и 6) селензависимы – содержат остаток селеноцистеина в активном центре. Селензависимые GPX преобладают у позвоночных, тогда как гомологи GPX, у которых вместо селеноцистеинового остатка в активном центре находится остаток цистеина, найдены у растений, дрожжей, простейших и бактерий [4].

Неорганические соли селена (селенат и селенит натрия) и органические соединения селена – эбселен (2-фенилбензолселеназол-1,2-3(2н)-он) [5], селенопиран (9-фенил-сим-нона-гидро-10-селенаантрацен) [6], диацетофенонилселенид (препарат ДАФС-25, 1,5-дифенил-3-селенапентадион-1,5) [7], – стимулируют рост и накопление биомассы у бактерий, грибов, сельскохозяйственных животных и птицы [2], а также активируют ряд ферментов: каталазу, пероксидазу, супероксиддисмутазу, глутатиопероксидазы у растений [8, 9], бактерий [10], насекомых [11], ракообразных [12], сельскохозяйственных животных и птицы [13, 14]. Кроме того, различные соединения селена могут индуцировать увеличение антиоксидантной активности за счет увеличения концентрации аскорбиновой кислоты, полифенолов и флавоноидов в растениях и грибах [15], однако механизм этого явления малоизучен.

Очевидно, что прежде чем попасть в клетку, ткань и организм в целом, соединения селена взаимодействуют с плазматической мембраной, модифицируя ее и вызывая различного рода биологические эффекты [16]. Более того, продукты биологической трансформации соединений селена в виде селенопротеинов-ферментов также модифицируют клеточные мембраны. Вероятнее всего, что и ростостимулирующий эффект селена реализуется за счет повышения устойчивости

клеточных мембран к повреждающему воздействию свободных радикалов. В этом состоит принципиальное отличие селена от других эндогенных и экзогенных антиоксидантов, которые способны только к перехвату свободных радикалов, частично за счет отдачи электрона или атома водорода и превращению в малоактивные радикальные формы.

Влияние соединений селена на механизм свободнорадикального регулирования обменных процессов позволяет целенаправленно осуществлять выбор объектов для исследования использованных в нашей работе веществ. Большое значение также имеют форма и концентрация селена, поэтому нами в работе были использованы неорганическая соль селена – селенит натрия, селеносодержащая аминокислота L-селеноцистин и селеносодержащий ксенобиотик ДАФС-25 в различных концентрациях. Общим химическим свойством данных соединений селена выступает их способность взаимодействовать как с сульфгидрильными группами клеточных мембран, так и с тиолами цитоплазмы [17].

Совершенно очевидно, что для исследования соединений селена должны быть выбраны объекты биосферы с очень высоким уровнем обмена веществ, у которых концентрация свободных радикалов высока и близка к критической. Либо это объекты, обладающие низкой стрессоустойчивостью, в которых стрессовые воздействия легко повышают концентрацию радикальных частиц до максимально безопасного уровня. К таковым следует отнести растения и грибы, которые генетически запрограммированы на быстрый рост и высочайший уровень обмена веществ. Также не следует искать выраженный отклик на воздействие соединений селена в случае медленно растущих организмов, интенсивность обмена у которых невелика, а концентрация радикальных частиц далека от критической.

Цель работы заключалась в изучении влияния соединений селена на индукцию антиоксидантной системы и рост биомассы гриба-микромикроба *Aspergillus niger* Tiegh.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Антиоксидантная активность аминокислот.** Ввиду большого значения, придаваемого аминокислотам как антиоксидантам, и для изучения возможного влияния соединений селена на синтез аминокислот *in vivo* нами был применен метод кулонометрического титрования для определения антиоксидантной активности 23 аминокислот. В качестве кулонометрических титрантов-окислителей использовали электрогенерированные бром и иод. Электрохимическое окисление бромид-ионов на платиновом электроде в кислых

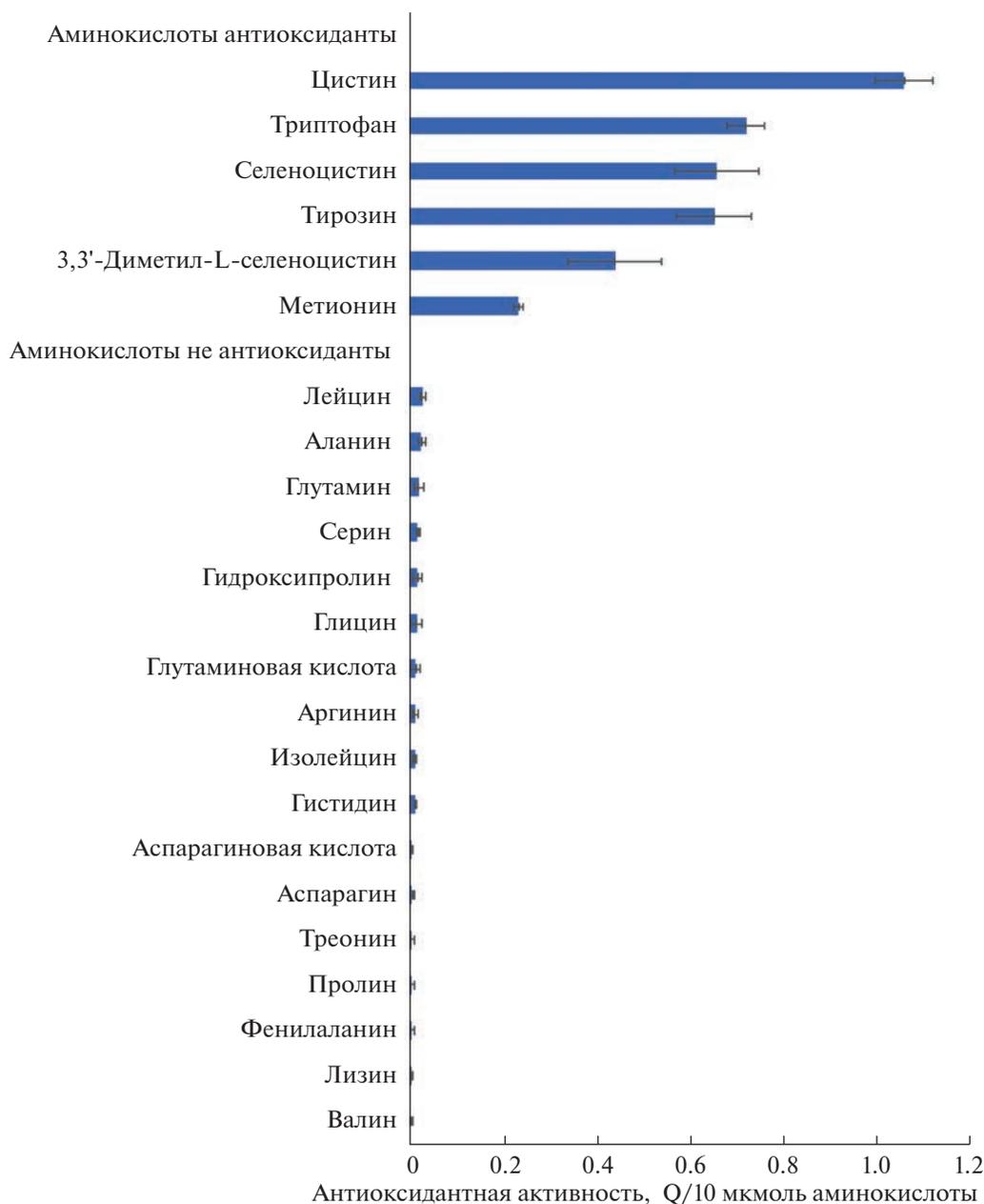


Рис. 1. Антиоксидантная активность аминокислот (окислитель – электрогенерированный бром).

средах может приводить к образованию  $\text{Br}_3^-$ ,  $\text{Br}_2$ , а также короткоживущих радикалов брома ( $\text{Br}^*$ ), адсорбированных на поверхности платинового электрода [18]. Образующиеся соединения брома и сам бром легко вступают в радикальные и окислительно-восстановительные реакции, а также реакции электрофильного замещения и присоединения по кратным связям [19].

Обнаружено, что наибольшей антиоксидантной активностью обладают шесть аминокислот, и эта активность уменьшается в следующем ряду: цистин > триптофан > L-селеноцистин > тирозин >

> 3,3'-диметил-L-селеноцистин > метионин. Следует отметить, что все эти аминокислоты содержат окисляемые боковые радикалы. При сравнении серо- и селенсодержащих аминокислот выявлено, что цистин проявляет более высокую антиоксидантную активность, чем L-селеноцистин и 3,3'-диметил-L-селеноцистин, наименее выражена антиоксидантная активность метионина. Практически не проявляли антиоксидантную активность 17 протеиногенных аминокислот (рис. 1).

Кулонометрический метод окислительного галогенирования бромом растворов 23 аминокислот позволил определить высокую антиоксидантную

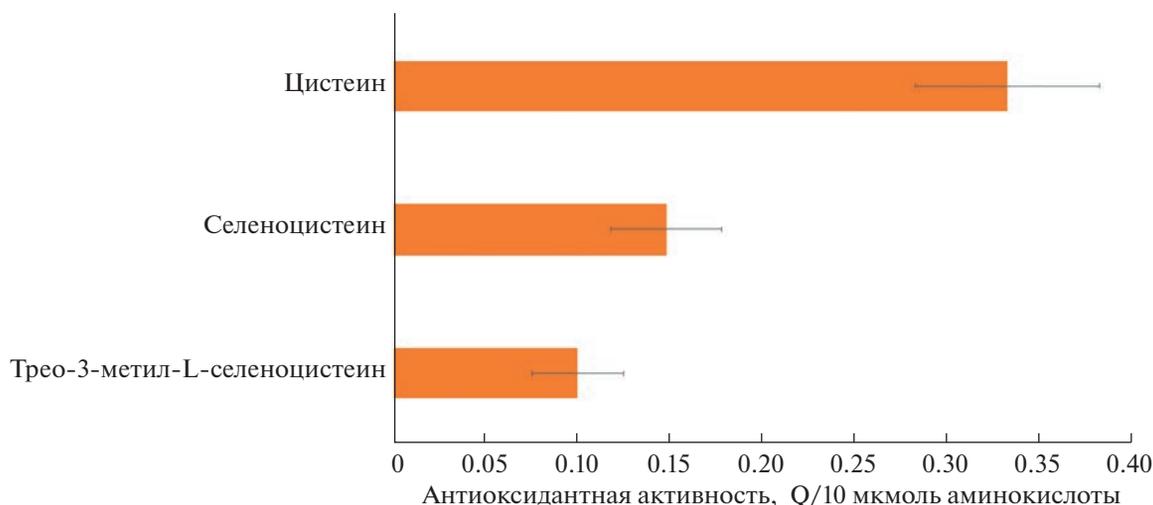


Рис. 2. Антиоксидантная активность аминокислот (окислитель – электрогенерированный иод).

активность шести аминокислот, уменьшающуюся в следующем ряду: цистин > триптофан > L-селеноцистин > тирозин > 3,3'-диметил-L-селеноцистин > метионин.

Все активные в отношении антиоксидантных свойств аминокислоты, взаимодействующие с электрогенерированным бромом, не взаимодействовали с иодом, (более слабым окислителем). По-видимому, для взаимодействия с иодом требуется наличие открытых (более активных восстановителей) антиоксидантных групп в боковом радикале аминокислоты, например, сульфгидрильных ( $-SH$ ) или селенольных ( $-SeH$ ) групп.

Для получения таких сульфгидрильных и селенольных групп цистин, L-селеноцистин и 3,3'-диметил-L-селеноцистин восстанавливали боргидридом натрия в инертной атмосфере, перемешивали в течение 0,5 ч, а затем добавляли серную кислоту до pH 2,0 для распада остаточного количества боргидрида и протонирования антиоксидантных групп. Как и в варианте с бромом, наибольшую антиоксидантную активность наблюдали у серосодержащей аминокислоты – цистеина, а селеноцистеин и трео-3-метил-L-селеноцистеин были менее активны (рис. 2).

Вероятно, серо- и селенсодержащие аминокислоты с сульфгидрильными и селенольными группами (цистеин, селеноцистеин и трео-3-метил-L-селеноцистеин) взаимодействуют с менее активными радикалами, в то время как аминокислоты с частично окисленными дисульфидными и диселенидными связями (цистин, L-селеноцистин, 3,3'-диметил-L-селеноцистин), как относительно слабые восстановители, нейтрализуют более активные радикалы, обеспечивая разные уровни антиоксидантной защиты.

Таким образом, если аминокислот-антиоксидантов первого уровня с сульфгидрильными и селенольными группами окажется недостаточно, для эффективного обезвреживания радикалов в роли перехватчиков-восстановителей будут действовать цистин, L-селеноцистин, а также триптофан, тирозин и метионин.

Очевидно, что аминокислоты L-цистеин/L-цистин обладают более высокой антиоксидантной активностью по сравнению с L-селеноцистеином/L-селеноцистином, что связано, по-видимому, с типом взаимодействия сульфгидрильной ( $-SH$ ) и селенольной группы ( $-SeH$ ) аминокислот: нуклеофильная атака на атом селена протекает через присоединение-элиминирование и имеет значительно меньшую энергию активации, чем нуклеофильная атака на атом серы, которая протекает по  $S_N2$ -механизму [20]. Таким образом, серосодержащие аминокислоты более устойчивы к окислению и обладают большей емкостью в отношении связывания свободных радикалов по сравнению с селенсодержащими аминокислотами, из которых селен элиминируется. В то же время более высокая поляризуемость селенолов делает их более сильными нуклеофилами, чем соответствующие производные серы. Кроме того, энергия диссоциации связи Se–Se (46 ккал/моль) по сравнению со связью S–S (64 ккал/моль) значительно меньше [21]. Поэтому реакции селенол/диселенидного обмена протекают в  $\sim 10^7$  раз быстрее, чем реакции тиол/дисульфидного обмена [22].

Очевидно, что данные свойства обуславливают каталитические преимущества L-селеноцистеина по сравнению с L-цистеином в активном центре тиоредоксинредуктазы млекопитающих. Также наличие L-селеноцистеина в ферментах рассматривается как способность противостоять

необратимо окислению. Окисление L-селеноцистеина до R-SeOH обратимо, в отличие от L-цистеина, который легко необратимо окисляется до R-SO<sup>2-</sup> или R-SO<sup>3-</sup>, что приводит к инактивации ферментов. Предполагается, что такие циклические окислительно-восстановительные переходы R-Se<sup>-</sup>—R-SeOH в селенопротеинах могут не только служить механизмом редокс-регуляции клеточных процессов, но и защищать от чрезмерного окисления и инактивации [23].

**Влияние селеносодержащих соединений на рост биомассы и активацию фермента каталазы *A. niger*.** Из сообщества объектов биосферы высокой отзывчивостью на селен обладают грибы, что обусловлено их уникально высокой скоростью роста в сочетании с адекватно высоким уровнем обмена веществ и, как следствие, высокой концентрацией свободных радикалов, близкой к критическому уровню. Вследствие этого грибы накапливают селен и положительно отзываются на добавки микроэлемента, который выступает стимулятором роста и адаптогеном [24]. Ростостимулирующая активность селена в отношении различных в таксономическом отношении грибов отмечается в большом количестве работ (см. монографию Блинохватова с соавт. [2] и ссылки в ней). Также важна форма поступающего селена [17].

Каталаза (САТ, К.Ф. 1.11.1.6) — фермент, не содержащий селена, но участвующий в антиоксидантной защите организма от свободных радикалов. Каталаза катализирует превращение перекиси водорода до молекулярного кислорода и воды, эффективно защищая клетки от возможного окисления.

После добавления в культуральную жидкость раствора селенита натрия происходит стимуляция биомассы гриба, наиболее активно в высоких концентрациях (рис. 3а) и в течение всего времени опыта. Стимуляция биомассы гриба селеном постепенно повышается с 7-е на 21-е сутки и снижается на 28-е сутки.

Наиболее значимое накопление биомассы мицелия *A. niger* в течение всего опыта наблюдалось в варианте с самой высокой концентрацией Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> — на 31% выше по сравнению с контролем. В других вариантах опыта накопление биомассы было менее значительным, за исключением варианта с самой низкой концентрацией, при использовании которой накопление биомассы за 28-м суткам превосходило контроль на 32.6%.

Селенит натрия (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) оказывает существенное влияние на активность каталазы в мицелии *A. niger* (рис. 3б). Сразу после добавления селенита натрия в питательную среду повышалась активность каталазы, причем наибольшая активность отмечалась в варианте со средней концентрацией соли (0.0025 мг Se/л) и низкой концентрацией соли — (0.00025 мг Se/л) — на 96.8 и 42.9%, ме-

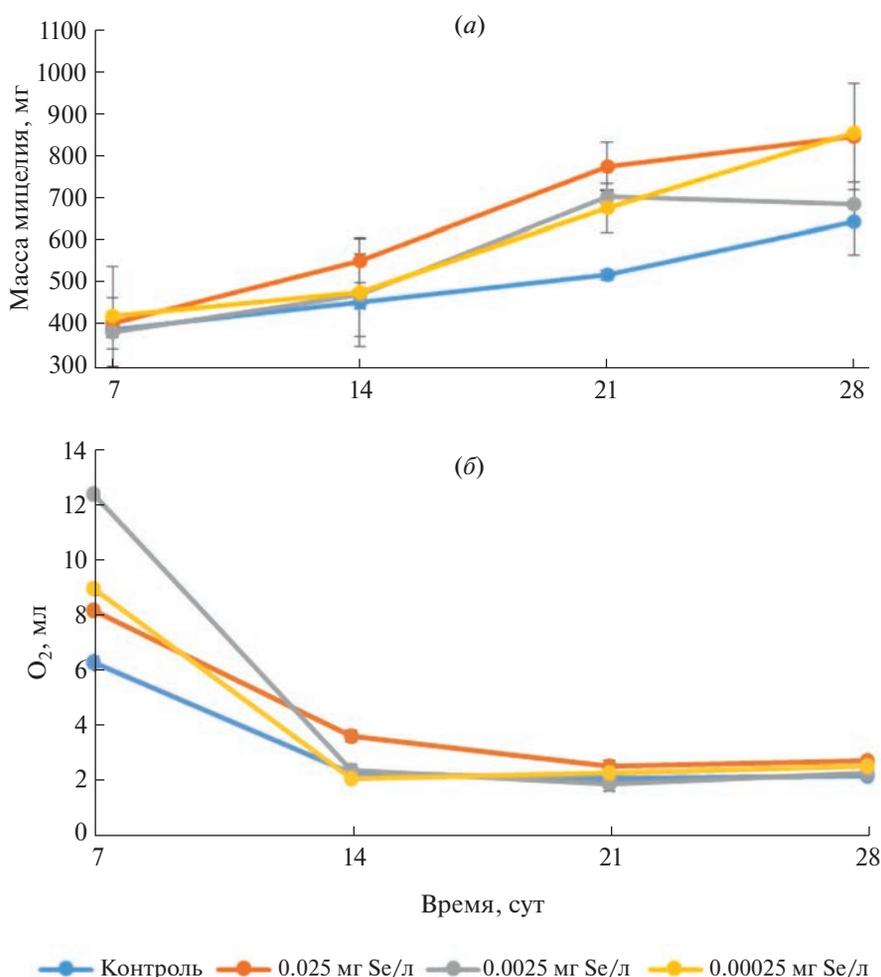
нее значительно она изменялась при высокой концентрации (0.025 мг Se/л) — на 30.2%. Однако к 14, 21 и 28-м суткам значимо отличался от контроля только вариант с самой высокой концентрацией (на 56.5, 19.0 и 22.7% соответственно), в отличие от средней и низкой концентраций, при использовании которых активность фермента была близка к контролю. По-видимому, при действии высокой концентрации дольше проявляется воздействие селенита натрия, как тиолового яда, на сульфгидрильные группы гиф грибов, а среднее значение активности каталазы в мицелии *A. niger* также указывает на дозозависимую стимуляцию селенитом натрия активности этого фермента.

Аминокислота L-селеноцистин схожим образом стимулирует рост биомассы мицелия, как и в опыте с селенитом натрия (рис. 4а). В высокой концентрации (0.025 мг Se/л) L-селеноцистин наиболее стабильно стимулировал рост биомассы в течение всего опыта, и к 28-м суткам масса мицелия превосходил контроль на 7.1%. В остальных вариантах масса мицелия мало отличалась от контроля.

Добавление аминокислоты L-селеноцистина в питательную среду также стимулировало активность каталазы в мицелии *A. niger* (рис. 4б). Характер и степень повышения активности каталазы *A. niger* после добавления L-селеноцистина во многом схожи с показателями в опыте с селенитом натрия. Однако самая высокая концентрация селеносодержащей аминокислоты стабильно повышала активность каталазы в течение всего опыта: на 7-е сутки — на 113.5%, на 14-е — на 56.5%, на 21-е — на 19.0% и на 28-е — на 22.7%. Средняя и низкая концентрации аминокислоты менее значительно активировали каталазу — на 16.2–4.3%.

Диацетофенонилселенид (ДАФС-25) в самой высокой концентрации сначала ингибировал, а затем, на 21-е сутки, стимулировал рост биомассы (рис. 5а). Наибольшей стимулирующей активностью обладала самая низкая (0.00025 мг Se/л) и средняя (0.0025 мг Se/л) концентрации ДАФС-25, однако к концу опыта активность снижалась до значений контроля.

В целом липофильный ксенобиотик ДАФС-25 вызывал намного более сильную индукцию активности каталазы, чем полярные селенит натрия и L-селеноцистин (рис. 5б). Так, активность каталазы возрастала сразу после добавления селеносодержащего ксенобиотика и увеличивалась дозозависимо в 3.6, 5.4 и 7.6 раза, в пробах с концентрацией ДАФС-25 0.025, 0.0025 и 0.00025 мг Se/л соответственно. В образцах с наиболее высокой концентрацией (0.025) эффект активации фермента сохранялся до 21 суток, тогда как в вариантах с более низкими концентрациями активность была близка к контролю.



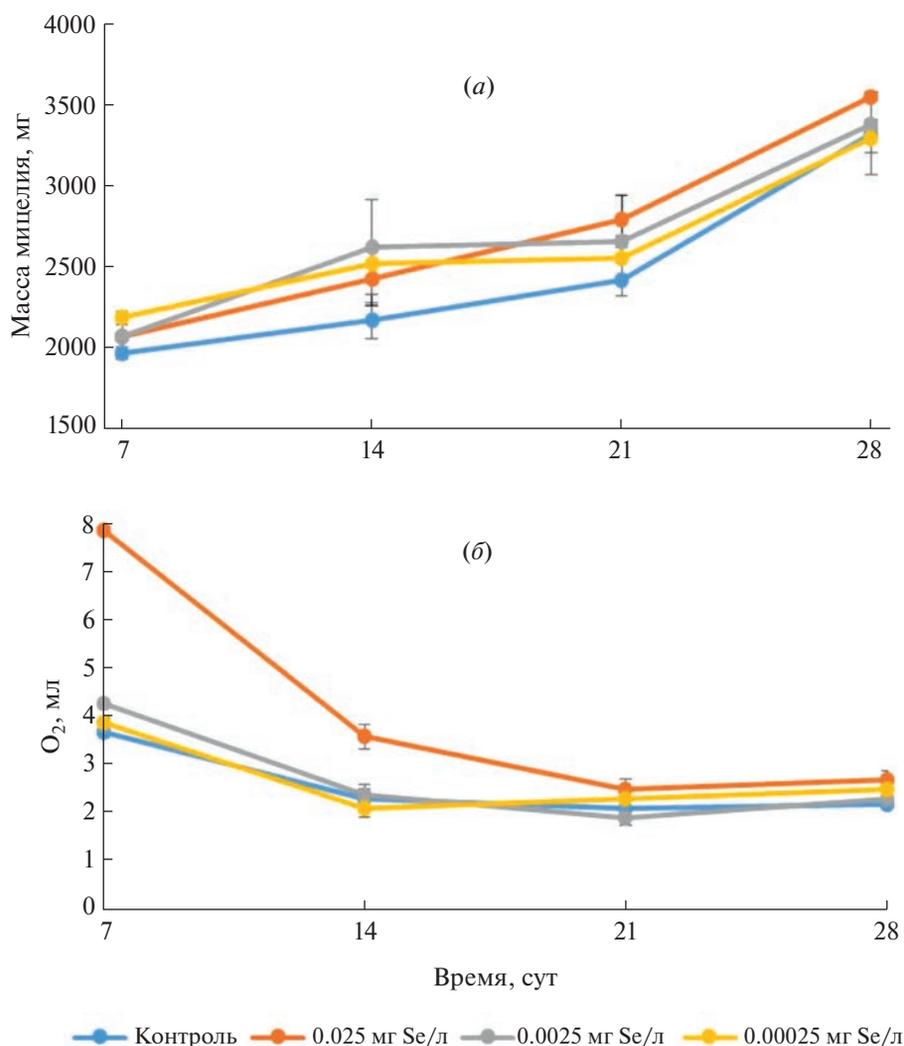
**Рис. 3.** (а) — Влияние селенита натрия на стимуляцию роста биомассы гриба *A. niger*; (б) — влияние селенита натрия на активность каталазы в мицелии *A. niger*. По оси ординат — выделение O<sub>2</sub> мл на 100 мг сырой массы ткани; по оси абсцисс — время обработки, начиная с 7 суток от момента инокуляции культуральной жидкости.

Селеносодержащие соединения, используемые в исследовании, должны снижать ферментативную активность оксидаз за счет инактивации металлсодержащих простетических групп ферментов селеноводородом (H<sub>2</sub>Se), который генерируется при взаимодействии с тиолами клетки и ферментативно [17]. Но в ходе эксперимента наблюдалось четкое, зависимое от концентрации селена увеличение активности каталазы. Можно предположить, что высокие концентрации селеносодержащих соединений вызывают оксидативный стресс, в ответ на который индуцируется активность ферментов, утилизирующих перекись водорода. Однако времени для индукции ферментов было слишком мало: активность ферментов повышалась практически сразу и нарастала в течение суток после добавления соединений селена. Вероятнее всего, увеличение активности каталазы связано со взаимодействием селеносодержащих соединений с сульфгидрильными группами клеточных мембран, истечением электролитов, увеличе-

нием концентрации белка в клетке и, соответственно, увеличением активности фермента [25].

**Индукция антиоксидантной активности в мицелии гриба.** Добавление различных концентраций селеносодержащих соединений в питательную среду приводило к индукции антиоксидантной активности в мицелии гриба *A. niger* (рис. 6).

Наибольший эффект в индукции антиоксидантной активности вызывали ксенобиотик ДАФС-25 и селенит натрия в самой высокой концентрации, превышая контроль в 3.4–5.5 раза соответственно. Эти соединения в средней и низкой концентрациях действовали намного слабее, превосходя контроль на 25.8–41.7%, кроме варианта с ДАФС-25, в котором антиоксидантная активность увеличилась в 3.1–4.12 раза. Аминокислота L-селеноцистин также индуцировала антиоксидантную активность, превосходя контроль на 1.6–43.3%. Вероятно, эффект различных селеносодержащих соединений в индукции антиок-



**Рис. 4.** (а) – Влияние L-селеноцистина на накопление биомассы гриба *A. niger*; (б) – влияние L-селеноцистина на активность каталазы в мицелии *A. niger*. По оси ординат – выделение O<sub>2</sub> мл, на 100 мг сырой массы ткани; по оси абсцисс – время обработки, начиная с 7 суток от момента инокуляции.

сидантной активности связан как с липофильностью молекул, так и с растворимостью в водных растворах: в отличие от L-селеноцистина, селенит натрия хорошо растворим в воде, а органическая молекула ДАФС-25 липофильна и может проходить через клеточные стенки.

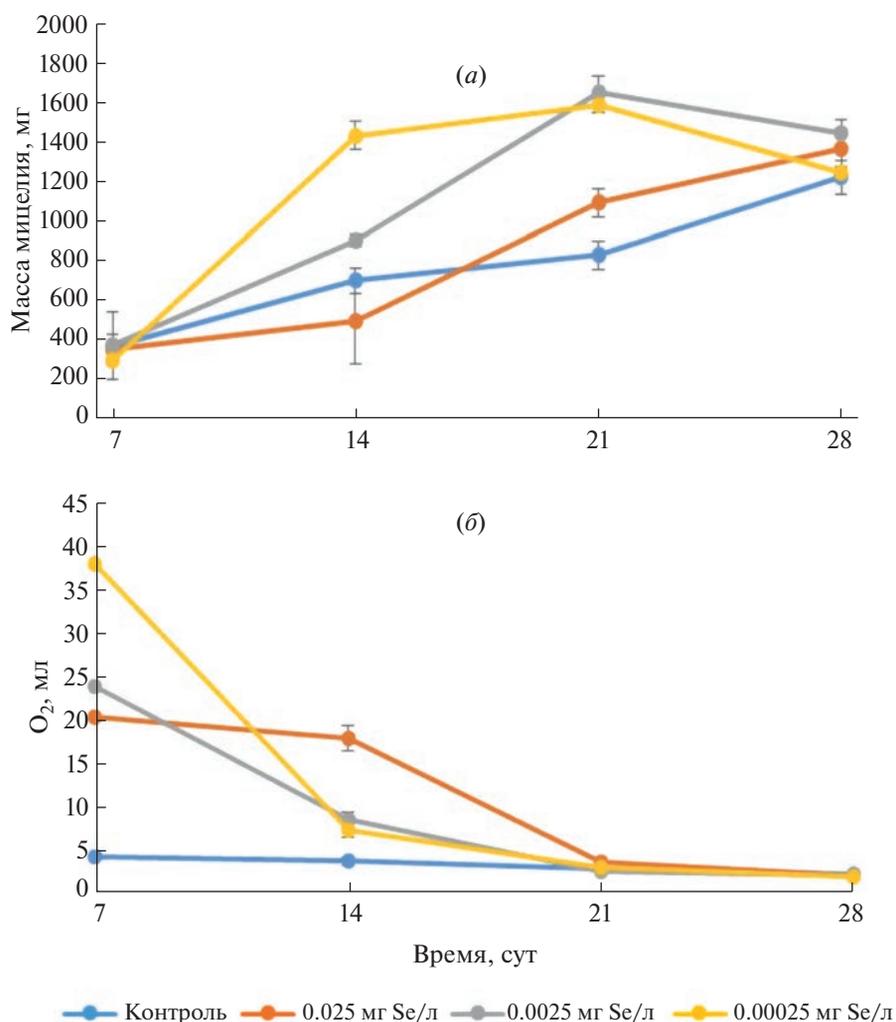
При определении сильных антиоксидантов в мицелии гриба, с электрогенерированным иодом их концентрация уменьшалась примерно на порядок. Однако общая тенденция увеличения антиоксидантной активности селенсодержащими соединениями, особенно в высоких концентрациях, сохранялась (рис. 7).

В целом при определении антиоксидантной активности с электрогенерированным иодом просматривалась общая тенденция, как и с электрогенерированным бромом – наибольший эффект по увеличению антиоксидантной активно-

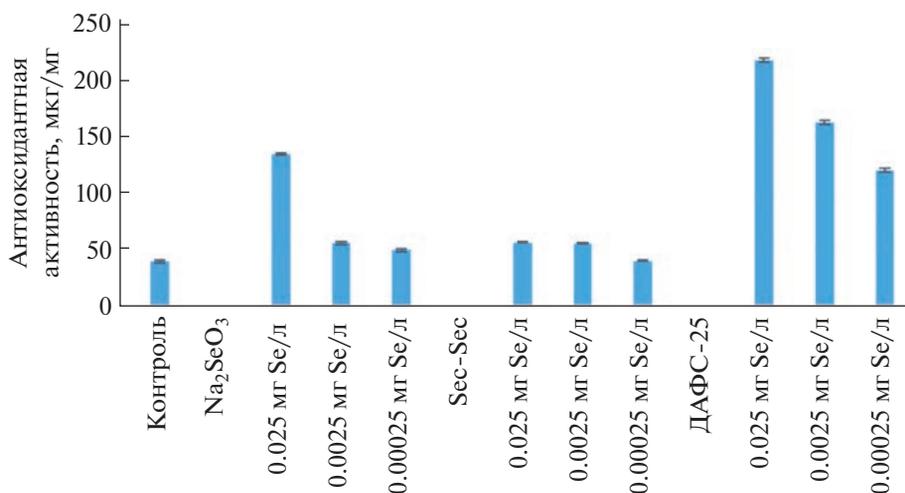
сти проявили ДАФС-25 и селенит натрия в самой высокой концентрации, превосходя контроль в 6.3 и 6.1 раз соответственно. Намного слабее антиоксидантную активность индуцировала аминокислота L-селеноцистин.

Следует отметить, что увеличение количества антиоксидантов, особенно в вариантах с высокими концентрациями соединений селена, коррелировало с увеличением накопления биомассы мицелия, что указывает на взаимосвязь данных процессов.

**Влияние ксенобиотика ДАФС-25 на аминокислотный состав *A. niger*.** Опубликовано несколько исследований, посвященных влиянию соединений селена на азотистый обмен и содержание отдельных аминокислот, в которых отмечали как увеличение суммарного содержания аминокислот при добавлении соединений селена, так и по-



**Рис. 5.** (а) – Влияние дицетофенонилселенида (ДАФС-25) на стимуляцию роста биомассы мицелия гриба *A. niger*; (б) – влияние ДАФС-25 на активность каталазы в мицелии *A. niger*. По оси ординат – выделение  $O_2$  мл, на 100 мг сырой массы ткани; по оси абсцисс – время обработки, начиная с 7 суток от момента инокуляции.



**Рис. 6.** Антиоксидантная активность мицелия *A. niger* (с электрогенерированным бромом, по аскорбиновой кислоте, мкг/мг).

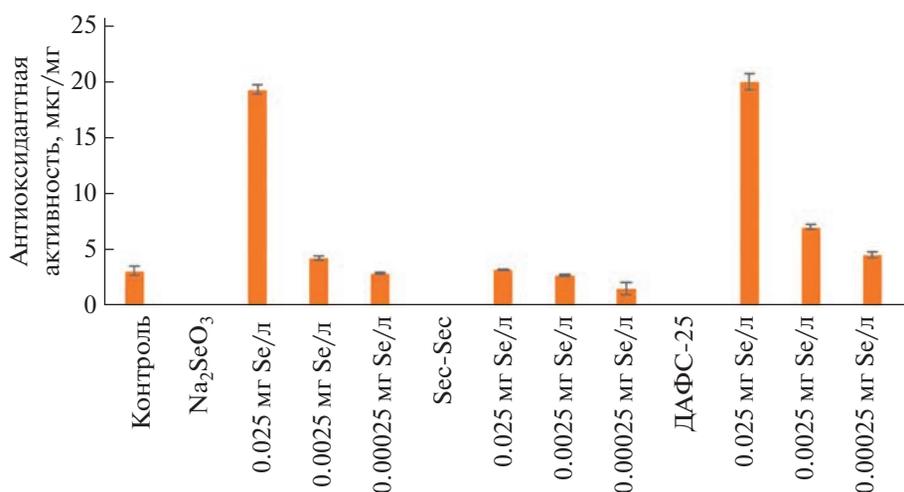


Рис. 7. Антиоксидантная активность мицелия *A. niger* (с электрогенерированным иодом, по аскорбиновой кислоте, мкг/мг).

вышение концентрации незаменимых аминокислот — триптофана, лизина и лейцина в клетках дрожжей, бактерий и членистоногих [26–28].

На индукцию антиоксидантной активности и на содержание аминокислот в мицелии *A. niger* наибольшее влияние оказал ДАФС-25 в самой высокой концентрации (табл. 1) по сравнению с серосодержащей аминокислотой-антиоксидантом цистеином и их смеси с ДАФС-25. В наших исследованиях L-цистеин проявил себя как антидот ДАФС-25 и снижал активность фермента пероксидазы, а также накопление селена в тканях растений кукурузы [8].

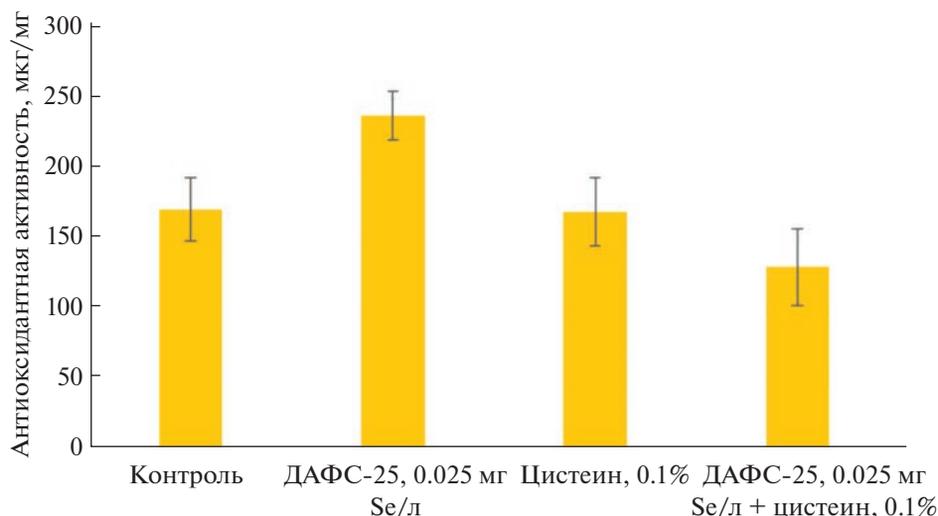
Анализ общего содержания аминокислот в мицелии гриба показал, что наибольшее воздей-

ствие на общую сумму аминокислот оказывал ДАФС-25, превышая контроль незначительно — на 12.4%. Поскольку добавление L-цистеина в питательную среду и ее смесь с ДАФС-25 лишь незначительно увеличивало общее содержание аминокислот, мы полагаем, что серосодержащая аминокислота-антиоксидант не оказывает существенного влияния на концентрацию аминокислот, а также нивелирует действие ДАФС-25.

Содержание аминокислоты-антиоксиданта тирозина в варианте с ДАФС-25 превышало контроль на 58%, а в варианте ДАФС-25 + цистеин концентрация тирозина уменьшалась на 51%, что также говорит об антагонизме соединений серы и селена в биологических средах. У грибов тирозин

Таблица 1. Содержание аминокислот (%) в гидролизате порошка мицелия *A. niger*

| Аминокислота       | Контроль     | ДАФС-25<br>(0.025 мг Se/л) | Цистеин<br>(0.1%) | ДАФС-25 + цистеин<br>(0.025 мг Se/л + 0.1%) |
|--------------------|--------------|----------------------------|-------------------|---|
| Аргинин            | 12.74 ± 1.72 | 11.75 ± 0.47               | 13.06 ± 1.29      | 15.87 ± 1.59                                |
| Лизин              | 6.32 ± 0.34  | 6.85 ± 0.14                | 6.58 ± 0.13       | 5.77 ± 0.52                                 |
| Тирозин            | 2.40 ± 0.11  | 3.79 ± 0.05                | 2.25 ± 0.02       | 1.23 ± 0.08                                 |
| Фенилаланин        | 2.53 ± 0.08  | 2.93 ± 0.17                | 2.56 ± 0.20       | 3.07 ± 0.12                                 |
| Гистидин           | 4.46 ± 0.22  | 4.93 ± 0.14                | 4.52 ± 0.50       | 4.78 ± 0.24                                 |
| Лейцин + изолейцин | 4.51 ± 0.20  | 6.23 ± 0.43                | 6.19 ± 0.41       | 6.24 ± 0.06                                 |
| Метионин           | 1.24 ± 0.04  | 1.81 ± 0.02                | 1.03 ± 0.04       | 0.89 ± 0.03                                 |
| Валин              | 5.43 ± 0.11  | 6.32 ± 0.06                | 5.81 ± 0.17       | 5.52 ± 0.50                                 |
| Пролин             | 4.56 ± 0.16  | 4.88 ± 0.24                | 5.15 ± 0.56       | 4.16 ± 0.21                                 |
| Треонин            | 6.44 ± 0.13  | 7.87 ± 0.16                | 6.65 ± 0.06       | 7.14 ± 0.42                                 |
| Серин              | 5.45 ± 0.44  | 6.07 ± 0.12                | 6.26 ± 0.62       | 6.15 ± 0.17                                 |
| Аланин             | 7.17 ± 0.11  | 7.93 ± 0.79                | 7.10 ± 0.14       | 6.83 ± 0.68                                 |
| Глицин             | 5.22 ± 0.37  | 5.58 ± 0.33                | 5.75 ± 0.19       | 5.10 ± 0.22                                 |
| Сумма аминокислот  | 68.47 ± 4.03 | 76.94 ± 3.12               | 72.91 ± 4.33      | 72.75 ± 4.84                                |



**Рис. 8.** Антиоксидантная активность суммы аминокислот мицелия гриба *A. niger* (по данным табл. 1, количество электричества, Q, Кл).

при участии фермента тирозиназы (К.Ф. 1.10.3.1) последовательно окисляется через промежуточные продукты в черный азотсодержащий пигмент меланин, один из самых мощных антиоксидантов [29]. Содержание другой аминокислоты-антиоксиданта – метионина – в варианте с ДАФС-25 также превышало контроль на 46%.

Аминокислота пролин не проявляет антиоксидантные свойства (табл. 1), однако ее концентрация обычно повышается при оксидативном стрессе. Пролин – аминокислота с защитными функциями в клетке, проявляющимися в регуляции ферментов пероксидазы и каталазы [27]. Можно отметить, что в варианте с ДАФС-25 содержание пролина было выше контроля на 7%, в то же время в варианте с цистеином она была выше на 12% и практически не изменялась в варианте их смеси.

Для оценки влияния ДАФС-25 на индукцию аминокислот-антиоксидантов были использованы данные рис. 1 и проведен расчет антиоксидантной активности суммы аминокислот, содержащихся в мицелии гриба *A. niger* (табл. 1), по каждому варианту опыта (рис. 8). Увеличение на 12,3% антиоксидантной активности суммы аминокислот мицелия происходило только в варианте с ДАФС-25, но не в варианте с цистеином и смесью с ДАФС-25, в основном за счет увеличения концентрации аминокислот-антиоксидантов – тирозина и метионина.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реактивы и приборы.** В работе использовали следующие реактивы: набор аминокислот LAA21 (Sigma-Aldrich, США) и L-селеноцистин, синтезированный по методике, опубликованной ранее

[30]. Новая аминокислота – 3,3'-диметил-L-селеноцистин – получена по методике, опубликованной ранее [31]. Из аминокислот (табл. 2) готовили 0.01 М растворы на дистиллированной воде.

Пероксид водорода 30%, бензидин, L-цистеина гидрохлорид, ацетон (АО “Вектон”, Россия), диацетофенонилселенид (ДАФС-25; ООО “Сульфат”, Россия).

**Антиоксидантная активность аминокислот.** Суммарную антиоксидантную активность аминокислот и мицелия определяли на кулонометрическом анализаторе Эксперт-006 (Эконикс-Эксперт, Россия) по методике Лапина [32]. Электрогенерацию галогенов осуществляли на кулонометрическом анализаторе Эксперт-006 при силе тока 5.0 мА из водных 0.2 М растворов КВг в 0.1 М  $H_2SO_4$  и из 0.1 М раствора KI в тартратном буфере (pH 3.56).

Кулонометрическое определение проводили в ячейке объемом 100 мл, в которую вносили 50 мл фонового раствора, далее опускали электроды и включали генераторную цепь. По достижении определенного значения индикаторного тока в ячейку вносили аликвоту исследуемого образца (0.1 см<sup>3</sup>) – 10 мкмоль соответствующей аминокислоты. Количество электричества (кулон, Q, Кл), затраченного на генерацию брома и иода, определяется прибором автоматически. Антиоксидантную активность определяли как количество электричества, затраченного на титрование 10 мкмоль аминокислоты.

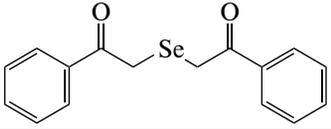
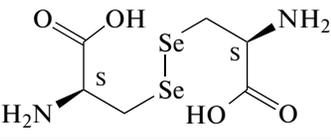
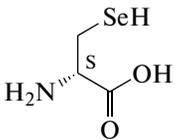
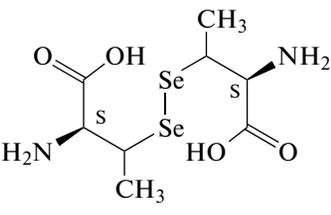
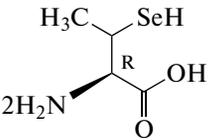
Структурные формулы используемых в работе селенсодержащих соединений и содержание селена представлены в табл. 3.

**Влияние селенсодержащих соединений на рост биомассы *Aspergillus niger* и активацию каталазы.** Диацетофенонилселенид (ДАФС-25) растворяли

**Таблица 2.** Молекулярные массы аминокислот

| Аминокислота          | $M_r$  | Аминокислота                      | $M_r$  | Аминокислота                | $M_r$  |
|-----------------------|--------|-----------------------------------|--------|-----------------------------|--------|
| Аланин                | 89.09  | Гистидин · HCl · H <sub>2</sub> O | 209.63 | Триптофан                   | 204.23 |
| Аргинин · HCl         | 210.66 | Изолейцин                         | 131.17 | Тирозин                     | 181.19 |
| Аспарагин             | 132.12 | Лейцин                            | 131.17 | Серин                       | 105.09 |
| Аспарагиновая кислота | 133.10 | Лизин · HCl                       | 182.65 | L-Селеноцистин              | 334.09 |
| Валин                 | 117.15 | Метионин                          | 149.21 | 3,3'-Диметил-L-селеноцистин | 362.15 |
| Глицин                | 75.07  | Пролин                            | 115.13 | Фенилаланин                 | 165.19 |
| Глутамин              | 146.14 | Транс-4-гидрокси-L-пролин         | 131.13 | Цистеин                     | 121.16 |
| Глутаминовая кислота  | 147.13 | Треонин                           | 119.12 | Цистин                      | 240.30 |

**Таблица 3.** Содержание селена и формулы селеносодержащих соединений

| Название препарата              | Формула  | Содержание селена, % |
|---------------------------------|--|----------------------|
| Селенит натрия                  | Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>   | 45.7                 |
| ДАФС-25 (диацетофенонилселенид) |   | 24.9                 |
| L-Селеноцистин                  |  | 47.2                 |
| L-Селеноцистеин                 |   | 47.0                 |
| 3,3'-Диметил-L-селеноцистин     |  | 43.6                 |
| Трео-3-метил-L-селеноцистеин    |  | 39.9                 |

в ацетоне, а селенит натрия и L-селеноцистин – в 0.1 М HCl, добавляли в питательную среду на 7-е сутки культивирования. В контрольные варианты добавляли чистые растворители – ацетон и соляную кислоту.

Объектом исследования служил штамм мицелиального гриба *Aspergillus niger* Tiegh. из коллекции кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, любезно предоставленный А.Н. Лихачевым.

Для оценки влияния соединений селена использовали споровую суспензию, которую получали следующим образом: кусочки сахарозного агара с 7-дневной культурой вносили в пробирки с жидкой питательной средой и взбалтывали не менее 5 мин. Полученную суспензию для освобождения от обрывков мицелия фильтровали через стерильную вату. Подсчет конидий проводили в камере Горяева и разбавляли суспензию так, чтобы содержание спор в питательной среде составило  $10^3$  конидий/мл.

Выбор питательной среды для культивирования гриба *A. niger* был определен селективностью и отсутствием необходимости стерилизации при применении лабильных к нагреванию веществ (состав: сахароза – 10%,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 0.3%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.2%,  $\text{MgSO}_4$  – 0.05%,  $\text{FeSO}_4$  – 0.01%). Высокая концентрация сахара и кислая среда (за счет гидролиза  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) препятствовали росту бактерий. Культуру инкубировали при 30°C. На 7, 14, 21 и 28-е сутки культивирования мицелий гриба отделяли от культуральной жидкости фильтрованием на воронке Бюхнера с целлюлозным фильтром, промывали дистиллированной водой, избыток влаги удаляли при помощи фильтровальной бумаги и взвешивали на аналитических весах. Гомогенат получали, растирая 100 мг мицелия гриба, с кварцевым песком и добавлением 2 мл дистиллированной воды, с последующим центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 мин.

Для определения антиоксидантной активности в мицелии гриба надосадочную жидкость ( $0.1 \text{ см}^3$ ) вносили в электрохимическую ячейку, полученную из гомогената. Антиоксидантную активность мицелия выражали в пересчете на стандартное вещество – аскорбиновую кислоту (мкг/мг мицелия).

На 7-е сутки культивирования, после добавления селеносодержащих соединений, определяли активность каталазы в мицелии гриба газометрическим методом по методике Минеева с соавт. [33]. Для этого 100 мг мицелия взвешивали на аналитических весах, растирали с кварцевым песком и мелом в ступке, количественно переносили в колбу с 5 мл дистиллированной воды для определения активности фермента. Активность каталазы выражали как объем кислорода  $\text{O}_2$  (мл) на 100 мг сырой массы мицелия гриба.

Аминокислотный состав анализировали путем кислотного гидролиза порошка сухого мицелия при 110°C в течение 14 ч с последующим определением в системе капиллярного электрофореза Капель 105 М (Люмэкс, Россия) согласно стандартной методике [34].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе использовался кулонометрический метод окислительного галогенирования бромом растворов 23 аминокислот, который позволил определить высокую антиоксидантную активность шести аминокислот: цистин, триптофан, L-селеноцистин, тирозин, 3,3'-диметил-L-селеноцистин и метионин. В то же время использование данного метода с другим галогеном – иодом – позволяет селективно определять антиоксидантную активность аминокислот, которые в составе бокового радикала имеют сульфгидрильные и селенольные группы.

Впервые была выявлена взаимосвязь между повышением концентрации селена и увеличением антиоксидантной активности в мицелии гриба-микромикета *A. niger*, а также активности фермента каталазы и стимуляции накопления биомассы. Стимулирование роста биомассы мицелия *A. niger* по времени совпадает со снижением активности каталазы в мицелии, когда уменьшается воздействие селеносодержащих соединений на клетку гриба. Известно, что роль селена заключается в повышении степени надежности функционирования клеточных мембран на фоне высокой концентрации радикалов, за счет чего реализуется ростостимулирующий эффект соединений селена.

Кроме того, было обнаружено, что соединения селена аналогичным образом активируют антиоксидантную активность мицелия, определяемую электрогенерированным бромом и иодом, при этом количество антиоксидантов, взаимодействующих с бромом, на порядок превосходит количество антиоксидантов, взаимодействующих с иодом. Наибольший эффект в индукции антиоксидантной активности проявили ДАФС-25 и селенит натрия в самой высокой концентрации, меньшим эффектом обладал L-селеноцистин. Один из механизмов повышения антиоксидантной активности при действии соединений селена – увеличение концентрации аминокислот-антиоксидантов в белках мицелия гриба, а также накопление других метаболитов, обладающих антиоксидантной и антирадикальной активностью [35].

Изучение ростостимулирующих свойств и индукции антиоксидантной активности различными соединениями селена кажется многообещающим. Новые подходы могут найти применение в исследованиях механизмов индукции антиоксидантной активности в различных организмах, биотехнологии и биофортификации (биообогащении) продуктов питания человека.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jitca G., Osz B.E., Tero-Vescan A., Miklos A.P., Rusz C.M., Batrinu M.G., Vari C.E. // *Antioxidants*. 2022. V. 11. P. 1–30. <https://doi.org/10.3390/antiox11030572>
2. Блиохватов А.Ф., Денисова Г.В., Ильин Д.Ю. // *Селен в биосфере* / Под ред. Блиохватова А.Ф. Пенза: Пензенская гос. с.-х. академия, 2001. 322 с.
3. Santessmasses D., Mariotti M., Gladyshev V.N. // *Antioxid. Redox Signal*. 2020. V. 33. P. 525–536. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8044>
4. Zhang Y., Roh Y.J., Han S.J., Park I., Lee H.M., Ok Y.S., Lee B.C., Lee S.R. // *Antioxidants (Basel)*. 2020. V. 9. P. 1–17. <https://doi.org/10.3390/antiox9050383>
5. Sies H. // *Free Radic. Biol. Med.* 1993. V. 14. P. 313–323. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90028-s](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90028-s)
6. Блиохватов А.Ф. // 9-*R*-сим-нонагидро-10-окса(халькогена) антрацены и соли 9-*R*-сим-октагидро-10-оксония (халькогенония) антрацена: дисс. докт. хим. наук. Саратов, 1993. 378 с.
7. Древо Б.И. // Патент RU 2051681 C1, 1996.
8. Полубояринов П.А., Голубкина Н.А. // *Физиология растений*. 2015. Т. 62. С. 396–403. [Poluboyarinov P.A., Golubkina N.A. // *Russ. J. Plant Physiol.* 2015. V. 62. P. 367–374.] <https://doi.org/10.1134/S1021443715030164>
9. Castillo-Godina R.G., Foroughbakhch-Pournavab R., Benavides-Mendoza A. // *J. Agr. Sci. Tech.* 2016. V. 18. P. 233–244.
10. Bebien M., Lagniel G., Garin J., Touati D., Vermeglio A., Labarre J. // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. P. 1556–1564. <https://doi.org/10.1128/jb.184.6.1556-1564.2002>
11. Строгов В.В., Родионова Т.Н. // *Вестник ветеринарии*. 2011. Т. 59. С. 150–152.
12. Wang H.W., Cai D.B., Xiao G.H., Zhao C.L., Wang Z.H., Xu H.M., Guan Y.Q. // *Israeli J. Aquacult. - Bamidgeh*. 2009. V. 61. P. 322–332.
13. Боряев Г.И., Гаврюшина И.В., Федоров Ю.Н. // *С.-х. биол.* 2010. Т. 45. С. 65–70.
14. Dzobo K., Naik Y.S. // *South African J. Sci.* 2013. V. 109. P. 1–8. <https://doi.org/10.1590/sajs.2013/965>
15. Golubkina N., Zamana S., Seredin T., Poluboyarinov P., Sokolov S., Baranova H., Krivenkov L., Pietrantonio L., Caruso G. // *Plants (Basel)*. 2019. V. 8. P. 102. <https://doi.org/10.3390/plants8040102>
16. Misra S., Kwong R.W.M., Niyogi S. // *J. Exp. Biol.* 2012. V. 215. P. 1491–1501. <https://doi.org/10.1242/jeb.062307>
17. Полубояринов П.А., Елистратов Д.Г., Швец В.И. // *Тонк. химич. технол.* 2019. Т. 14. С. 5–24.
18. Casalbore G., Mastragostino M., Valcher S. // *J. Electroanal. Chem.* 1978. V. 87. P. 411–418.
19. Абуллин И.Ф., Будников Г.К. // *Заводская лаб.* 1998. Т. 64. С. 1–12.
20. Ramussen B., Sorensen A., Goffredsen H., Pittelkow M. // *Chem. Commun.* 2014. V. 50. P. 3716–3718. <https://doi.org/10.1039/C4CC00523F>
21. *Sulfur in Organic and Inorganic Chemistry* / Ed. Senning A. New York: Marcel Dekker, 1972.
22. Pleasants J.C., Guo W., Rabenstein D.L. // *J. Am. Chem. Soc.* 1989. V. 111. P. 6553–6558.
23. Hondal R.J., Ruggles E.L. // *Amino Acids*. 2011. V. 41. P. 73–89. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0494-6>
24. Блиохватов А.Ф., Денисова Г.В., Иванов А.И., Ильин Д.Ю. // *Микология и фитопатол.* 2000. Т. 34. С. 42–45.
25. Князева О.Е., Полубояринов П.А. // В сб. *Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии. Межвузовский сборник научных трудов XIV Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием. Саратов, 2020.* С. 64–67.
26. Kieliszek M., Blazejak S., Bzducha-Wrobel A., Kot A.M. // *Biol. Trace Elem. Res.* 1989. V. 187. P. 316–327.
27. Szabados L., Savoure A. // *Trends Plant Sci.* 2010. V. 15. P. 89–97.
28. Yuan L., Zhang R., Ma X., Yang L., Zheng Q., Chen D., Li M., Fan T., Liu Y., Pan L., Yin X. // *Nutrients*. 2018. V. 10. P. 318. <https://doi.org/10.3390/nu10030318>
29. Чикин Ю.А., Лихачев А.Н. // *Микология и фитопатология*. 1997. Т. 31. № 4. С. 54–61.
30. Полубояринов П.А., Моисеева И.Я., Микуляк Н.И., Голубкина Н.А., Каплун А.П. // *Изв. высших учебных заведений. Сер. Химия и химич. технол.* 2022. Т. 65. С. 19–29. <https://doi.org/10.6060/ivkkt.20226502.6466>
31. Полубояринов П.А., Голубкина Н.А., Аниськов А.А., Моисеева И.Я., Глебова Н.Н., Швец В.И. // *Биоорг. химия*. 2019. Т. 45. С. 365–373. [Poluboyarinov P.A., Golubkina N.A., Aniskov A.A., Moiseeva I.J., Glebova N.N., Shvets V.I. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 241–247.] <https://doi.org/10.1134/S1068162019040083>
32. Лапин А.А. // МВИ-001-44538054-07. Суммарная антиоксидантная активность. Методика выполнения измерений на кулонометрическом анализаторе. Жердевка: ООО Концерн “Отечественные инновационные технологии”, 2011. 35 с.
33. Минеев В.Г., Сычев В.Г., Амелянчик О.А., Большаева Т.Н., Гомонова Н.Ф., Дурынина Е.П., Егоров В.С., Егорова Е.В., Едемская Н.Л., Карпова Е.А., Прижукова В.Г. // *Практикум по агрохимии*. Москва: изд-во МГУ, 2001. 689 с.
34. М-04-38-2009. Методика определения протеиногенных аминокислот в кормах и сырье. ООО “Люмэкс-маркетинг”. СПб., 2014. 49 с.
35. Панкратов А.Н., Цивилева О.М., Белобородая А.С., Цымбал О.А., Древо Я.Б. // *Изв. Саратовского ун. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология*. 2017. Т. 17. № 3. С. 286–298.

## Induction of the Antioxidant Activity by Selenium Compounds in the *Aspergillus niger* Mycelium

P. A. Poluboyarinov<sup>\*, #</sup>, A. V. Kuznetsova<sup>\*</sup>, I. Ya. Moiseeva<sup>\*</sup>, N. I. Mikulyak<sup>\*</sup>, and A. P. Kaplun<sup>\*\*</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (950) 230-48-76; e-mail: poluboyarinovpavel@yandex.ru

<sup>\*</sup>Penza State University, ul. Krasnaya 40, Penza, 440026 Russia

<sup>\*\*</sup>MIREA – Russian Technological University (Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies),  
Leningradskiy prosp. 80/5, Moscow, 125190 Russia

Investigation of the antioxidant activity (AOA) induction by selenium compounds ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , diacetophenonyl selenide (DAPS-25), L-selenocystine) in various organisms is interesting as a protection from stress induced cell membranes damages. A comparative analysis of the antioxidant activity of 23 amino acids was performed by coulometric titration with electrogenerated bromine and iodine. The activity decreases in the order: cystine > tryptophan > selenocystine > tyrosine > 3,3'-dimethyl-L-selenocystine > methionine. Only amino acids with sulfhydryl and selenol groups as more active reductants can interact with the electrogenerated iodine: cysteine > selenocysteine > threo-3-methyl-L-selenocysteine. Probably the correction of the antioxidant status at the amino acids level is based on the sulfhydryl and selenol groups in radicals. In case they are not enough, cystine, selenocystin, tryptophan, tyrosine, and methionine will act as scavenger-reductants. It was found that selenium compounds dose-dependently induce the total antioxidant activity of the *A. niger* mycelium and affect indicators of the antioxidant status (amino acid composition and catalase activity), which in turn stimulates the biomass accumulation. DAPS-25 and sodium selenite treatment at the high doses (0.025 mg Se/L) caused the greatest effect on the total AOA induction (3.4–5.5 times). Lower concentrations (0.0025–0.00025 mg Se/L) had a lesser effect (25.8–41.7%). Activity in samples with L-selenocystin increased by 1.6–43.3%. It is noted that the iodine antioxidant activity in the mycelium was generally lower than the bromine one.

*Keywords: selenium compounds, antioxidant activity, catalase, mycelium*



УДК 577.29

## БИОЛОГИЧЕСКИЙ МИКРОЧИП ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗ 1 И 2

© 2023 г. В. О. Варачев\*, Д. А. Гуськов\*, А. П. Шехтман\*\*, Д. В. Рогожин\*\*, С. А. Поляков\*, А. В. Чудинов\*, А. С. Заседателев\*, Т. В. Наседкина\*<sup>\*,#</sup>

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

\*\*Российская детская клиническая больница ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России,  
Россия, 119117 Москва, Ленинский просп., 117

Поступила в редакцию 08.12.2022 г.

После доработки 13.12.2022 г.

Принята к публикации 14.12.2022 г.

Мутации в генах изоцитратдегидрогеназ 1 и 2 (*IDH1* и *IDH2*) – важные диагностические и прогностические маркеры при целом ряде опухолей (хондроидные опухоли, опухоли головного мозга, лейкемии). Для определения мутаций в генах *IDH1/2* разработан метод аллель-специфичной гибридизации на биологическом микрочипе, позволяющий определять наличие мутации в образце опухоли (хондроидные опухоли, глиобластома) и вариант нуклеотидной замены. При сравнении методов определения мутаций *IDH1/2* с помощью биологического микрочипа и анализа кривых плавления с TaqMan-зондом получено полное совпадение результатов, при этом метод с использованием биочипа позволяет не только выявлять наличие мутантного генотипа, но и идентифицировать тип нуклеотидной замены без дополнительного этапа секвенирования.

*Ключевые слова:* изоцитратдегидрогеназа 1 и 2, мутации, глиобластома, хондроидные опухоли, диагностика, биологический микрочип

**DOI:** 10.31857/S0132342323050093, **EDN:** ABXFZT

### ВВЕДЕНИЕ

Мутации в генах изоцитратдегидрогеназ 1 и 2 (*IDH1* и *IDH2*) играют существенную роль в развитии ряда опухолей (глиомы, хондроидные опухоли, лейкемии) и представляют интерес в целях диагностики и выбора терапии [1]. Изоцитратдегидрогеназы участвуют в окислительном декарбоксилировании изоцитрата, превращая его в  $\alpha$ -кетоглутарат, промежуточный продукт цикла Кребса. Соматические мутации в генах *IDH1* и *IDH2* представляют собой гетерозиготные нуклеотидные замены в каталитическом домене, приводящие к потере нормальной функциональной активности фермента, снижению уровня  $\alpha$ -кетоглутарата и образованию 2-гидроксиглутарата, обладающего онкогенной активностью [2]. Мутации в гене *IDH1* происходят в кодоне R132, причем при глиомах >90% мутаций связано с заменой аргинина на гистидин (R132H), в то время как при хондроидных опухолях наблюдают более широкий спектр аминокислотных замен [3, 4]. В

гене *IDH2* мутации затрагивают кодон R172, чаще всего происходит замена аргинина на лизин (R172K). Мутации в гене *IDH1* встречаются гораздо чаще по сравнению с мутациями в гене *IDH2* и составляют >95% всех случаев мутантного генотипа *IDH1/2* [4]. Мутации генов *IDH1/2* – одни из наиболее значимых и клинически актуальных маркеров в современной онкологии, прежде всего, в нейроонкологии.

Прямое секвенирование – “золотой” стандарт в оценке мутационного статуса генов *IDH1/2*. Однако чувствительность этого метода зависит от качества образца, кроме того, порог обнаружения мутантной ДНК на фоне ДНК дикого типа составляет ~25% [5]. Иммуногистохимический анализ (ИГХ) требует разработки специфических антител для определения типа мутации, также наблюдаются гетерогенность окрашивания препаратов и перекрестная реактивность антител [5]. Такие методы определения мутаций, как пиросеквенирование [6] или основанный на ПЦР метод SNaPshot [7], применяются в клинической практике, но не имеют значительных преимуществ по сравнению с традиционным секвенированием. Метод плавления ДНК с использованием TaqMan-зондов

Сокращения: IDH – изоцитратдегидрогеназа; ИГХ – иммуногистохимический анализ.

# Автор для связи: (тел.: +7 (495) 135-98-46; эл. почта: tanased06@biochip.ru).

позволяет определять мутации с чувствительностью 5%, однако для идентификации нуклеотидной замены дополнительно требуется секвенирование по Сэнгеру [8]. Биологические микрочипы – эффективный диагностический инструмент для анализа мутаций в геноме человека. Ранее были разработаны биочипы для определения соматических мутаций при раке легкого, меланоме, колоректальном раке [9, 10].

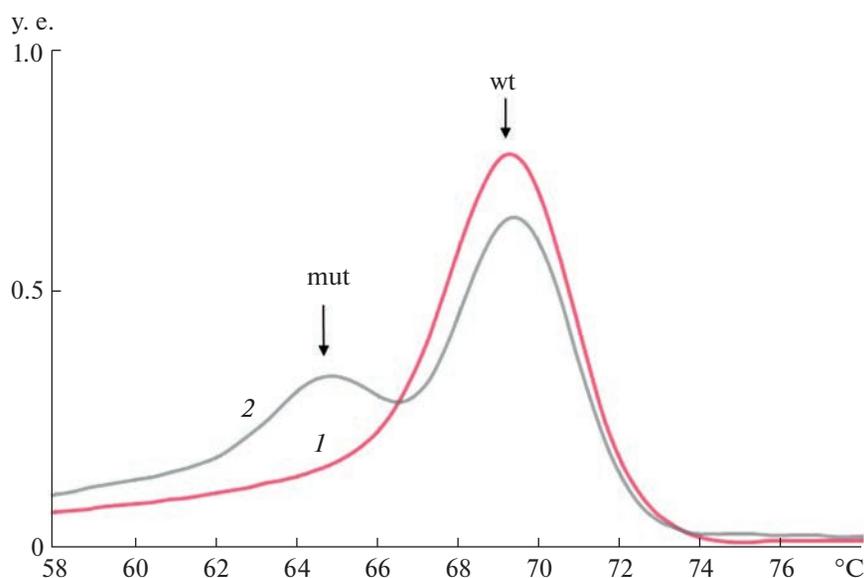
Цель данного исследования – разработка биологического микрочипа для определения соматических мутаций в генах *IDH1/2* на основе комбинации ПЦР и аллель-специфичной гибридизации с иммобилизованными зондами, его апробации и сравнительном анализе с альтернативными методами определения мутаций. Для апробации биочипа использовали контрольные образцы ДНК, выделенные из парафинизированной ткани хондральных опухолей и глиобластомы. Проведен сравнительный анализ определения мутаций *IDH1/2* с помощью биочипа и метода плавления ДНК с использованием TaqMan-зондов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

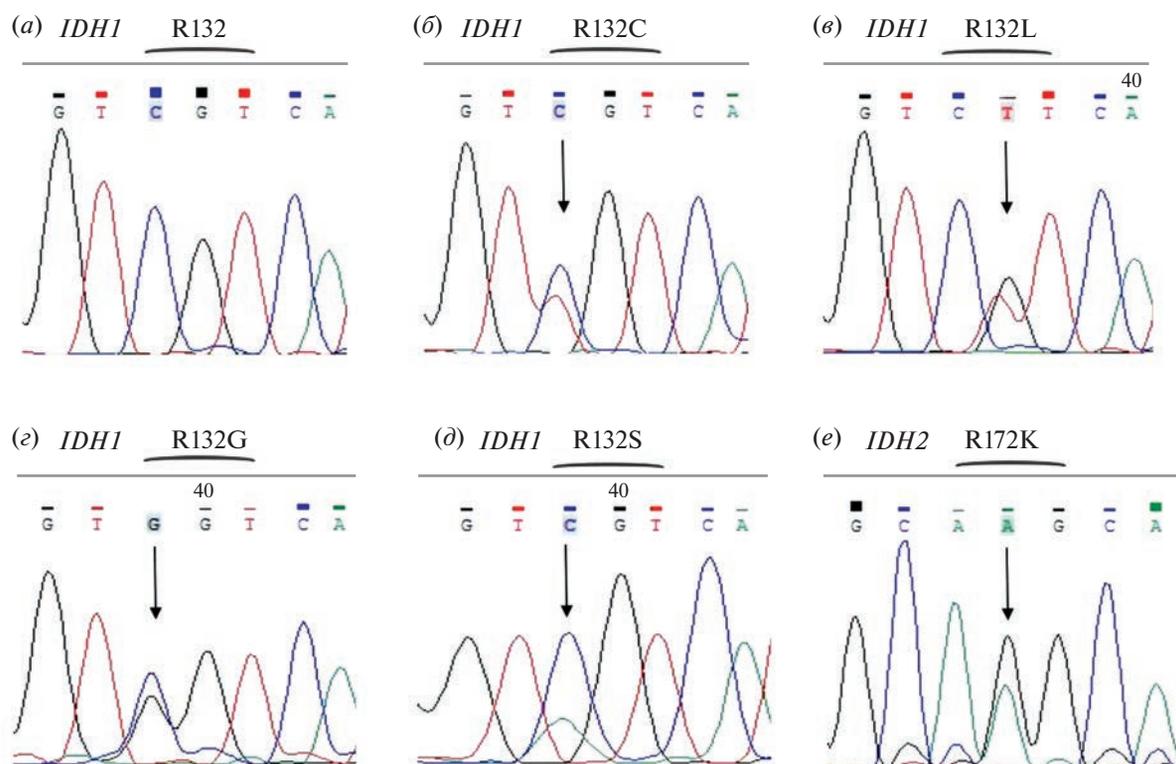
Была сформирована коллекция контрольных образцов ДНК, выделенных из тканей хондральных опухолей и глиобластомы, заключенных в парафиновые блоки. Для определения мутационного статуса генов *IDH1/2* использовали модифицированный метод анализа кривых плавления ДНК с TaqMan-зондами. В качестве зондов были выбраны олигонуклеотиды длиной 29 нт (ген *IDH1*) и 18 нт (ген *IDH2*), комплементарные

участку ДНК, в котором находится мутация, и содержащие на концах молекулы флуорофора (ROX) и гасителя флуоресценции (BHQ2). Проводили асимметричную ПЦР для участков генов *IDH1* и *IDH2*, далее продукты ПЦР подвергали плавлению в присутствии TaqMan-зондов. Кривые плавления позволяют отличить полностью комплементарные гомодуплексы (гибрид зонда с последовательностью дикого типа) и частично комплементарные гетеродуплексы (гибрид зонда с мутантной последовательностью). Симметричный пик плавления указывает на наличие в образце ДНК одной определенной последовательности, дополнительный пик с более низкой температурой плавления свидетельствует о присутствии мутантной последовательности. В качестве примера приведены кривые плавления для образца с генотипом дикого типа и мутантным генотипом для гена *IDH1* (рис. 1).

При выявлении мутации в образце далее проводили секвенирование по Сэнгеру для определения типа нуклеотидной замены. Результаты секвенирования образцов с мутациями генов *IDH1* и *IDH2* представлены на рис. 2. Таким образом, была сформирована выборка из 15 контрольных образцов, которая включала шесть образцов с генотипами дикого типа по R132 (ген *IDH1*) и R172 (ген *IDH2*), восемь образцов с мутациями гена *IDH1* (по два образца с генотипом R132H, R132C, R132L и по одному с R132G и R132S) и один образец с мутацией гена *IDH2* R172K. Мутации генов *IDH1* и *IDH2* – взаимоисключающие.



**Рис. 1.** Кривые плавления ПЦР-продукта гена *IDH1* в присутствии TaqMan-зонда: 1 – образец с генотипом дикого типа, 2 – образец с мутацией. Отмечены пики флуоресценции, соответствующие последовательности дикого типа (wt) и мутантной последовательности (mut).



**Рис. 2.** Определение мутаций в кодоне R132 гена *IDH1* и кодоне R172 гена *IDH2* методом секвенирования по Сэнгеру: (а) – генотип дикого типа гена *IDH1*; (б) – мутация *IDH1* R132C (замена аргинина на цистеин); (в) – мутация *IDH1* R132L (замена аргинина на лейцин); (г) – мутация *IDH1* R132G (замена аргинина на глицин), (д) – мутация *IDH1* R132S (замена аргинина на серин), (е) – мутация *IDH2* R172K (замена аргинина на лизин). Пики, соответствующие мутациям, отмечены стрелками.

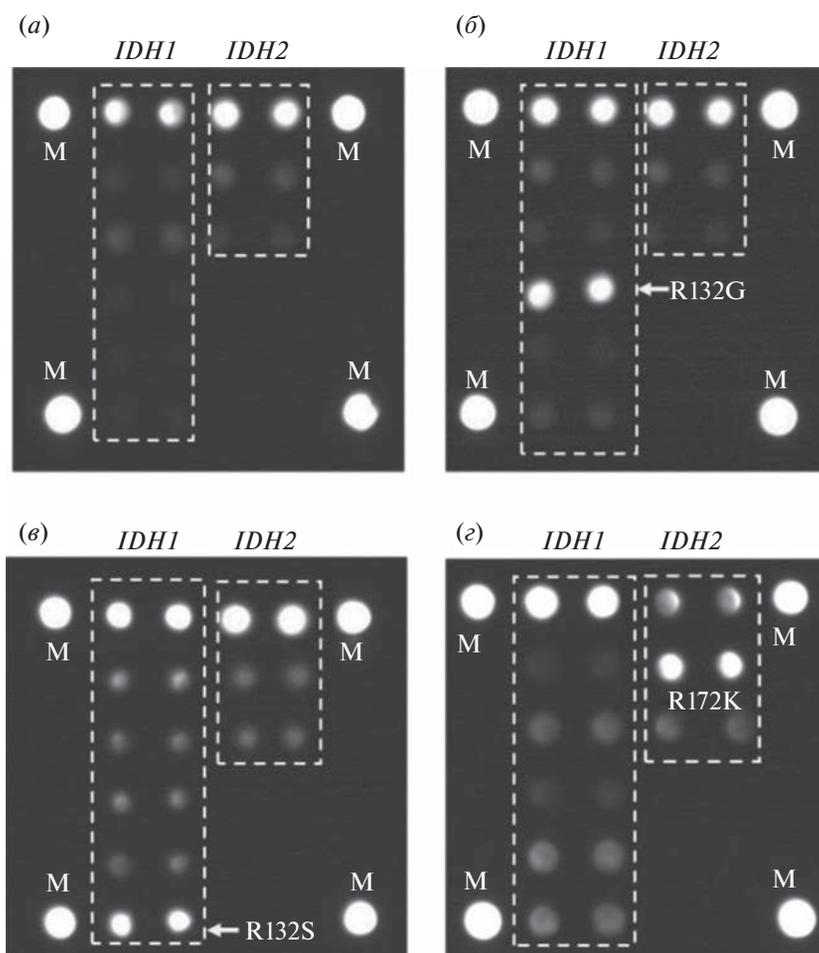
В дальнейшем контрольные образцы использовали для оптимизации работы биологического микрочипа. Для определения мутаций *IDH1/2* проводили двухэтапную “гнездовую” ПЦР с включением на втором этапе меченого дезоксиуридинфосфата (Cy5-dUTP) в растущую цепь ДНК. Флуоресцентно-меченый ПЦР-продукт гибридизовали на биочипе с иммобилизованными зондами. На рис. 3 представлены примеры картин гибридизации с различными генотипами гена *IDH1* и гена *IDH2*. В ходе разработки метода варьировали условия ПЦР, последовательности праймеров и иммобилизованных зондов для достижения однозначно интерпретируемых результатов гибридизации. Результаты определения мутаций на биочипе совпали с результатами, полученными с помощью анализа кривых плавления с TaqMan-зондом, при этом биочип позволяет сразу идентифицировать вариант нуклеотидной (и, соответственно, аминокислотной) замены. Это дает возможность проводить анализ без дополнительного этапа секвенирования в отличие от метода плавления ДНК с TaqMan-зондом [8]. Также метод с использованием биочипов имеет определенные преимущества перед методом ИГХ с моноклональными антителами [5], т.к. позволяет в одной

пробирке проводить одновременный анализ на наличие всех возможных мутаций в обоих генах. Использование в ИГХ-анализе поликлональных антител не дает возможности определить тип мутации, а также анализировать мутации сразу в двух генах *IDH1* и *IDH2*.

Исследованные образцы ДНК были выделены из парафиновых срезов участков опухолевой ткани, выбранных под гистологическим контролем, и содержали не менее 15–20% опухолевых клеток. Дальнейшее развитие метода анализа на разработанном *IDH*-биочипе предполагает использование блокирующих олигонуклеотидов на этапе ПЦР для подавления амплификации ДНК дикого типа [10, 11]. Это позволит повысить аналитическую чувствительность метода до выявления 0.5% опухолевой ДНК в образце, что делает принципиально возможным применение метода аллель-специфичной гибридизации на биочипе в жидкостной биопсии [12].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Образцы.** В исследование было включено 15 пациентов: 13 пациентов с краниальными хондроидами опухолями (хондросаркома) в воз-



**Рис. 3.** Гибридационные картины образцов ДНК опухолей, полученные на биочипе: (а) – генотип дикого типа *IDH1* R132, *IDH2* R172; (б) – в образце опухоли присутствует мутация *IDH1* R132G (замена аргинина на глицин); (в) – мутация *IDH1* R132S (замена аргинина на серин), (г) – мутация *IDH2* R172K (замена аргинина на лизин). Пунктирными линиями обозначены области расположения иммобилизованных зондов для генов *IDH1* и *IDH2*. М – маркер (ячейка содержит цианиновый краситель Cy-5).

расте от 17 до 54 лет и 2 пациента с глиобластомой, возраст 42 и 63 года. Материал опухоли фиксировали 4%-ным раствором формальдегида и заключали в парафиновые блоки по стандартной методике приготовления гистологических препаратов.

**Выделение ДНК.** ДНК выделяли из парафиновых срезов опухолевых тканей с использованием набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Германия) по протоколу производителя.

**ПЦР с использованием TaqMan-зонда.** Для проведения ПЦР в реальном времени и определения профиля плавления ПЦР-продукта использовали модификацию метода, описанного ранее [8]. Определение мутаций в генах *IDH1* и *IDH2* проводили в различных пробирках. При подборе праймеров использовали программу Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Последовательности праймеров и зондов: *IDH1*

F – 5'-AAAATATCCCCCGGCTTGTGA-3', R – 5'-GCAAAATCACATATTGCCAACA-3', зонд 5'-ROX-CCCATAAGCATGACGACCTATGATGATAG-BHQ2-3'; *IDH2* F – 5'-AAACATCCCACG-CCTAGTCC-3', R – 5'-AAAGTCTGTGGCCTTG-TACTGC-3', зонд 5'-ROX-TGGGCGTGCCTGCSAATG-BHQ2-3' (подчеркнуты кодоны, соответствующие аргинину в положении 132 в гене *IDH1* и 172 в гене *IDH2*). Реакцию проводили в амплификаторе LightCycler 96 (Roche, Швейцария) для обеих пар праймеров: 95°C – 5 мин, далее (95°C – 13 с, 57°C – 40 с, 72°C – 20 с) × 53 цикла; плавление продуктов ПЦР: 95°C – 1 мин, 55°C – 4 мин, далее от 55 до 90°C повышение температуры на 0,2°C при каждом шаге с продолжительностью шага 12 с. Секвенирование по Сэнгеру проводили на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США).

**Таблица 1.** Последовательности зондов, иммобилизованных на биочипе

| № | Ген         | Название зонда | Участок последовательности зонда, содержащий мутацию (5'–3') | Длина, нт |
|---|-------------|----------------|--|-----------|
| 1 | <i>IDH1</i> | IDH1-wt        | TCATAGGTCGTCATGCTT-NH <sub>2</sub>                           | 18        |
| 2 |             | IDH1-R132H     | STCATAGGTCATCATGCTT-NH <sub>2</sub>                          | 19        |
| 3 |             | IDH1-R132C     | STCATAGGTGTCATGCTT-NH <sub>2</sub>                           | 19        |
| 4 |             | IDH1-R132G     | TCATAGGTGGTCATGCTT-NH <sub>2</sub>                           | 18        |
| 5 |             | IDH1-R132L     | STCATAGGTCCTCATGCTT-NH <sub>2</sub>                          | 19        |
| 6 |             | IDH1-R132S     | STCATAGGTAGTCATGCTT-NH <sub>2</sub>                          | 10        |
| 7 | <i>IDH2</i> | IDH2-wt        | ATTGGCAGGCACGC-NH <sub>2</sub>                               | 14        |
| 8 |             | IDH2-R172K     | ATTGGCAAGCACGC-NH <sub>2</sub>                               | 14        |
| 9 |             | IDH2-R172S     | ATTGGCAGTCACGC-NH <sub>2</sub>                               | 14        |

Примечание: зонды содержали на 3'-конце аминогруппу (жирным шрифтом выделены кодоны R132 в гене *IDH1* и R172 в гене *IDH2*, нуклеотидная замена подчеркнута).

**Гибридизационный анализ с использованием биочипа.** Для наработки одноцепочечного и флуоресцентно-меченого фрагмента ДНК для гибридизации на биочипе использовали метод “гнездовой” ПЦР в два этапа, как описано ранее [9]. В ходе первого этапа происходила наработка двухцепочечного продукта, на втором этапе использовали в качестве матрицы продукт первого этапа и проводили асимметричную ПЦР с одновременным включением в ПЦР-продукт флуоресцентной метки в виде Су5-dUTP. Флуоресцентно-меченый продукт второго этапа ПЦР гибридизовали на биочипе. Биочипы изготавливали методом фотоиндуцируемой совместной полимеризации олигонуклеотидов и компонентов акриламидного геля, как описано ранее [13]. Гибридизацию флуоресцентно-меченого продукта на биочипе проводили в условиях, описанных ранее [10]. Флуоресцентные сигналы регистрировали с помощью анализатора биочипов, анализ изображения проводили с помощью программы ImaGeWare (ООО “БИОЧИП-ИМБ”, Россия). Последовательности праймеров 1-го и 2-го этапов ПЦР для генов *IDH1* и *IDH2* могут быть предоставлены авторами по запросу. Последовательности зондов, иммобилизованных на биочипе, приведены в табл. 1.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан метод определения соматических мутаций с использованием биологического микрочипа, который позволяет проводить одновременный анализ на наличие мутаций в генах *IDH1/2* в образцах различных опухолей (хондродисплазии, глиобластомы), в том числе в фиксированных формалином парафинизированных тканях. При сравнении с методом анализа кривых плавления с TaqMan-зондом показано, что метод с использованием биочипа не менее

специфичен, при этом биочип позволяет не только выявлять наличие мутантного генотипа, но и идентифицировать вариант нуклеотидной замены без дополнительного этапа секвенирования. Дальнейшее развитие этого направления предполагает повышение аналитической чувствительности метода биочипов для применения в жидкостной биопсии.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00304).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От всех пациентов получено письменное добровольное информированное согласие на использование результатов исследования в обезличенной форме в научных целях.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dang L., White D.W., Gross S., Bennett B.D., Bittinger M.A., Driggers E.M., Fantin V.R., Jang H.G., Jin S., Keenan M.C., Marks K.M., Prins R.M., Ward P.S., Yen K.E., Liaw L.M., Rabinowitz J.D., Cantley L.C., Thompson C.B., Vander Heiden M.G., Su S.M. // Nature. 2009. V. 462. P. 739–744. <https://doi.org/10.1038/nature08617>

2. Cairns R.A., Mak T.W. // *Cancer Discov.* 2013. V. 3. P. 730–741.  
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0083>
3. Chen S., Fritch K., Wei S., Ali N., Curless K., Shen T., Brini A.T., Latif F., Sumathi V., Siegal G.P., Cheng L. // *Hum. Pathol.* 2017. V. 65. P. 239–246.  
<https://doi.org/10.1016/j.humpath.2017.05.015>
4. Hartmann C., Meyer J., Balss J., Capper D., Mueller W., Christians A., Felsberg J., Wolter M., Mawrin C., Wick W., Weller M., Herold-Mende C., Unterberg A., Jeuken J.W., Wesseling P., Reifenberger G., von Deimling A. // *Acta Neuropathol.* 2009. V. 118. P. 469–474.  
<https://doi.org/10.1007/s00401-009-0561-9>
5. Agarwal S., Sharma M.C., Jha P., Pathak P., Suri V., Sarkar C., Chosdol K., Suri A., Kale S.S., Mahapatra A.K., Jha P. // *Neuro Oncol.* 2013. V. 15. P. 718–726.  
<https://doi.org/10.1093/neuonc/not015>
6. Arita H., Narita Y., Matsushita Y., Fukushima S., Yoshida A., Takami H., Miyakita Y., Ohno M., Shibui S., Ichimura K. // *Brain Tumor Pathol.* 2015. V. 32. P. 22–30.  
<https://doi.org/10.1007/s10014-014-0186-0>
7. Perizzolo M., Winkfein B., Hui S., Krulicki W., Chan J.A., Demetrick D.J. // *Brain Pathol.* 2012. V. 22. P. 619–624.  
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2012.00579.x>
8. Табаков Д.В., Катаргин А.Н., Строганова А.М., Сендерович А.И., Насхлеташвили Д.Р., Киселева Н.П. // *Усп. мол. онкол.* 2017. Т. 4. С. 53–59.  
<https://doi.org/10.17650/2313-805X-2017-4-1-53-59>
9. Emelyanova M., Arkhipova K., Mazurenko N., Chudinov A., Demidova I., Zborovskaya I., Lyubchenko L., Zasedatelev A., Nasedkina T. // *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2015. V. 23. P. 255–265.  
<https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000084>
10. Emelyanova M., Ghukasyan L., Abramov I., Ryabaya O., Stepanova E., Kudryavtseva A., Sadritdinova A., Dzhu-makova C., Belysheva T., Surzhikov S., Lyubchenko L., Zasedatelev A., Nasedkina T. // *Oncotarget.* 2017. V. 8. P. 52304–52320.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.17014>
11. Lee D., Suh Y.L., Kang S.Y., Park T.I., Jeong J.Y., Kim S.H. // *Brain Pathol.* 2013. V. 23. P. 285–293.  
<https://doi.org/10.1111/bpa.12000>
12. Emelyanova M.A., Telysheva E.N., Orlova K.V., Ryabaya O.O., Snigiryova G.P., Abramov I.S., Mikhailovich V.M. // *Cancer Genet.* 2021. V. 250–251. P. 25–35.  
<https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2020.11.005>
13. Gryadunov D.A., Shaskolskiy B.L., Nasedkina T.V., Rubina A.Y., Zasedatelev A.S. // *Acta Naturae.* 2018. V. 10. P. 4–18.  
<https://doi.org/10.32607/20758251-2018-10-4-4-18>

## Biological Microarray for Detection of Somatic Mutations in the Genes of Isocitrate Dehydrogenase 1 and 2

**V. O. Varachev\***, **D. A. Guskov\***, **A. P. Shekhtman\*\***, **D. V. Rogozhin\*\***, **S. A. Polyakov\***,  
**A. V. Chudinov\***, **A. S. Zasedatelev\***, and **T. V. Nasedkina\*.\***

\*Phone: +7 (495) 135-98-46; e-mail: [tanased06@rambler.ru](mailto:tanased06@rambler.ru)

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

\*\*Russian Children's Clinical Hospital, Leninsky prosp. 117, Moscow, 119117 Russia

Mutations in isocitrate dehydrogenases 1 and 2 (IDH1 and IDH2) genes are important diagnostic and prognostic markers in a number of tumors (chondroid tumors, brain tumors, leukemia). To determine mutations in the *IDH1/2* genes the method of allele-specific hybridization on a biological microarray was developed, which makes it possible to determine the presence of a mutation in a tumor sample (chondroid tumors and glioblastoma) and the variant of nucleotide substitution. When comparing *IDH1/2* mutation detection methods using a biological microarray and DNA melting analysis with a TaqMan probe, full coincidence of results was obtained, with the biochip method making it possible to determine the type of nucleotide substitution without an additional sequencing step.

*Keywords:* isocitrate dehydrogenase 1 and 2, mutations, glioblastoma, chondroid tumors, diagnosis, biological microarray



УДК 57.083.24;578.53

## ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2 ПО КОНСЕРВАТИВНОМУ УЧАСТКУ E-ГЕНА

© 2023 г. С. А. Лапа\*, #, А. А. Шингарева\*, Е. Б. Файзулов\*\*, Ю. И. Аммура\*\*,  
В. Е. Шершов\*, А. В. Чудинов\*

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

\*\*НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Россия, 115088 Москва, ул. 1-я Дубровская, 15

Поступила в редакцию 01.11.2022 г.

После доработки 13.12.2022 г.

Принята к публикации 16.12.2022 г.

Появление мутаций в генах, кодирующих поверхностные белки коронавируса нового типа SARS-CoV-2, при его циркуляции в популяции хозяина затрудняет применение моноклональных антител для видовой идентификации данного вируса. В таких случаях выбор консервативных генетических мишеней позволяет осуществлять идентификацию молекулярно-биологическими методами. В настоящей работе проведено тестирование разработанных ранее праймеров, специфичных к фрагменту E-гена, для выявления коронавируса нового типа на шести изолятах, принадлежащих различным генетическим вариантам SARS-CoV-2 (исходный уханьский геновариант, дельта и омикрон). Выбор консервативного участка E-гена (E gene, кодирующий малый трансмембранный белок E) в качестве мишени для обратной транскрипции с последующей амплификацией (ОТ-ПЦР) позволил детектировать коронавирус SARS-CoV-2 вне зависимости от его генетических вариантов, характеризующихся антигенной разнородностью по N- и S-белкам. Показана возможность видового определения различных вариантов возбудителя COVID-19, циркулирующих в России, как в общем реакционном объеме (в пробирке), так и на биологических микрочипах (гелевых и щеточных).

*Ключевые слова:* ОТ-ПЦР, SARS-CoV-2, видовая идентификация, иммобилизованные праймеры, биологические микрочипы

DOI: 10.31857/S0132342323040358, EDN: ODHDFE

### ВВЕДЕНИЕ

Коронавирус нового типа SARS-CoV-2, подобно другим РНК-содержащим вирусам, обладает высокой генетической пластичностью и образует множество новых серотипов в результате воздействия внешних факторов (циркуляция в популяции хозяина, смена хозяина, селекционное воздействие иммунной системы и лекарственной терапии) [1]. Изменение эпитопов в структурных белках (в случае коронавируса это, в первую очередь, S- и N-белки [2]) затрудняет идентификацию вируса иммунологическими методами. Предположительно, белки, в меньшей степени входящие в прямой контакт с иммунной системой хозяина, мутируют менее интенсивно, но при этом их ИФА-детекция затруднена по причине меньшей доступности для антител. Детекция

генетических последовательностей, соответствующих консервативным антигенам, в данном случае выступает методом выбора для создания надежных систем молекулярной диагностики.

Ранее в процессе разработки системы идентификации бактериальных и вирусных агентов, вызывающих пневмонию [3], для идентификации коронавируса SARS-CoV-2 нами был выбран E-ген, кодирующий трансмембранный белок E, играющий важную роль в патогенности вируса и передаче сигналов при попадании в клетку. Консервативный участок белка E, мотив  $\beta$ -coil- $\beta$  СТ-области, принимает участие в фолдинге белка E в комплексе Гольджи. Вероятно, относительная консервативность белка E связана с резким ослаблением вируса при возникновении мутаций, снижающих его сродство к пальмитолитическому белку [4].

В настоящей работе проведено тестирование праймеров, видоспецифичных к коронавирусу SARS-CoV-2, на шести изолятах, относящихся к различным генетическим вариантам – исходному уханьскому штамму Wuhan-Hu-1, а также линиям B.1.1.529 (омикрон) и B.1.617.2 (дельта). Цель насто-

Сокращения: COVID-19 – коронавирусная инфекция 2019 года; SARS-CoV-2 – коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2; ОТ-ПЦР – обратная транскрипция с полимеразной цепной реакцией.

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

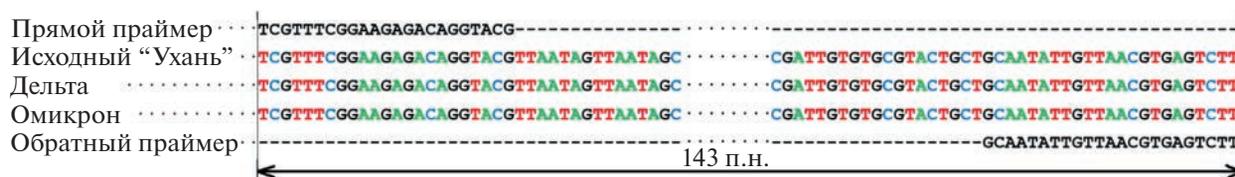


Рис. 1. Выравнивание последовательностей фрагмента *E*-гена (Envelope protein gene) различных генетических линий SARS-CoV-2.

ящего исследования заключалась не в дифференциации различных генетических линий SARS-CoV-2, а в проверке надежности идентификации данного вируса на уровне вида в мультиплексной системе анализа возбудителей клинически сходных респираторных заболеваний.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами была создана диагностическая система, основанная на мультиплексной ОТ-ПЦР с применением специально сконструированных видоспецифичных праймеров [3]. Система предназначена для идентификации шести бактериальных и двух вирусных возбудителей. В качестве вирусных возбудителей выбраны актуальные вирусы гриппа А и В (вызывают сезонные ОРВИ), а также коронавирус нового типа SARS-CoV-2. При конструировании праймеров для идентификации вирусных возбудителей были выбраны консервативные генетические мишени, менее подверженные влиянию внешних факторов, определяющих генетическую вариабельность этих вирусов (в случае коронавируса – *E*-ген).

Мониторинг новых генетических вариантов SARS-CoV-2 (>50 последовательностей по базе данных GenBank) показал полное теоретическое совпадение последовательностей праймеров и выбранной генетической мишени. Результаты выравнивания последовательностей фрагмента

*E*-гена приведены на рис. 1. В качестве примера приведено только по одной последовательности для каждой линии.

В работе проанализировано шесть образцов коронавируса SARS-CoV-2 (табл. 1). Представлены основные выделенные штаммы вариантов, вызывающих в настоящее время вспышки заболевания COVID-19 в России и в мире, а также относящихся к “вариантам, вызывающим беспокойство” (“variants of concern”), согласно классификации ВОЗ.

Исследована специфичность праймеров при концентрациях РНК в исследуемом образце в интервале  $10^2$ – $10^6$  копий/мкл. Кроме того, использованы бактериальные ДНК шести возбудителей пневмонии (всего 30 штаммов), а также РНК вирусов гриппа А и В (три образца). Ложноположительных результатов при проверке специфичности праймеров не наблюдали (данные не приведены).

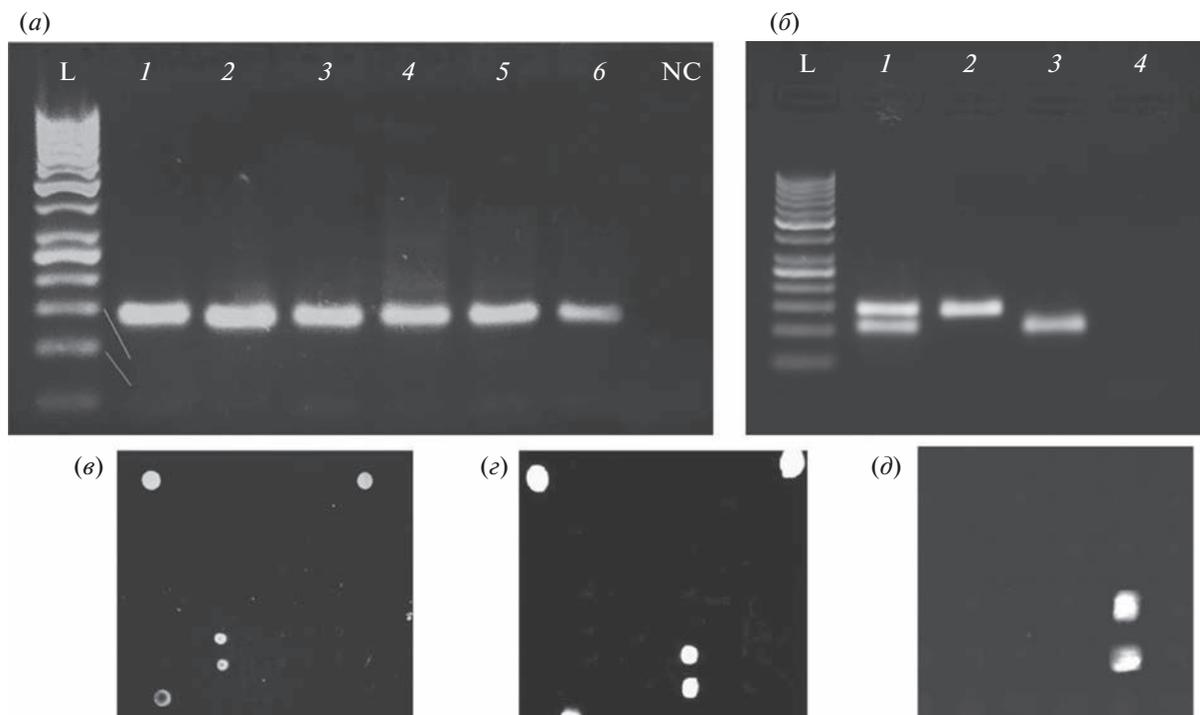
На рис. 2 показан электрофоретический анализ продуктов ОТ-ПЦР для указанных в табл. 1 штаммов коронавируса, а также сигналы с соответствующих праймеров, иммобилизованных на двух вариантах биологических микрочипов (гелевых и щеточных). Наблюдали специфические результаты ОТ-ПЦР для всех генетических линий, изучаемых в эксперименте (рис. 2а). Ложноположительных результатов при использовании в ка-

Таблица 1. Образцы коронавируса SARS-CoV-2, использованные в работе

| №  | Штамм           | Генетическая линия                            | Пассажный уровень | Титр вируса**,<br>lgТЦД <sub>50</sub> /мл |
|----|-----------------|---|-------------------|---|
| 0* | —               | Уханьский вариант                             | —                 | —   |
| 1  | “Dubrovka”      | Филогенетически близкий к уханьскому варианту | 17                | 7.50                                      |
| 2  | “Proletarskaya” | Дельта  | 3                 | 5.75                                      |
| 3  | “Podolsk”       | Дельта  | 9                 | 6.10                                      |
| 4  | “Otradnoe”      | Омикрон                                       | 6                 | 4.90                                      |
| 5  | “LIA”           | Омикрон                                       | 5                 | 5.90                                      |
| 6  | “Altufjevo”     | Омикрон                                       | 5                 | 5.70                                      |

\* Так называемый “нулевой” образец, использованный при разработке системы [3].

\*\* Титр вируса определяли методом предельных разведений в чувствительной культуре клеток Vero [5].



**Рис. 2.** (а) – Электрофореграмма продуктов амплификации фрагмента *E*-гена образцов коронавируса SARS-CoV-2 после ОТ-ПЦР в общем объеме (в пробирке). Концентрация вирусной РНК в образце –  $10^3$  ед./мкл; 4%-ный агарозный гель, окрашенный бромистым этидием. Обозначения: L – маркер длин продуктов GeneRuler 50 (Thermo Scientific, США), 1 – штамм “Dubrovka”, 2 – штамм “Proletarskaya”, 3 – штамм “Podolsk”, 4 – штамм “Otradnoe”, 5 – штамм “LIA”, 6 – штамм “Altufjevo”, NC – отрицательный контроль; (б) – электрофореграмма продуктов амплификации фрагмента *E*-гена коронавируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа А и В с применением мультиплексной ОТ-ПЦР: L – маркер длин продуктов ДНК GeneRuler 50 bp (Thermo Scientific, США), 1 – модельный образец, содержащий SARS-CoV-2 и вирус гриппа А, 2 – клинический изолят SARS-CoV-2, 3 – клинический изолят вируса гриппа А, 4 – клинический изолят вируса гриппа В (в качестве нецелевой мишени для проверки специфичности праймеров); (в) – результат видового определения SARS-CoV-2 на гидрогелевом биочипе; (г) – результат видового определения вируса гриппа А на гидрогелевом биочипе; (д) – результат видового определения SARS-CoV-2 на шеточном биочипе, фрагмент (во всех случаях ячейки со специфическими зондами дублированы). Сигналы, наблюдаемые на чипе, исходят только от ячеек со специфичными праймерами.

честве образцов бактериальных ДНК, а также РНК вирусов гриппа не зарегистрировано (на рис. 2б представлены данные только для образцов вирусов гриппа). На биочипах также наблюдали специфическую картину идентификации SARS-CoV-2. Для интерпретации результата анализа использовали алгоритм отсеки фоновых сигналов, описанный в работе Sorokin et al. [6], однако даже при визуальном определении результат интерпретировался однозначно, т.к. сигнал нецелевых ячеек был практически неотличим от сигнала фона (рис. 2в–2д).

Таким образом, сконструированные праймеры для ОТ-ПЦР способны идентифицировать представителей основных генетических линий коронавируса SARS-CoV-2, циркулирующих в России, – как в формате реакционной пробирки, так и в составе комплексной системы на биологическом микрочипе.

Следует отметить, что описаны точечные мутации *E*-гена, которые могут приводить к сниже-

нию эффективности тест-систем, основанных на детекции этого гена, хотя и с крайне низкой вероятностью (0.09%) [7]. Фирма Roshe, выступающая разработчиком исследованной в работе Artesi et al. [7] тест-системы cobas® SARS-CoV-2 test, не раскрывает последовательности своих праймеров, что осложняет выявление потенциальных проблем, связанных с их недостаточной специфичностью к новым мутантным вариантам вируса. Данная работа содержит открытые последовательности праймеров, что может облегчить сравнительный анализ различных тест-систем и оптимизировать диагностику коронавирусной инфекции в России.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Штаммы.** Лизаты образцов SARS-CoV-2 (табл. 1) получали смешиванием вирусосодержащей культуральной жидкости с лизирующим буфером согласно инструкции (набор для выделения РНК

МАГНО-Сорб; AmpliSens, Россия). Инактивацию коронавируса SARS-CoV-2 оценивали по наличию или отсутствию цитопатического эффекта на чувствительной культуре клеток Vero. Вирусы гриппа А (штамм А/Panama/2007/99 H3N2, штамм А/Wisconsin/67/05 H3N2) и В (штамм В/Leningrad/179/86) получены из Коллекции микроорганизмов III и IV групп патогенности НИИВС им. И.И. Мечникова. Вирусную геномную РНК выделяли, как описано ранее [3]. Принадлежность каждого штамма к генетической линии ранее установлена секвенированием [5].

Бактериальные ДНК были выделены и деконтаминированы на базе ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (Оболенск, Россия), как описано ранее [3].

**Праймеры.** Множественное выравнивание последовательностей *E*-гена проводили с помощью алгоритма ClustalW ([www.clustal.org](http://www.clustal.org)). Конструирование праймеров осуществляли с использованием сетевого ресурса [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com), анализ специфичности (>100 последовательностей, находящихся в свободном доступе) проводили с помощью алгоритма BLAST (НИН, США) и с применением базы данных GISAID (<https://gisaid.org/>). Нуклеотидные последовательности праймеров, видоспецифичных к коронавирусу SARS-CoV-2: прямой 5'-TCGTTTCG-GAAGAGACAGGTACG-3' (23 нт) и обратный 5'-AAGACTCACGTTAACAATATTGC-3' (23 нт).

Твердофазный синтез олигонуклеотидов осуществляли с помощью автоматического синтезатора ABI 394 DNA/RNA (Applied Biosystems, США) по стандартному регламенту, очистку производили на колонке BDS Hypersil C18 (Thermo, США).

**ОТ-ПЦР в растворе.** Реакцию осуществляли с использованием обратной транскриптазы MMLV (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) и Hot Start Taq-полимеразы (Thermo Scientific, США) в соответствующем буфере на ДНК-амплификаторе MiniCycler (MJResearch, США). Обратную транскрипцию проводили в течение 30 мин при 42°C, после чего осуществляли амплификацию с помощью ПЦР: 95°C – 3 мин (начальная денатурация); 36 циклов: 95°C – 20 с, 65°C – 30 с, 72°C – 30 с; 72°C – 5 мин (завершающая инкубация). Продукты ОТ-ПЦР разделяли в 4%-ном агарозном геле, окрашивали бромистым этидием.

**Биологические микрочипы.** Использовали биочипы, изготовленные по классической гидрогелевой технологии, применяемой в ИМБ РАН [8], а также чипы с ячейками из щеточных полимеров на основе полиакриловой кислоты с иммобилизацией олигонуклеотидных зондов с С6-аминомодификатором ковалентной амидной связью (метод изготовления чипов с ячейками из щеточных полимеров будет опубликован позднее).

**Мультиплексная ОТ-ПЦР в иммобилизованной фазе.** ОТ-ПЦР осуществляли с использованием набора OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, США). Смесь содержала природные dNTPs в концентрации 400 мкМ каждого и праймеры в концентрации 10 мкМ для каждого прямого и 0.1 мкМ для каждого обратного праймера. В качестве флуоресцентного субстрата для полимеразы использовали Cy5-dUTP в концентрации 8 мкМ. Обратную транскрипцию проводили в течение 30 мин при 42°C, после чего осуществляли амплификацию с помощью ПЦР: 95°C – 5 мин (начальная денатурация); 36 циклов: 95°C – 20 с, 64°C – 30 с, 72°C – 40 с; 72°C – 5 мин (завершающая инкубация). Температуру отжига праймеров в иммобилизованной фазе понижали на 1°C (по сравнению с реакцией в растворе) для компенсации слабого хаотропного эффекта при твердофазной амплификации. Считывание флуоресцентного сигнала с микрочипа осуществляли на чип-детекторе (ИМБ РАН, Россия).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показана возможность надежной идентификации циркулирующих в России вариантов коронавируса SARS-CoV-2 с помощью системы ОТ-ПЦР, основанной на применении праймеров, специфичных к консервативному генетическому локусу – фрагменту *E*-гена. Проведена видовая идентификация шести изолятов коронавируса SARS-CoV-2, принадлежащих к различным генетическим линиям, как в общем реакционном объеме (в пробирке), так и с помощью ОТ-ПЦР непосредственно на биологических микрочипах (гидрогелевых и щеточных).

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00287).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Randhawa G.S., Soltysiak M.P.M., El Roz H., de Souza C.P.E., Hill K.A., Kari L. // PLoS One. 2020. V. 15. P. e0232391. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232391>*

2. *Gorbalenya A.E., Baker S.C., Baric R.S., de Groot R.J., Drosten C., Gulyaeva A.A., Haagmans B.L., Lauber C., Leontovich A.M., Neuman B.W., Penzar D., Perlman S., Poon L.L.M., Samborskiy D.V., Sidorov I.A., Sola I., Ziebuhr J.* // *Nat. Microbiol.* 2020. V. 5. P. 536–544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
3. *Лапа С.А., Мифтахов Р.А., Ключихина Е.С., Аммура Ю.И., Благодатских С.А., Шершов В.Е., Заседателев А.С., Чудинов А.В.* // *Мол. биол.* 2021. Т. 55. С. 944–955. [*Lapa S.A., Miftakhov R.A., Klochikhina E.S., Ammur Y.I., Blagodatskikh S.A., Shershov V.E., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V.* // *Mol. Biol.* 2021. V. 55. P. 828–838.] <https://doi.org/10.1134/S0026893321040063>
4. *Lopez L.A., Riffle A.J., Pike S.L., Gardner D., Hogue B.G.* // *J. Virol.* 2008. V. 82. P. 3000–3010. <https://doi.org/10.1128/JVI.01914-07>
5. *Грачёва А.В., Корчевая Е.Р., Кудряшова А.М., Борисова О.В., Петруша О.А., Смирнова Д.И., Чернышова И.Н., Свитич О.А., Зверев В.В., Файзулов Е.Б.* // *Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол.* 2021. Т. 98. С. 253–265. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-136>
6. *Sorokin N.V., Chechetkin V.R., Livshits M.A., Pankov S.V., Donnikov M.Y., Gryadunov D.A., Lapa S.A., Zasedatelev A.S.* // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2005. V. 22. P. 725–734. <https://doi.org/10.1080/07391102.2005.10507039>
7. *Artesi M., Bontems S., Göbbels P., Franckh M., Maes P., Boreux R., Meex C., Melin P., Hayette M.P., Bours V., Durkin K.* // *J. Clin. Microbiol.* 2020. V. 58. P. e01598-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.01598-20>
8. *Rubina A.Yu., Pan'kov S.V., Dementieva E.I., Pen'kov D.N., Butygin A.V., Vasiliskov V.A., Chudinov A.V., Mikheikin A.L., Mikhailovich V.M., Mirzabekov A.D.* // *Anal. Biochem.* 2004. V. 325. P. 92–106. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.10.010>

## Species-Level Identification of SARS-CoV-2 by E Gene Conservative Locus

S. A. Lapa<sup>\*, #</sup>, A. A. Shingareva<sup>\*</sup>, E. B. Faizuloev<sup>\*\*</sup>, Yu. I. Ammour<sup>\*\*</sup>,  
V. E. Shershov<sup>\*</sup>, and A. V. Chudinov<sup>\*</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (495) 135-98-00; e-mail: [lapa@biochip.ru](mailto:lapa@biochip.ru)

<sup>\*</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

<sup>\*\*</sup>Mechnikov Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, ul. 1-ya Dubrovskaya 15, Moscow, 115088 Russia

The appearance of mutations in the genes encoding the surface proteins of the new type of coronavirus SARS-CoV-2, when it circulates in the host population, makes it difficult to use monoclonal antibodies for its species identification. In such cases, the choice of conservative genetic targets allows identification by molecular biological methods. In this work, previously developed primers specific to the E gene fragment were tested to detect a new type of coronavirus on six isolates belonging to different genetic variants (the original Wuhan strain, delta and omicron). The choice of a conservative site of the E gene encoding the small transmembrane protein E as a target for reverse transcription with subsequent amplification (RT-PCR) made it possible to detect coronavirus regardless of its subtypes characterized by antigenic heterogeneity in N- and S-proteins. The possibility of species-level identification of COVID-19 pathogen circulating in Russia is shown, both in the total reaction volume (in a single test tube) and on biological microarrays.

**Keywords:** RT-PCR, SARS-CoV-2, species identification, immobilized primers, biological microchips



УДК 577.112.6;577.322.4

## АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ЦЕНТРЫ СВЯЗЫВАНИЯ ХРОМОФОРА В НЕКОВАЛЕНТНЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ КОМПЛЕКСАХ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОКАЛИНА

© 2023 г. Е. А. Горячева\*, #, И. В. Артемьев\*, С. Ф. Архипова\*, А. В. Россохин\*\*,  
А. Р. Гильванов\*, В. З. Плетнев\*, Н. В. Плетнева\*

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

\*\*Научный центр неврологии, Институт мозга, Россия, 105064 Москва, пер. Обуха, 5

Поступила в редакцию 07.02.2023 г.

После доработки 17.02.2023 г.

Принята к публикации 18.02.2023 г.

Расчетным методом молекулярной механики установлена пространственная организация DiB3 – флуоресцентного нековалентного комплекса генно-инженерного варианта бактериального белка липокалина B1c с синтетическим GFP-подобным хромофором M739. По сравнению с кристаллической структурой родственного комплекса DiB1, в расчетной структуре DiB3 установлено наличие альтернативного центра связывания хромофора M739.

*Ключевые слова:* хромофор, флуороген-активирующий белок, молекулярная механика

DOI: 10.31857/S0132342323050020, EDN: AAZYGK

### ВВЕДЕНИЕ

Природные липокалины представляют собой семейство небольших белков, встречающихся в различных биологических системах [1]. Они имеют общую  $\beta$ -структурную укладку и обладают способностью к комплексообразованию малых молекул для различных физиологических целей. Охарактеризовано более десяти различных изоформ липокалина с разной специфичностью к лиганду и физиологической функцией.

Биомаркеры группы DiB1–3 получены на основе нековалентных комплексов генно-инженерных вариантов B1c (в качестве флуороген-активирующего белка, ~20 кДа) с синтетическим GFP-подобным хромофором M739 (рис. 1, табл. 1) [2–4]. Флуороген M739 демонстрирует быстрое проникновение в клетку и обратимое мечение, что позволяет легко настраивать плотность мечения в живых клетках по требованию. Это значительно упрощает окрашивание клеток, позволяя проводить более сложные эксперименты. В принципе, в одном эксперименте можно комбинировать различные системы мечения с временным разделением на основе флуорогена. Липокалин B1c, использованный для связывания различных малых молекул, оказался многообещающим карка-

сом для создания систем маркировки на основе флуорогена. Полученные комплексы демонстрируют яркую флуоресценцию и существенно более высокую фотостабильность, чем коммерческие биомаркеры mKate и EGFP, и представляют собой первые примеры дизайна новых флуоресцентных биомаркеров с использованием липокалина.

Цель данной работы – установление пространственной организации флуоресцентного нековалентного комплекса DiB3 расчетным методом молекулярной механики и сопоставление полученной расчетной модели DiB3 с кристаллической структурой родственного комплекса DiB1.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кристаллическая структура флуоресцентного комплекса DiB1 была установлена нами ранее рентгеноструктурным методом с разрешением 1.58 Å (PDB: 6UBO) [3]. В отличие от флуоресцентных GFP-подобных белков с укладкой белковой цепи в виде  $\beta$ -бочонка из 11 антипараллельных  $\beta$ -сегментов, пространственная структура мономера B1c принимает форму  $\beta$ -бочонка из 8 антипараллельных  $\beta$ -сегментов с присоединенным  $\alpha$ -спиральным фрагментом на C-концевом участке. Четыре петли, расположенные с противоположной стороны от N-конца, образуют овальный ( $8 \times 11$  Å) вход в узкую удлиненную полость глубиной ~19 Å. На дне полости располагаются гидрофильные остатки (Glu45, Glu54,

Сокращения: B1c – бактериальный липокалин; GFP – зеленый флуоресцентный белок.

# Автор для связи: (тел.: +7 (495) 330-75-10; эл. почта: goryacheva@ibch.ru).

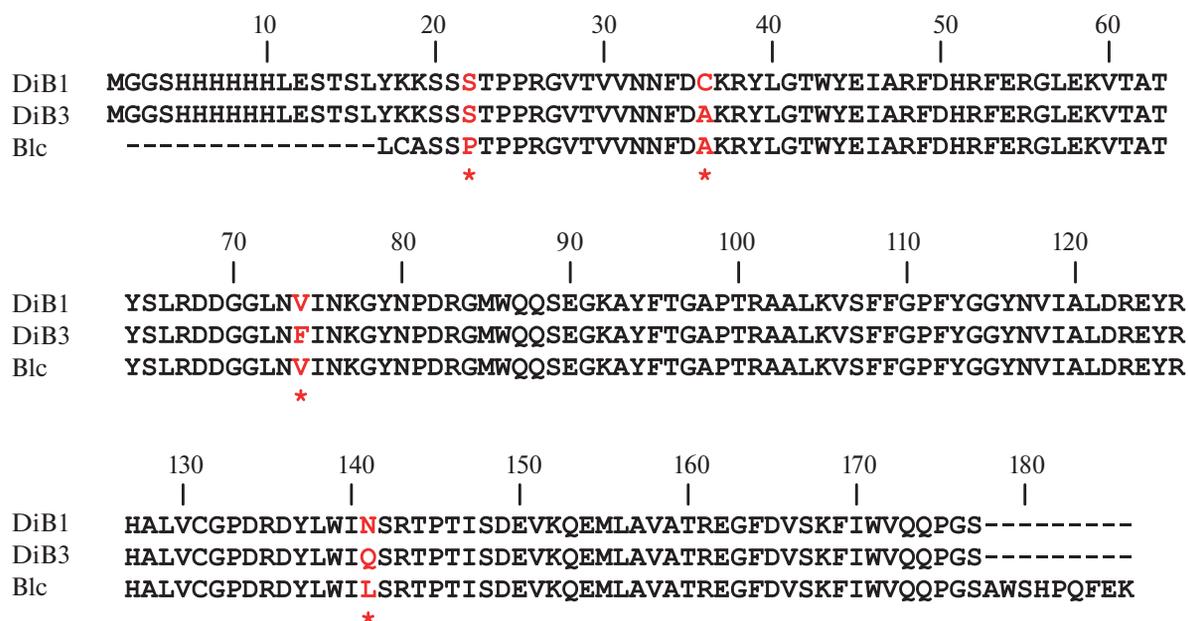


Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей родительского бактериального липокалина Blc из *E. coli* (GenBank AIW80316.1) [2] и его мутантов в комплексах DiB1 [3] и DiB3 с синтетическим флуорогеном M739. Звездочками отмечены аминокислотные замены.

Asn76, Asn141 и Tyr116), а область ближе к выходу заселена в основном гидрофобными остатками (Gly114/115, Val106/130, Pro133, Trp139, включая гидрофобные части Tyr116 и Tyr137).

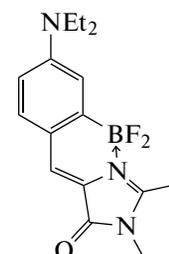
В липокалиновом комплексе DiB1 полость белка Blc обеспечивает специфическое связывание копланарного трициклического хромофора M739 (рис. 2 и 3а). Гидрофильное пятичленное кольцо хромофора располагается вблизи гидрофильного дна полости, а гидрофобное шести-членное кольцо – в гидрофобной части у входа в полость. Положение связанного M739 в полости белка Blc стабилизируется двумя Н-связями между группами С=О и BF2 хромофора с Asn141 и

Asn76 белка соответственно, а также опосредованной через молекулу воды Н-связью между BF2 и Tyr64. Дополнительный вклад в специфическое связывание вносят π-стэкинг-взаимодействие пятичленного и центрального шести-членного колец M739 с ароматическим остатком Trp139, а также ряд гидрофобных контактов.

В липокалиновом комплексе DiB3 (рис. 3б) две аминокислотные замены Val74Phe и Leu141Gln существенно уменьшают стереохимическую комплементарность полости липокалина к хромофору M739, приводя к ~90-кратному снижению аффинности связывания и сильному смещению спектральных полос поглощения и эмиссии (табл. 1).

Таблица 1. Фотофизические характеристики комплексов бактериального липокалина Blc с хромофором M739 – DiB1 и DiB3 [4]

| Характеристики                 | DiB1                 | DiB3                 | M739  |
|--------------------------------|----------------------|----------------------|-------|
| Аминокислотные замены в Blc    | Ala36Cys + Leu141Asn | Val74Phe + Leu141Gln |       |
| $K_d$ , мкМ                    | 0.1                  | 9                    |       |
| Относительная фотостабильность | 2×                   | 10×                  |       |
| $\lambda_{ex}$ , нм            | 513                  | 546                  | 520   |
| $\lambda_{em}$ , нм            | 542                  | 565                  | 563   |
| Квантовый выход, QY            | 0.32                 | 0.15                 | 0.035 |



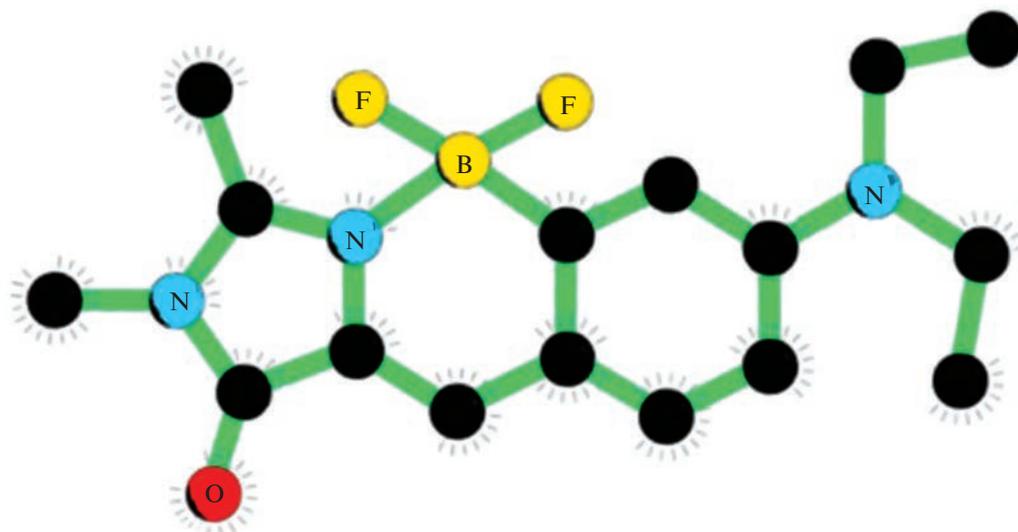


Рис. 2. Структура хромофора M739.

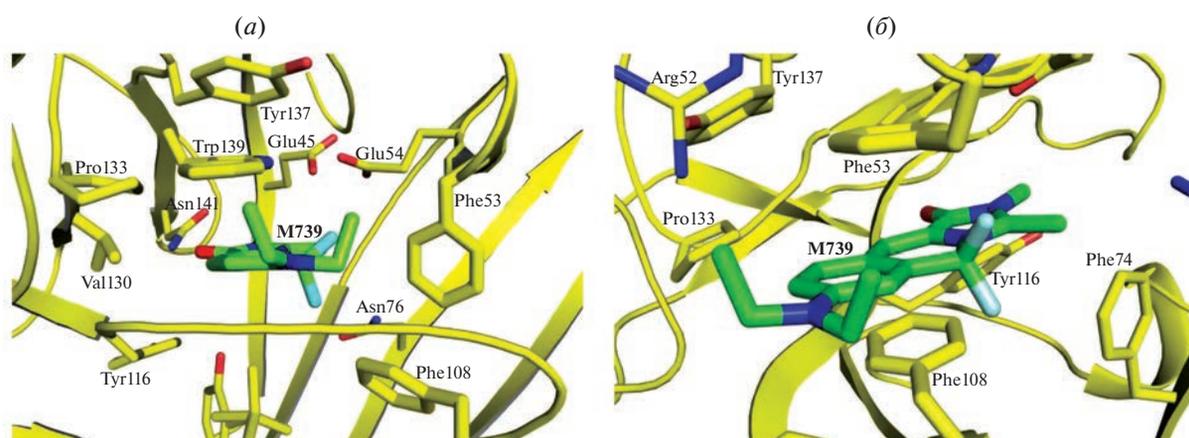


Рис. 3. Области связывания хромофора M739 (показан зеленым цветом): (а) – DiB1 (рентгеновская кристаллическая структура [3]); (б) – DiB3 (расчетная модель).

Было предположено, что объемные остатки Phe74 и Gln141 частично выталкивают хромофор из центра посадки ближе к выходу из полости, нарушая его Н-связывание с остатками Asn141 и Tyr64 белка, наблюдаемое в структуре DiB1. Предполагаемое смещение должно сопровождаться уменьшением эффективности  $\pi$ -стэкинга с Trp139 и ослаблением Н-связывания с Asn76. Небольшой квантовый выход DiB3 ( $QY \sim 0.15$  по сравнению с  $QY$  свободного хромофора  $\sim 0.035$ ) указывает на наличие относительно слабого комплекса, частично экранирующего хромофор от растворителя.

Суперпозиция структур комплекса DiB1 и комплекса флуоресцентного белка Сандерцианина с биливердином IX $\alpha$  [5] предполагает наличие в липокалинах двух сайтов связывания, способных к  $\pi$ -стэкингу с хромофором. Первый сайт,

установленный в комплексе DiB1, содержит ароматический остаток Trp139 в стэкинг-взаимодействии с хромофором. В Сандерцианине он отсутствует, в этой позиции располагается Ser. Второй сайт, установленный в Сандерцианине и ряде других биливердин-связывающих липокалинов, представляет собой “сэндвич” из двух ароматических боковых цепей Phe55 и His108 (Phe53 и Phe108 в DiB1). В некомплексной апоформе липокалина Wc расстояние между параллельными боковыми цепями Phe53 и Phe108, располагающимися у выхода из полости, меньше, чем в Сандерцианине. Посадка хромофора в основном связывающем центре комплекса DiB1 осуществляется за счет поворота боковой цепи Phe53 вокруг связи  $C_{\alpha}-C_{\beta}$  на  $120^\circ$  и сдвигом Phe108 на 6 Å. Процесс конформационных изменений внутри

полости белка сопровождается поворотом внешней петли 107–113 на  $\sim 90^\circ$  [3]. И, наоборот, низкоаффинный комплекс DiB3 предполагает связывание хромофора в минорном центре за счет  $\pi$ -стэкинга между двумя ароматическими остатками Phe55 и Phe108. При этом кардинальное различие фотофизических характеристик DiB1 и DiB3 неявным образом подтверждает существование в полости белка обоих центров связывания хромофора.

Наши эксперименты по получению качественных монокристаллов DiB3, пригодных для рентгеноструктурных исследований, успехом не увенчались. В этой связи мы предприняли попытку установить положение предполагаемого минорного центра связывания в DiB3 расчетным методом молекулярной механики с помощью программы ZMM [6], алгоритм которой обеспечивает генерацию конформационных состояний исследуемых объектов методом Монте-Карло с последующей минимизацией общей энергии. Стартовая расчетная модель комплекса DiB3 была получена на основе рентгеновской пространственной структуры DiB1 (рис. 3а) путем введения соответствующих аминокислотных замен (рис. 1, табл. 1) на стереографической станции с помощью программы молекулярной графики COOT [7]. В расчетном ZMM-эксперименте в связывающей полости DiB3 методом Монте-Карло было сгенерировано  $\sim 50000$  стартовых расположений хромофора и конформационных состояний остатков из ближайшего окружения, включая подвижную петлю 107–113, участвующую в формировании полости. После процедуры энергетической оптимизации одно из низкоэнергетических состояний комплекса DiB3 (рис. 3б) соответствовало положению хромофора, наблюдаемому в структуре Сандерцианина [5]. По сравнению с экспериментальной структурой DiB1, в расчетной структуре DiB3 хромофор M739 демонстрирует сдвиг на  $\sim 5 \text{ \AA}$  в сторону выхода из связывающей полости. Сдвиг сопровождается дополнительным поворотом хромофора на  $\sim 60^\circ$  вокруг оси, перпендикулярной плоскости хромофора. При этом концевая группа  $N-(C_2H_5)_2$  экспонируется наружу с ее частичным экранированием остатками Phe109 и Arg52. Центральная часть планарной трициклической структуры хромофора располагается между ароматическими кольцами Phe53 и Phe108 на расстоянии  $3.4 \text{ \AA}$ , образуя эффективное стэкинг-взаимодействие.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

DiB3 представляет собой нековалентный комплекс мономерного бактериального мембранного белка липокалина Vlc из *Escherichia coli* (GenBank A1W80316.1, рис. 1) [2] с синтетическим GFP-подобным хромофором M739 [4, 8, 9]. Поиск оптимальной пространственной организации DiB3 выполняли расчетным программным комплексом молекулярной механики ZMM [6] основе ме-

тода минимизации энергии Монте-Карло [10]. В качестве стартовой модели использовали рентгеновскую структуру родственного комплекса DiB1 [3], модифицированную программой молекулярной графики COOT [7] в соответствии с аминокислотной последовательностью DiB3 (рис. 1) [3]. В основе алгоритма программы ZMM лежит генерация случайных изменений координат модели с последующим градиентным спуском в ближайший энергетический минимум. Общая энергия генерируемых конформационных состояний DiB3 определялась суммой энергетических вкладов, отвечающих отклонениям длин связей, валентных и торсионных углов от равновесных значений, а также вкладов от ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий несвязанных пар атомов. Поиск структуры, отвечающей минимальной энергии, осуществлялся путем вариации положения лиганда, а также торсионных углов как лиганда, так и боковых цепей окружающих аминокислотных остатков.

Внутренними координатами модели выбраны длины валентных связей, валентные и торсионные углы, а также декартовы координаты и эйлеровы углы, определяющие положение лиганда. Вклад ван-дер-ваальсовых взаимодействий атомов в общую энергию учитывали на основе силового поля AMBER [11]. При вычислении энергетического вклада от электростатических взаимодействий атомов диэлектрическая проницаемость оценивали функцией расстояния между парами атомов и степени их экспонирования в водное окружение [6]. Атомные заряды вычисляли методом AM1 [12] (Dewar et al., 1985) при помощи программы MORAC [13].

Энергетические ZMM-расчеты комплекса DiB3 проводили в два этапа. На первом этапе использовали систему структурных ограничителей для реализации оптимального стартового расположения хромофора в предполагаемом месте связывания в липокалине, при этом минимизация общей энергии комплекса липокалин–хромофор позволила устранить стерические конфликты, возникающие при начальном докинге лиганда. После удаления ограничителей на втором этапе была реализована окончательная процедура минимизации Монте-Карло.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Флуоресцентная визуализация объектов в живых клетках остается технически сложной задачей, в основном из-за фоторазложения флуоресцентных меток. Эта проблема реализуется на основе современного подхода путем использования нековалентных комплексов флуороген-активирующих белков с синтетическими красителями — флуорогенами. После фотообесцвечивания флуороген в комплексе заменяется новым доступным в растворе интактным флуорогеном. В этом направлении была создана серия новых флуорес-

центных нековалентных комплексов серии DiB – генно-инженерных вариантов бактериального мембранного белка липокалина Blc с синтетическим GFP-подобным хромофором M739. Это первые примеры дизайна флуоресцентных биомаркеров на основе липокалина. Для изучения структурно-функциональной взаимосвязи мы предприняли систематические структурные исследования белков этой серии экспериментальными и расчетными методами. В настоящей работе представлены результаты расчета пространственной организации DiB3 методом молекулярной механики. По сравнению с рентгеновской кристаллической структурой родственного комплекса DiB1, в расчетной структуре DiB3 установлено наличие альтернативного центра связывания хромофора M739, располагающегося в стэкинг-взаимодействии между двумя ароматическими остатками Phe53 и Phe108.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00011).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания экспериментов с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rothe C., Skerra A.* // *BioDrugs*. 2018. V. 32. P. 233–243. <https://doi.org/10.1007/s40259-018-0278-1>
2. *Campanacci V., Bishop R.E., Blangy S., Tegoni M., Cambillau C.* // *FEBS Lett*. 2006. V. 580. P. 877–883. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.07.086>
3. *Muslinkina L., Gavrikov A.S., Bozhanova N.G., Mishin A.S., Baranov M.S., Meiler J., Pletneva N.V., Pletnev V.Z., Pletnev S.* // *ACS Chem. Biol.* 2020. V. 15. P. 2456–2465. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00440>
4. *Bozhanova N.G., Mikhail S., Baranov M.S., Klementieva N.V., Gavrikov A.S., Sarkisyan K.S., Yampolsky I.V., Zagaynova E.V., Lukyanov S.A., Konstantin A., Lukyanov K.A., Mishin A.S.* // *Chem. Sci.* 2017. V. 8. P. 7138–7142. <https://doi.org/10.1039/C7SC01628J>
5. *Ghosh S., Yu C.L., Ferraro D.J., Sudha S., Pal S.K., Schaefer W.F., Gibson D.T., Ramaswamy S.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 13. P. 11513–11518. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525622113>
6. *Garden D.P., Zhorov B.S.* // *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2010. V. 24. P. 91–105. <https://doi.org/10.1007/s10822-009-9317-9>
7. *Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K.* // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2010. V. 66. P. 486–501. <https://doi.org/10.1107/s0907444910007493>
8. *Schiefner A., Chatwell L., Breustedt D.A., Skerra A.* // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2010. V. 66. P. 1308–1315. <https://doi.org/10.1107/s0907444910039375>
9. *Bozhanova N.G., Calcutt M.W., Beavers W.N., Brown B.P., Skaar E.P., Meiler J.* // *FEBS Lett*. 2021. V. 595. P. 206–219. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14001>
10. *Li Z., Scheraga H.A.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1987. V. 84. P. 6611–6615. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.19.6611>
11. *Weiner J., Kollman P.A., Case D.A., Singh U.C., Chio C., Alagona G., Profeta S., Weiner P.K.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1984. V. 106. P. 765–784. <https://doi.org/10.1021/ja00315a051>
12. *Dewar M.J.S., Zoebisch E.G., Healy E.F., Stewart J.J.P.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1985. V. 107. P. 3902–3909. <https://doi.org/10.1021/ja00299a024>
13. *Stewart J.J.P.* // *Chem. Prog. Exch.* 1990. V. 10. P. 86.

## Alternative Chromophore Binding Sites in Non-Covalent Fluorescent Complexes of Bacterial Lipocalin

E. A. Goryacheva<sup>\*, #</sup>, I. V. Artemyev<sup>\*</sup>, S. F. Arhipova<sup>\*</sup>, A. V. Rossohin<sup>\*\*</sup>, A. R. Gilvanov<sup>\*</sup>, V. Z. Pletnev<sup>\*</sup>, and N. V. Pletneva<sup>\*</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (495) 330-75-10; e-mail: goryacheva@ibch.ru

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

<sup>\*\*</sup>Research Center of Neurology, per. Obuha 5, Moscow, 105064 Russia

The three-dimensional structure of DiB3, a fluorescent non-covalent complex of a genetically engineered variant of the bacterial protein lipocalin Blc with a synthetic GFP-like chromophore M739, was determined by the calculation method of molecular mechanics. Compared to the crystal structure of the related DiB1 complex, an alternative binding site for the M739 chromophore was found in the structure of the DiB3 complex.

*Keywords:* chromophore, fluorogen-activating protein, molecular mechanics