

ISSN 0132-3423

Том 49, Номер 1

Январь - Февраль 2023



# БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ



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



# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

## Том 49, номер 1, 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.

---

---

Мускариновые и никотиновые холинорецепторы в регуляции сердечно-сосудистой системы (обзорная статья)

*А. В. Осипов, А. С. Аверин, Э. Р. Шайхутдинова, И. А. Дьяченко, В. И. Цетлин, Ю. Н. Уткин* 3

Белки холодового шока бактерий как инструмент адаптации к стрессу (обзорная статья)

*А. С. Григоров, Т. Л. Ажикина* 23

Перспективы использования катионов металлов для разработки противомикробных комплексов (обзорная статья)

*А. В. Кадомцева, Г. М. Мочалов, И. В. Жданович, М. С. Пискунова* 32

Противовоспалительное действие синтетического пептида LKEKK (обзорная статья)

*Е. В. Наволоцкая, Д. В. Зинченко, А. Н. Мурашев* 41

Липосомы с набором Т-клеточных эпитопов вируса SARS-CoV-2 как прототип вакцинной конструкции

*Д. С. Третьякова, А. С. Алексеева, Н. Р. Онищенко, И. А. Болдырев, Н. С. Егорова, Д. В. Васина, В. А. Гуцин, А. С. Чернов, Г. Б. Телегин, В. А. Казаков, К. С. Плохих, М. В. Коновалова, Е. В. Свищевская, Е. Л. Водовозова* 48

Полимеры 2,5-дигидроксibenзойной кислоты индуцируют образование сфероидов клеток млекопитающих

*Г. К. Рыцков, А. В. Лисов, М. Ю. Земскова* 65

Экспериментальная оценка 3-мета-пиридин-1,2,4-оксадиазольного производного дезоксихоловой кислоты как прототипа ингибиторов 5- $\alpha$ -редуктазы в моделях *in silico* и *in vivo*

*Ю. В. Мешкова, Д. С. Баев, И. В. Сорокина, И. И. Попадюк, О. В. Саломатина, Н. А. Жукова, Т. Г. Толстикова, Н. Ф. Салахутдинов* 79

Получение комплексов фицина с карбоксиметилхитозаном и *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозаном и изучение их структурных особенностей

*Н. В. Мальхина, С. С. Ольшанникова, М. Г. Холявка, А. В. Сорокин, М. С. Лавлинская, В. Г. Артюхов, Д. А. Файзуллин, Ю. Ф. Зуев* 93

---

Правила для авторов журнала “Биоорганическая химия” 2023

105

---

---





УДК 57.053:612.1

## МУСКАРИНОВЫЕ И НИКОТИНОВЫЕ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРЫ В РЕГУЛЯЦИИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

© 2023 г. А. В. Осипов\*, А. С. Аверин\*\*, Э. Р. Шайхутдинова\*\*\*,  
И. А. Дьяченко\*\*\*, В. И. Цетлин\*, Ю. Н. Уткин\*.\*

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

\*\*ФГБУН “Институт теоретической и экспериментальной биофизики” РАН,  
Россия, 142290 Пущино, ул. Институтская, 3

\*\*\*Филиал ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,  
Россия, 142290 Пущино, просп. Науки, 6

Поступила в редакцию 28.07.2022 г.

После доработки 16.08.2022 г.

Принята к публикации 23.08.2022 г.

В регуляции сердечно-сосудистой системы (ССС) участвует множество различных рецепторов и ионных каналов, регулирующих ионные потоки. Функционирование ССС происходит с участием механизмов нервной и гуморальной регуляции, и в обоих случаях в процессах регуляции принимают участие холинорецепторы разных семейств и подтипов, имеющих различную локализацию. Показано, что холинорецепторы располагаются на мембранах клеток непосредственно сердца и кровеносных сосудов; и в данном обзоре рассматриваются механизмы регуляции функций ССС с участием только тех холинорецепторов, которые находятся в ткани сердца и сосудов. В целом как мускариновые, так и никотиновые холинорецепторы широко представлены в тканях ССС. При этом мускариновые холинорецепторы в общем вовлечены в регуляцию сосудистого тонуса и сократительной способности сердца, а никотиновые холинорецепторы участвуют в основном в регуляции ряда важных патофизиологических процессов, напрямую затрагивающих функционирование ССС. Регуляция функционирования холинорецепторов может рассматриваться в качестве дополнения к существующим способам лечения заболеваний ССС, включая такие заболевания, как атеросклероз и сердечная недостаточность. Обсуждается использование блокаторов и активаторов холинорецепторов для изучения и/или лечения патологических состояний ССС.

*Ключевые слова:* агонисты, ацетилхолин, блокаторы, кровеносные сосуды, мускариновые рецепторы, никотиновые рецепторы, сократительная способность сердца, эпителий

DOI: 10.31857/S0132342323010219, EDN: GGQIOX

### СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ХОЛИНОРЕЦЕПТОРЫ.....	4
ХОЛИНОРЕЦЕПТОРЫ В СЕРДЦЕ.....	6
Мускариновые холинорецепторы в сердце.....	6
Никотиновые холинорецепторы в сердце.....	8

Холинергические рецепторы в регуляции функций сердца.....	9
Аутокринная ненейронная холинергическая система сердца.....	12
ХОЛИНОРЕЦЕПТОРЫ В КРОВЕНОСНЫХ СОСУДАХ.....	12
Мускариновые холинорецепторы в кровеносных сосудах.....	12
Никотиновые холинорецепторы в кровеносных сосудах.....	14
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	18
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	18

### ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистая система (ССС) — одна из важнейших систем органов большинства животных, обеспечивающая организм необходимыми

Сокращения: АХ — ацетилхолин; АЦ — аденилатциклаза; мХР — мускариновые холинорецепторы; нХР — никотиновые холинорецепторы; ОИМ — острый инфаркт миокарда; ССС — сердечно-сосудистая система; сАМР — циклический аденозинмонофосфат; сGMP — циклический гуанозинмонофосфат; 4-DAMP — 1,1-диметил-4-дифенилацетоксипиперидиний; NO — оксид азота(II); NOS — синтаза оксида азота; GTS21 — 3-(2,4-диметоксibenзилиден)анабазин.

# Автор для связи: (тел.: +7 (495) 336-65-22; эл. почта: utkin@ibch.ru; yutkin@yandex.ru).

веществами и удаляющая продукты жизнедеятельности клеток. Органы ССС – сердце и кровеносные сосуды, их функционирование поддерживает гомеостаз организма в постоянно изменяющихся условиях. Физиологическая функция сердца и сосудов контролируется хорошо организованным взаимодействием различных ионных каналов, насосов (АТФаз) и обменников, регулирующих градиенты ионов  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{K}^+$ . Из ионов, участвующих в сложной работе сердца, кальций считается, пожалуй, самым важным. Этот ион имеет решающее значение для процесса, называемого электромеханическим сопряжением и позволяющего камерам сердца сокращаться и расслабляться. Сердечные  $\text{K}^+$ -каналы – ключевые участники реполяризации сердца, противодействующие деполяризующим потокам  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ . Ионы  $\text{K}^+$ , в отличие от  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ , проводятся множеством различных каналов, различающихся кинетикой активации/деактивации, а также своим вкладом в разные фазы потенциала действия.

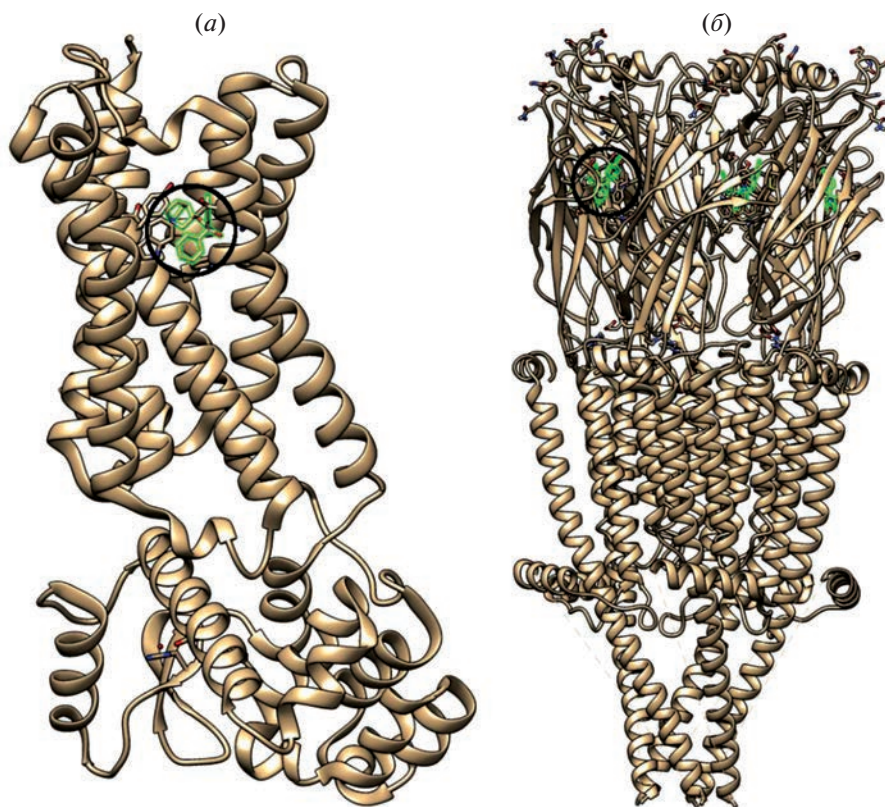
Согласованное функционирование ССС происходит посредством механизмов нервной и гуморальной регуляции. Главную роль в нервной регуляции играет автономная нервная система, осуществляющая регуляцию через парасимпатические и симпатические нервные волокна в составе блуждающего нерва и симпатических стволов спинного мозга. Передача сигналов осуществляется в основном посредством холинергических и адренергических механизмов. В сердце парасимпатическая стимуляция, осуществляемая холинергическим путем, приводит к отрицательным эффектам: инотропному, хронотропному и дромотропному. Холинергические рецепторы расположены в основном во внешней мембране кардиомиоцитов, и именно их активация приводит к снижению насосной функции сердца. Симпатическая стимуляция, осуществляемая адренергическим путем, напротив, приводит к увеличению производительности сердца. За некоторым исключением все кровеносные сосуды, содержащие в своей стенке гладкомышечные клетки, иннервируются норадренергическими и холинергическими нервными волокнами из симпатического отдела автономной нервной системы. Медиаторы, поступающие в кровь, осуществляют гуморальную регуляцию ССС. Существует целый ряд таких веществ, однако и здесь большую роль играют как адреналин, усиливающий сердечную деятельность, так и ацетилхолин, ослабляющий деятельность сердца. При гуморальной регуляции тонуса сосудов наиболее мощным сосудосуживающим действием обладают адреналин и норадреналин. Сосудорасширяющее действие присуще ацетилхолину и некоторым другим соединениям (брадикинин, простагландины, гистамин и др.). Помимо того, существует так называемая ненейрональная холинергическая систе-

ма, обладающая как аутокринными, так и паракринными свойствами. Так, некоторые ненейрональные клетки способны синтезировать и высвобождать ацетилхолин, а другие клетки, не имеющие ни симпатической, ни парасимпатической иннервации (как, например, эндотелиальные клетки кровеносных сосудов), несут на своей поверхности рецепторы ацетилхолина. Приведенное довольно схематичное описание регуляции деятельности ССС, в которой участвует множество более тонких механизмов, дает, однако, представление о существенной роли холинергической системы в этом процессе [1].

## ХОЛИНОРЕЦЕПТОРЫ

Существует два больших семейства рецепторов, управляемых ацетилхолином. Это так называемые мускариновые холинергические рецепторы (мХР), которые активируются как ацетилхолином, так и мускарином и блокируются атропином, и никотиновые холинергические рецепторы (нХР), которые активируются ацетилхолином или никотином и блокируются некоторыми алкалоидами (например, d-тубокурарином) и нейротоксинами животных ядов (например, белковыми  $\alpha$ -нейротоксинами змей или  $\alpha$ -конотоксинами, нейротоксическими пептидами из ядовитых морских моллюсков рода *Conus*).

мХР представляют собой метаботропные рецепторы, относятся к семейству рецепторов, связанных с G-белками (GPCR), и передают сигналы в клетку посредством взаимодействия с этими белками. Имеется пять подтипов мХР: М1, М2, М3, М4 и М5, обладающих высоким сходством аминокислотных последовательностей (64–68% идентичных аминокислотных остатков), но разными молекулярными и сигнальными свойствами [2, 3]. Так, в результате взаимодействия с определенными G-белками они выполняют различные физиологические функции. мХР разделяют на две группы в зависимости от типа G-белков, с которыми они взаимодействуют. Рецепторы М1, М3 и М5 связаны с белками Gq/11, которые опосредуют активацию фосфолипазы C, а рецепторы М2 и М4 связаны с белками Gi/o, которые опосредуют ингибирование аденилатциклазы (АЦ) и, таким образом, вызывают снижение уровня циклического аденозинмонофосфата (сАМФ) [4]. Данные рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии показывают, что структурно мХР представляют собой интегральные мембранные белки, которые содержат семь трансмембранных спиралей [5, 6] (рис. 1а). Внеклеточный лиганд-связывающий домен состоит из нескольких петель, содержащих консервативную дисульфидную связь, которая стабилизирует структуру рецептора. Внутриклеточный домен взаимодействует с G-белками и другими



**Рис. 1.** (а) – Пространственная структура мХР М2-типа, установленная методом рентгеноструктурного анализа [5]. В связывающем центре рецептора находится антагонист хинуклидил-3-бензилат (выделен зеленым цветом и окружностью); (б) – пространственная структура нХР типа  $\alpha 7$  человека, определенная методом криоэлектронной микроскопии в липидном окружении [9]. В связывающем центре рецептора находится агонист эпибатидин (показан зеленым цветом, в одном из связывающих центров выделен окружностью).

сигнальными молекулами и осуществляет внутриклеточную передачу сигналов.

нХР – лиганд-управляемые ионные каналы, относящиеся к семейству Cys-петельных рецепторов, которое включает также ионотропные рецепторы гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), глициновые и серотониновые 5-НТЗ-рецепторы [7, 8]. нХР представляют собой пентамеры, включающие четыре различных типа субъединиц ( $\alpha 1$ –10,  $\beta 1$ –4,  $\gamma$  либо  $\epsilon$ ,  $\delta$ ). Они существуют в виде гомомеров (со всеми субъединицами одного типа, например,  $(\alpha 7)_5$ ) или в виде гетеромеров, по крайней мере, с одной  $\alpha$ - и одной  $\beta$ -субъединицей из пяти субъединиц, которые комбинируются в различных вариантах, например,  $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ ,  $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ ,  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ ,  $\alpha 4\alpha 6\beta 3(\beta 2)_2$ . Сборки из пяти субъединиц образуют множество различных подтипов, которые имеют общую базовую структуру, но обладают специфическими фармакологическими и функциональными свойствами. Субъединицы нХР формируют пору, проницаемую для ионов  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ . Способность нХР изменять уровень внутриклеточного кальция приводит к активации различных внутриклеточных механизмов, которые мо-

гут играть ключевую роль в дальнейшей передаче сигналов. Все субъединицы имеют похожее строение и состоят из большого *N*-концевого внеклеточного домена, за которым следуют три гидрофобных трансмембранных домена (M1–M3), большая цитоплазматическая петля между доменами M3 и M4, четвертый гидрофобный трансмембранный домен (M4) и короткий внеклеточный *C*-концевой домен (рис. 1б). Трансмембранные домены M1–M4 расположены концентрическими слоями вокруг центральной поры: домен M2 выстилает пору, M1 и M3 защищают M2 от окружающего липидного двойного слоя, а M4 наиболее экспонирован в липидный бислой [9].

Холинорецепторы могут располагаться в различных отделах нервной и эндокринной систем, которые регулируют деятельность различных органов, в том числе ССС, при помощи медиаторов и гормонов, связывающихся с рецепторами иных типов. Поэтому холинорецепторы оказывают косвенное влияние на работу ССС, опосредованное, например, через ренин-ангиотензиновую систему [10]. Установлено, что никотин и другие агонисты нХР вызывают существенный подъем

артериального давления (например, по данным Jutkiewicz et al. [11]). Однако эти эффекты опосредованы через нервную систему, и в процитированной работе они обусловлены активацией вегетативных ганглиев с участием некоторых подтипов нХР. В равной мере можно привести ряд примеров опосредованного влияния мХР на ССС. Так, исследование сонных артерий морских свинок показало, что М1 играет важную роль в модулировании высвобождения норадреналина, способствуя сужению сосудов [12]. М2, наоборот, задействован в опосредуемом карбахолом ингибировании высвобождения норадреналина, способствуя расслаблению мозговых артерий кошки [13]. М3-рецепторы, впрочем, также стимулируют выработку надпочечниками адреналина, который, в свою очередь, влияет на функцию сосудов при солечувствительной гипертензии [14].

Однако холинорецепторы располагаются также на мембранах клеток непосредственно сердца и кровеносных сосудов. В данном обзоре мы рассмотрим механизмы регуляции функций ССС с участием только тех холинорецепторов, которые сами находятся в ткани сердца и сосудов.

### ХОЛИНОРЕЦЕПТОРЫ В СЕРДЦЕ

Хорошо известно, что парасимпатическая система, в которой основным нейромедиатором выступает ацетилхолин (АХ), играет существенную роль в регуляции сердечно-сосудистой функции. При нервной регуляции ССС сигнализация с участием холинорецепторов происходит в нейронных сетях парасимпатической нервной системы, а также между нейронными сетями и сердцем. Внутри нейронной сети преганглионарные волокна из продолговатого мозга, проходящие в блуждающем нерве, передают сигнал с участием нХР на плазматической мембране постганглионарных волокон. Затем эта стимуляция постганглионарных нервов приводит к секреции АХ, который связывается с рецепторами на плазматической мембране клеток сердца. Кроме того, установлено, что кардиомиоциты способны синтезировать и высвобождать АХ, и такая внутренняя холинергическая система известна как ненейрональная холинергическая система [15]. После высвобождения во внеклеточное пространство АХ может связываться с мХР или нХР и активировать специфические сигнальные пути в различных типах клеток ССС. Основные рецепторы АХ в сердце – мХР (М1–М5), которые гетерогенно распределены по всей ССС и выполняют в ней различные физиологические функции [16].

#### *Мускариновые холинорецепторы в сердце*

За последние годы в миокарде были обнаружены все пять известных типов мускариновых ре-

цепторов, хотя их функциональная значимость сильно различается. В сердце преобладают изоформы подтипа М2.

**Подтип М2.** М2 мХР – основной мускариновый рецептор АХ в сердце млекопитающих. Он обильно экспрессируется в предсердиях и проводящей системе (синоатриальный и атриовентрикулярный узлы), тогда как его экспрессия в желудочках относительно низка по сравнению с предсердиями [16]. Исследования связывания радиолигандов в сердце человека подтверждают, что М2 имеет значительно более высокое содержание в предсердиях (до 2.5 раз) по сравнению с миокардом желудочков [16].

М2 мХР предпочтительно связывается с белками Gi, которые ингибируют аденилатциклазу (АЦ) и, таким образом, при активации ослабляют превращение АТФ в сАМР. В целом стимуляция М2 оказывает прямое и косвенное влияние на функцию сердечной мышцы. М2, локализуясь на постганглионарных симпатических нервных окончаниях, ингибируют высвобождение норадреналина, предотвращая активацию β-адренергических рецепторов миокарда. Это косвенное влияние, которое в данном обзоре не обсуждается. Прямое же влияние модулируется посредством взаимодействия с G-белком в мембранах кардиомиоцитов несколькими путями.

В первом пути М2 взаимодействует с α-субъединицей белка Gi, а βγ-субъединица белка Gi напрямую связывается с активируемым G-белком калиевым каналом внутреннего выпрямления (GIRK). Эти ионные каналы генерируют калиевый ток, активируемый ацетилхолином ( $I_{K,ACH}$ ). После активации канал становится проницаемым для  $K^+$ , что приводит к ряду последствий, которые зависят от величины присущего конкретным клеткам мембранного потенциала во время диастолы: 1) к гиперполяризации в синоатриальном узле, что выражается в замедлении частоты сердечных сокращений; 2) к уменьшению продолжительности потенциала действия и эффективного рефрактерного периода у миоцитов предсердий, что делает эти клетки более восприимчивыми к преждевременным стимулам; 3) к снижению возбудимости клеток атриовентрикулярного узла, что замедляет распространение импульса от предсердий к желудочкам [17]. Каналы  $I_{K,ACH}$  обнаружены и в желудочках, однако в гораздо меньшем количестве и с существенно меньшей восприимчивостью к стимуляции ацетилхолином, чем в предсердиях [18]. Считается, что М2, Gi и GIRK не имеют более никаких молекулярных посредников и для полноценного ответа должны физически взаимодействовать [17].

Во втором пути М2 модулирует сАМР-зависимый ответ на активацию β-адренергических рецепторов, которые активируют АЦ [19]. Здесь М2



связывается с  $\beta\gamma$ -субъединицей белка  $G_i$ , который посредством  $\alpha$ -субъединицы ингибирует АЦ5/6, что приводит к снижению уровня внутриклеточного сАМР. Изменения в уровне сАМР в предсердиях напрямую влияют на каналы HCN (управляемые циклическими нуклеотидами гиперполяризационно-активируемые каналы водителя ритма, проницаемые для ионов  $Na^+$  и  $K^+$ ), а посредством активации протеинкиназы А — на кальциевые каналы L-типа. В желудочках эти изменения влияют на функционирование медленных выпрямляющих калиевых и хлорных каналов CFTR.

Однако есть еще и третий путь прямого влияния М2 на функцию сердца: М2 связывается с  $\alpha$ -субъединицей белка  $G_i$ , который своей  $\beta\gamma$ -субъединицей способствует активации АЦ4/7  $\beta$ -адренорецептором, что приводит к усилению синтеза сАМР. Ингибиторное влияние М2 на синтез сАМР преобладает, оно выражено сильнее, но и заканчивается быстрее; активаторный эффект сохраняется дольше, поэтому сразу после прекращения раздражения блуждающего нерва или стимуляции ацетилхолином происходит резкое увеличение частоты сердечных сокращений и сократительной способности желудочков [19]. Кстати, ацетилхолин вызывает повышение уровня сАМР в миоцитах предсердий еще одним путем: М2 активирует фосфолипазу С для запуска фосфоинозитидного каскада, включающего, в свою очередь, каскад реакций с участием кальция/кальмодулина и протеинкиназы С. Это приводит к активации синтеза оксида азота (NOS); продукция оксида азота (NO) стимулирует выработку циклического гуанозинмонофосфата (сGMP) растворимой гуанилатциклазой. сGMP ингибирует фосфодиэстеразу-3, таким образом способствуя накоплению сАМР, и это приводит к отрицательному инотропному эффекту в отношении предсердий [20, 21].

Было отмечено, что М2 проявляют чувствительность к потенциалу, т.е. их сродство к лигандам изменяется в зависимости от потенциала мембраны [22]. Чувствительность М2 к потенциалу подразумевает, что сродство к АХ (и, следовательно, эффект АХ) изменяется в течение электрического цикла сердца. Моделирование этого процесса показало, что измененная чувствительность М2 к потенциалу может способствовать и возникновению, и развитию таких заболеваний, как мерцательная аритмия и неадекватная синусовая тахикардия [23].

В целом активация М2-рецептора приводит к снижению частоты сердечных сокращений (отрицательной хронотропии) и практически не влияет на сократительную способность сердца (отсутствие инотропного эффекта).

**Подтип М3.** М3 мХР преимущественно сопряжен с белком Gq. Этот белок передает сигнал от М3 к мембраносвязанному ферменту фосфоинозитидазе С $\beta$  (фосфоинозитол-специфичной фосфолипазе С), при этом активация М3 усиливает активность фермента, вызывая образование фосфатидил-инозитол-4,5-дифосфата, который служит источником для образования двух посредников: инозитол-1,4,5-трифосфата и диацилглицерола. Эти две молекулы действуют как вторичные мессенджеры для мобилизации внутриклеточных запасов  $Ca^{2+}$  и активации протеинкиназы С.

Проведенные исследования показали, что подтип М3 также присутствует в клетках миокарда [24, 25]. Распределение М3 в сердце неравномерно; мРНК М3 была обнаружена в предсердиях и желудочках сердца человека, хотя и в меньшем количестве, чем мРНК М2. При этом экспрессия М3 в желудочках в 10 раз выше, чем в предсердиях. Кроме того, эксперименты по иммуноокрашиванию кардиомиоцитов желудочков человека показали, что концентрация М3 выше на вставочных дисках по сравнению с другими областями клеточной мембраны [26]. Предпочтительное распределение на вставочных дисках указывает на то, что М3 играет существенную роль в межклеточных коммуникациях кардиомиоцитов. Следует отметить, что имеется несколько функций М3-рецепторов сердца. Этот рецептор активирует не только путь протеинкиназы С, но и медленный компонент выпрямляющего калиевого тока, помогая таким образом регулировать частоту сердечных сокращений и реполяризацию кардиомиоцитов [27, 28]. Было также показано, что стимуляция М3-рецепторов вызывала выраженное укорочение длительности потенциала действия в предсердиях и желудочках функционирующего миокарда [29]. М3 присутствуют в водителе ритма и миокарде сердца мыши, где они опосредуют негативные холинергические эффекты, а именно замедление синусового ритма и укорочение потенциалов действия [29].

**Подтип М1.** М1 мХР обнаруживается в кардиомиоцитах предсердий и желудочков, но в разных количествах, а также, по-видимому, его содержание различается в зависимости от вида животного. Например, М1 был обнаружен как в желудочках [30], так и в предсердиях человека [18], а в предсердиях крыс линии Wistar — нет [16]. При этом локализация М1 в желудочках сердца обнаруживается у разных видов животных, хотя и в различных количествах. Было высказано предположение, что М1 в сердце человека играет определенную роль в гомеостатической регуляции. К тому же исследования на морских свинках показали, что активация М1 вызывает положительный инотропный эффект, который уравнивает отрицательные эффекты активации М2 за



счет усиления тока через  $\text{Ca}^{2+}$ -канал L-типа. Это в конечном итоге приводит к увеличению частоты и силы сокращений сердца [16]. Также для М1 мХР была показана возможность активации тока  $I_{\text{K,Ach}}$ , который играет важную роль в патогенезе фибрилляции предсердий [31].

В согласии с вышесказанным, применение специфического блокатора М1 мХР пирензепина в высоких дозах приводит к тахикардии, но в малых дозах – к брадикардии. Поэтому блокированием М1 можно объяснить такой же парадоксальный двухфазный эффект низких и высоких доз неселективного антагониста мХР атропина [32]. Однако здесь следует быть осторожным в оценках, поскольку наиболее вероятный сценарий такой брадикардии – блокирование пресинаптического М1 блуждающего нерва, но не кардиомиоцитов; это облегчает высвобождение АХ и активацию им М2 сердца, сопровождающуюся вполне естественным замедлением ритма [32].

**Подтип М4.** Функция мХР М4 перекрывается с функцией М2, оба – рецепторы, связанные с белком Gi, и снижающие уровни сАМР. Имеющиеся к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что М4, по-видимому, имеет большее значение в регуляции нервной системы, чем в сердечно-сосудистой, хотя мРНК, кодирующая М4, обнаружена в сердце. Данные, полученные с использованием тканей предсердий собаки, указывают на потенциальную роль М4 в контроле  $\text{K}^+$ -каналов [33]. Недавнее исследование с использованием мышей, нокаутных по М4, показало, что рецепторы М4 могут также способствовать брадикардии, опосредованной рецептором М2 [16]. Было установлено, что тропикамид, ингибитор М4-подтипа, снижает частоту сердечных сокращений и минутный объем сердца у крыс, хотя величина ударного объема сердца увеличивается [34]. Однако необходимы дальнейшие исследования, чтобы уточнить, действительно ли (и каким именно образом) М4 участвует в функционировании ССС.

**Подтип М5.** мХР М5, как и другие члены этого семейства с нечетными номерами (М1 и М3), связан с белком Gq, однако данные о его функциональной роли в сердце весьма ограничены. Так, исследование экспрессии мРНК, кодирующей мХР у крыс, обнаружило мРНК М5 в предсердиях и желудочках сердца, где ее содержание составляет 5% от общей мРНК мХР [35]. Иммуноблоттинг с антителами, специфическими к определенному подтипу мХР, подтвердил присутствие белка М5 в препаратах мембран из тканей как предсердия, так и желудочка сердца человека. Плотность М5 была в ~5 раз ниже в ткани желудочка, чем в ткани предсердия. Одиночные миоциты желудочка окрашивались антителами к М5, и при конфокальной микроскопии характерная локализация М5 обнаружена на вставочных дисках [26].

Суммируя приведенные выше данные, можно заключить, что в сердце мХР подтипа М2 преобладают и играют наиболее важную роль в регуляции функционирования сердца.

#### *Никотиновые холинорецепторы в сердце*

Данные о наличии нХР в сердце немногочисленны. Тем не менее исследование онтогенетических изменений экспрессии  $\alpha$ -субъединиц нХР в сердце крысы показало, что различные  $\alpha$ -субъединицы нХР присутствуют на ненейронных клетках сердца [36]. На всех постнатальных стадиях субъединица  $\alpha 3$  была обнаружена только в предсердиях, в то время как субъединицы  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  и  $\alpha 7$ , по-видимому, экспрессируются и в предсердиях, и в желудочках. мРНК, кодирующая субъединицы  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$  и  $\alpha 10$ , была обнаружена на всех стадиях развития. Ни на одной стадии развития не удалось получить однозначный сигнал для мРНК  $\alpha 9$ -субъединицы нХР. Иммуногистохимическое окрашивание показало наличие субъединицы  $\alpha 7$  на нейронах сердца, фибробластах и кардиомиоцитах, а субъединиц  $\alpha 2$  и  $\alpha 4$  – на кардиомиоцитах с постнатальным перераспределением во вставочные диски. Эти данные свидетельствуют о ненейронной экспрессии субъединиц нХР в сердце крысы [36]. В сердце крыс уровень экспрессии мРНК  $\alpha 7$ -субъединицы нХР измеряли с помощью ОТ-ПЦР и вестерн-блоттинга. Было показано наличие этого подтипа нХР в желудочках и предсердиях, при этом экспрессия в желудочках была существенно выше, чем в предсердиях [37]. Экспрессия мРНК практически всех субъединиц нХР, включая  $\alpha 2$ -,  $\alpha 3$ -,  $\alpha 4$ -,  $\alpha 5$ -,  $\alpha 6$ -,  $\alpha 7$ -,  $\alpha 9$ -,  $\alpha 10$ -,  $\beta 1$ -,  $\beta 2$ -,  $\beta 4$ - и  $\epsilon$ -субъединицы, была обнаружена методом количественной ПЦР в реальном времени в кардиомиоцитах новорожденных крыс и клетках H9c2 (клеточная линия, полученная из эмбриональной ткани сердца крыс VD1X) [38]. Однако по представленным в этой работе данным нельзя дать оценку уровням экспрессии отдельных субъединиц.

Использование 2-дезоксид-2-[ $^{18}\text{F}$ ]фтор-D-глюкоз-А85380, избирательного радиолиганда  $\alpha 4\beta 2$ -подтипа нХР, для визуализации этих рецепторов в сердце человека *in vivo* с применением позитронно-эмиссионной томографии выявило поглощение индикатора левым желудочком сердца [39]. Эти данные свидетельствуют о наличии  $\alpha 4\beta 2$ -подтипа нХР в левом желудочке сердца человека. Однако полученное разрешение не позволило более точно локализовать эти рецепторы в конкретной ткани желудочка (ганглий, сосуд или мышца).

Активация нХР может приводить как к росту силы сокращения в левом желудочке [40, 41], так и к снижению силы сокращения предсердий [42]. Как обсуждалось выше, нХР участвуют в холин-

ергической передаче в блуждающем нерве и вегетативных ганглиях, иннервирующих сердце. Поэтому иногда непросто дифференцировать воздействие холинергических лигандов на нХР самого сердца, исключив не только нХР синапсов, но и иные мишени. Так, никотин в физиологических условиях диффундирует через цитоплазматическую мембрану клетки и оказывает, причем в наномолярных концентрациях, токсическое воздействие на митохондрии, хотя сведения о возможном наличии нХР на мембранах митохондрий все еще недостаточно убедительны [43]. Например, в работе Nakatani et al. [42] отрицательные хронотропный и инотропный эффекты на изолированных мышцах предсердий крыс вызывались никотином в очень высоких концентрациях (0.3–1 мМ), но эти эффекты не предотвращались ни атропином (блокатор мХР), ни гексаметонием (блокатор ганглионарных нХР). Исходя из этого, авторы говорят о прямом влиянии никотина на мышцу сердца, но об участии нХР делают осторожное предположение, поскольку прямых доказательств (например, с использованием в опыте других блокаторов нХР) не приводят.

#### *Холинергические рецепторы в регуляции функций сердца*

Как обсуждалось выше, холинорецепторы играют существенную роль в различных сигнальных механизмах сердца, и наиболее ярко эта роль проявляется при некоторых патологических состояниях.

Когда говорят о регуляции ССС, обычно имеют в виду влияние на сократительную способность сердца и на сосудистый тонус. Как мы видим, такими регуляторами выступают мХР. Для нХР имеются лишь единичные сообщения о подобном прямом влиянии на ССС (в основном описывается косвенное). Однако нХР играют важную роль в осуществлении других физиологических и патологических процессов, которые специфичны именно для ССС (в частности, ангиогенез), или для которых эта система — основная мишень. Например, атеросклероз — это патология липидного обмена, но она связана с ССС и поражает в первую очередь ее, а все прочие проявления атеросклероза будут следствием этого поражения. Другой патологический процесс, который может затрагивать любые органы и системы организма, защитно-восстановительный — воспаление — так или иначе связан с целым рядом специфических состояний ССС (например, с инфарктом миокарда). Участвуя в различных патофизиологических процессах, нХР напрямую влияют на работу ССС, и мы считаем необходимым отразить этот аспект и здесь, и в разделе, посвященном регуляции функционирования кровеносных сосудов. Итак, холинергические лиганды

могут предотвращать или ослаблять повреждения сердца, вызванные различными воздействиями. Эти лиганды выполняют свои функции, воздействуя на холинорецепторы, находящиеся в клетках парасимпатической нервной системы или непосредственно в клетках сердца.

Острый инфаркт миокарда (ОИМ) — наиболее частая причина острого повреждения миокарда и наиболее клинически значимая его форма. Считается, что основным методом лечения ОИМ — максимально быстрое восстановление адекватного коронарного кровотока (реперфузии) к ишемизированному миокарду. Между тем парадокс лечения заключается в том, что при восстановлении кровообращения в ишемизированной ткани доставка кислорода сопровождается образованием его активных форм, которые повреждают мембраны клеток. В результате этого возникает вторичное повреждение органа и развивается явление, названное ишемически-реперфузионным повреждением миокарда. Нарушение парасимпатической (вагусной) активности сердца — общий признак различных сердечно-сосудистых заболеваний, включая ОИМ.

Целый ряд исследований показывает, что увеличение секреции АХ при стимуляции блуждающего нерва защищает сердце, предотвращая ишемически-реперфузионное повреждение [44, 45] и повышая выживаемость в модели хронической сердечной недостаточности на животных [46, 47]. Стимуляция блуждающего нерва снижает частоту возникновения фибрилляции желудочков и уменьшает зону ОИМ в модели ишемии-реперфузии [48]. Кроме того, такая стимуляция защищает от дисфункции отдаленных сосудов миокарда, возникающей в результате ишемии-реперфузии, посредством холинергического противовоспалительного пути, в котором участвуют нХР  $\alpha 7$ -типа [49]. Недавно было также показано, что активация рецептора мХР М3 с помощью стимуляции блуждающего нерва модулирует митохондриальную динамику и улучшает митохондриальную функцию при ишемии миокарда, индуцированной изопротеренолом [50]. Более детально влияние активации блуждающего нерва на ишемически-реперфузионное повреждение миокарда рассмотрено в недавних обзорах [51, 52].

Что касается конкретных подтипов рецепторов, участвующих в кардиопротекции, то антагонисты М2 [53] или подавление экспрессии рецептора мХР М2 с помощью siRNA [54] устраняют эффекты АХ-индуцированной защиты в кардиомиоцитах, что свидетельствует о вовлеченности этого подтипа мХР в процесс кардиопротекции. М3-подтип мХР также играет защитную роль при сердечно-сосудистых заболеваниях [55]. Так, сообщалось, что активация рецептора М3 снижает гипертрофию сердца, индуцированную ангио-

тензином II, корректирует гемодинамическую дисфункцию сердца, ингибирует апоптоз клеток миокарда и уменьшает повреждение миокарда [56]. Фармакологическая активация М3-рецепторов также оказывает кардиопротекторное действие при ишемически-реперфузионном повреждении, что подтверждается использованием иодида 1,1-диметил-4-дифенилацетоксипиперидиния (4-DAMP), антагониста М3 [57]. Кроме того, гиперэкспрессия М3 в модели трансгенных мышей способствует снижению экспрессии аритмогенной микро-РНК miR-1, что, по некоторым данным, приводит к высвобождению субъединицы Kir2.1 соответствующего калиевого канала после ишемии-реперфузии. В итоге это приводит к увеличению калиевого тока внутреннего выпрямления и, как следствие, снижает частоту аритмий и смертельных исходов в модели ишемически-реперфузионного повреждения миокарда мыши [58].

Для выяснения роли нХР в ишемически-реперфузионном повреждении было исследовано влияние 3-(2,4-диметоксибензилиден)анабазеина (GTS21), селективного агониста нХР  $\alpha 7$ -типа, на функциональную активность сердца крысы *in vivo* и *ex vivo*. Введение GTS21 крысам, подвергшимся оперативной ишемии-реперфузии, или добавление этого реагента в перфузионный раствор изолированного сердца до ишемии приводило к значительному увеличению левожелудочкового давления и общего системного давления без влияния на частоту сердечных сокращений [59]. Совместное введение GTS21 с метилликаконитином, селективным антагонистом нХР  $\alpha 7$ -типа, блокировало эти положительные функциональные эффекты. *In vivo* введение GTS21 в начале реперфузии уменьшало размер инфаркта миокарда на 42% и количество активных форм кислорода в тканях на 62%. GTS21 нормализовал потенциал митохондриальной мембраны и концентрацию внутриклеточного АТР в культивируемых кардиомиоцитах, подвергшихся гипоксии/реоксигенации. Таким образом, активация нХР  $\alpha 7$ -типа обеспечивает терапевтический эффект при ишемически-реперфузионном повреждении сердца [59].

Уровень экспрессии мХР М2 и М4, а также нХР  $\alpha 7$ -типа при ишемически-реперфузионном повреждении измеряли с помощью ОТ-ПЦР и вестерн-блоттинга в изолированном сердце в течение 30 мин ишемии и 60 мин реперфузии [37]. Установлено, что до повреждения экспрессия М2 в левом желудочке была ниже, чем в предсердиях и правом желудочке, тогда как экспрессия нХР  $\alpha 7$ -типа была значительно выше в левом и правом желудочках, чем в предсердиях. После реперфузии экспрессия мРНК и белка М2 заметно увеличивалась в левом и правом желудочке, а экспрессия  $\alpha 7$  нХР значительно усиливалась в левом желудочке. Экспрессия мРНК М4 заметно снижалась после

ишемии и восстанавливалась до контрольного уровня после реперфузии в предсердиях, но уровень белка не менялся. Таким образом, увеличение уровня экспрессии М2 мХР и  $\alpha 7$  нХР после реперфузии может быть компенсаторной реакцией на ишемически-реперфузионное повреждение миокарда [37].

Важный фактор ишемически-реперфузионного повреждения — клеточный окислительный стресс, один из ключевых медиаторов которого — пероксид водорода ( $H_2O_2$ ) [60]. Образование пероксида водорода при ишемически-реперфузионном повреждении приводит к перегрузке клеток  $Ca^{2+}$  из-за усиления перекисного окисления липидов и окисления сульфгидрильных групп белков [61]. Следовательно, любой терапевтический подход, который может улучшить регуляцию и предотвратить перегрузку клеток  $Ca^{2+}$ , будет полезен для сердца, перенесшего реперфузию. Основываясь на предположении, что АХ может ослаблять изменение гомеостаза внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , вызываемое  $H_2O_2$  в кардиомиоцитах, было проведено исследование влияния АХ на внутриклеточную регуляцию кальция в изолированных кардиомиоцитах до или после их обработки  $H_2O_2$  [62]. В миоцитах желудочков сердца крысы  $H_2O_2$  значительно уменьшал как транзитный вход внутриклеточного  $Ca^{2+}$  в цитозоль, так и скорость его удаления из цитозоля в саркоплазматический ретикулум. Применение АХ до обработки  $H_2O_2$  (но не после нее) ослабляло снижение транзитного входа  $Ca^{2+}$  и скорости его удаления. И атропин (блокатор мХР), и мекамиламин (блокатор нХР) значительно снижали защитное действие АХ от этого нарушения регуляции внутриклеточного  $Ca^{2+}$ . Более того, комбинация атропина и мекамиламина полностью устраняла защитное действие АХ. Таким образом, АХ ослабляет изменение гомеостаза внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , индуцированное  $H_2O_2$ , активируя как мускариновые, так и никотиновые холинорецепторы [62].

Другой фактор, вызывающий гибель кардиомиоцитов и необратимые повреждения мышцы сердца, — это кардиотоксичность химиотерапевтических препаратов, в частности антрациклиновых антибиотиков, особенно доксорубицина. Важный патофизиологический признак кардиотоксичности доксорубицина — кардиальная вегетативная neuropathia и связанные с ней митохондриальная и клеточная дисфункции. Для исследования защитного действия лигандов холинорецепторов у крыс вызывали кардиотоксический эффект введением доксорубицина (3 мг/кг в день, 6 доз). Затем в течение 30 дней вводили либо агонист нХР  $\alpha 7$  типа PNU-282987 (3 мг/кг в день), либо агонист мХР бетанехол (12 мг/кг в день), либо оба агони-

ста совместно. Активация  $\alpha 7$  нХР способствовала слиянию митохондрий посредством усиления регуляции Mfn1-2 и ослабляла доксирубицин-индуцированную аутофагию, а активация мХР тормозила деление митохондрий и митофагию, что сопровождалось уменьшением митохондриального окислительного повреждения, а также апоптоза и воспаления [63].

Повреждение сердца может вызываться также вирусами. В частности, вирус Коксаки типа В3 инфицирует сердце и вызывает миокардит, сопровождающийся апоптозом кардиомиоцитов. Исследование влияния защитной роли нХР при вирусном миокардите с использованием ПЦР в реальном времени показало, что уровень нХР, содержащего субъединицы  $\alpha 3\beta 4$ , в кардиомиоцитах новорожденных крыс и клетках H9c2 (кардиомиоцитах) возрастает при инфицировании вирусом Коксаки В3 [38]. Никотин при концентрации от 1 нМ до 1 мкМ ослаблял репликацию вируса в клетках H9c2 и кардиомиоцитах новорожденных крыс, однако при более высокой концентрации (10 мкМ) это влияние ослабевало. *In vitro* блокирование  $\alpha 3\beta 4$  нХР его специфическим ингибитором  $\alpha$ -конотоксином AuIB отменяло опосредованную никотином защиту кардиомиоцитов от апоптоза, индуцированного вирусом, и это блокирование коррелирует с активацией пути PI3K/Akt и индукцией антиапоптотического белка сурвивина. *In vivo* у группы инфицированных мышей, получавших AuIB, были ниже выживаемость и хуже систолическая функция желудочков, а также более тяжелое воспаление, чем у группы мышей, получавших только никотин. Таким образом,  $\alpha 3\beta 4$  нХР участвуют в опосредованной никотином защите кардиомиоцитов от вирус-индуцированного апоптоза *in vivo* и *in vitro* [38].

Низкие дозы никотина способствуют аутофагии кардиомиоцитов новорожденных мышей, ингибируя апоптоз, но в высоких дозах никотин ингибирует аутофагию и способствует апоптозу. Более того, никотин в низких дозах повышал экспрессию гемоксигеназы-1, а нокдаун гена гемоксигеназы-1 отменял эффекты никотина на аутофагию и апоптоз. Селективный блокатор  $\alpha 7$  нХР метилликаонитин ингибировал и экспрессию гемоксигеназы-1, и влияние никотина на аутофагию и апоптоз. Эти данные дополнительно подтверждают то, что активация  $\alpha 7$  нХР никотином в низких дозах способствует аутофагии и ингибирует апоптоз кардиомиоцитов [64].

Суммарно представленные данные указывают на то, что активация холинорецепторов оказывает кардиопротекторное действие. Сам АХ как лекарственное средство не используется в силу целого ряда причин, включая быстрое расщепление в организме, множественность биологических эффектов и др., но в целом лиганды холиноре-

цепторов могут рассматриваться в качестве защитных средств. Например, холин, взаимодействуя с холинорецепторами, проявляет множественные защитные эффекты против различных сердечно-сосудистых заболеваний, включая ОИМ [65], аритмии [66], сердечную гипертрофию [67, 68] и ишемически-реперфузионное повреждение [69]. Показано, что холин оказывает защитное действие против повреждения сосудов у крыс после ишемически-реперфузионного повреждения [70]. Эти защитные эффекты могут быть связаны с активацией рецептора М3 [57]. Исследование влияния холина на развитие сердечного фиброза показало, что он значительно ингибировал интерстициальный фиброз, и это благотворное действие было нейтрализовано 4-DAMP, селективным антагонистом М3 мХР [71]. Роль М3 в пролиферации сердечных фибробластов подтверждена путем подавления экспрессии М3 с помощью специфической малой интерферирующей РНК. Уровень белка М3, определенный вестерн-блоттингом, был выше у мышей с сердечным фиброзом. Холин регулирует сердечный фиброз и связанные с ним заболевания сердца, возможно, воздействуя на М3 [71]. Нельзя исключать, что наблюдаемые положительные эффекты холина объясняются увеличением или облегчением синтеза ацетилхолина с последующим возрастанием способности нейронов к массивному (или более длительному) выбросу в синапсы уже ацетилхолина. В принципе, не важно, сам ли холин или его производное ацетилхолин в конечном итоге оказывает описываемые эффекты [70]. Важно, что участие мХР (предположительно М3) в рассматриваемых процессах действительно подтверждено Zhao et al. при помощи его блокатора 4-DAMP [71].

Впрочем, гиперактивация холинорецепторов, в том числе М2, может причинить вред ССС. Кардиопатия, как следствие болезни Шагаса, – наиболее частое осложнение хронической протозойной инфекции, вызываемой простейшим *Trypanosoma cruzi*. У 30% пациентов, инфицированных *T. cruzi*, заболевание развивается до состояния, которое может привести к сердечной недостаточности и внезапной смерти. Иммуноглобулины пациентов с хронической формой болезни распознают кислый аминокислотный кластер во второй внеклеточной петле (e12) мХР М2 сердца [72]. Эти остатки соответствуют общему сайту связывания различных аллостерических агентов. Характеристика взаимодействия рецептора с антителами выявила положительный кооперативный эффект между эндогенным лигандом и антителами, приводящий к брадикардии. Аллостерический антагонист М2 галантамин и пептид, соответствующий петле e12, блокировали этот эффект. Таким образом, при хронической кардиопатии, вызванной болезнью Шагаса, усиление отве-

та М2 на АХ за счет аллостерического взаимодействия с антителами может объяснить основные симптомы, о которых сообщается при этом заболевании, такие как синусовая брадикардия и блокада атриовентрикулярной проводимости [72].

#### *Аутокринная ненейрональная холинергическая система сердца*

Известно, что миокард желудочков имеет весьма немногочисленную автономную иннервацию, при этом аппликациям АХ присуща однозначно кардиопротекторная направленность и для желудочков сердца. Как стало очевидно в последнее десятилетие, кардиомиоциты, подобно холинергическим нейронам, способны к синтезу и высвобождению АХ, а также к обратному поглощению холина для синтеза АХ. Главный смысл ненейрональной холинергической системы сердца – в паракринном распространении сигнала, поступившего от водителя ритма, от первых кардиомиоцитов к следующим кардиомиоцитам уже без участия нервной ткани, причем с амплификацией и одновременным вовлечением все большего числа соседних кардиомиоцитов. Медиатор этой системы – АХ, а основным рецептором считается мускариновый рецептор М2. Функции системы – распространение потенциала действия, контроль частоты сердечных сокращений, включая циркадный ритм сердца, ограниченное влияние на энергетический метаболизм и гипертрофию миокарда [15]. Интересно, что эта система регулирует ангиогенез коронарных артерий при ОИМ и другие ответы на гипоксию, однако эти эффекты опосредуются опять же через М2, а не через нХР, как в случаях ангиогенеза в других органах.

Кроме АХ, кардиомиоциты способны продуцировать пептид катестатин – неконкурентный блокатор нХР, ингибирующий секрецию катехоламинов в нервной ткани. Защитный эффект катестатина при ишемически-реперфузионном повреждении подобен таковому карбамоилхолина и блокируется атропином и AF-DX116, селективным антагонистом М2 мХР, но не перензепином, антагонистом М1. Более детальные исследования молекулярного механизма показали, что катестатин связывается с рецептором М2 и активирует пути ERK1/2 и PI3 K/Akt, ингибируя таким образом апоптоз клеток, вызванный стрессом эндоплазматического ретикулаума. Это приводит к ослаблению ишемически-реперфузионного повреждения. Из данных результатов следует, что за кардиопротекторный эффект катестатина отвечает не блокирование нХР, а активация им М2 мХР [73].

## ХОЛИНОРЕЦЕПТОРЫ В КРОВЕНОСНЫХ СОСУДАХ

Следует отметить, что такие кровеносные сосуды, как артерии и вены, состоят из трех слоев, включая внутренний эндотелиальный слой, который играет важную роль в контроле артериального давления, регуляции компонентов свертывания крови и ангиогенезе, и средний слой, содержащий гладкие мышцы, которые контролируют диаметр сосуда. Клетки обоих слоев могут содержать холинорецепторы, регулирующие функциональную активность кровеносных сосудов [74, 75]. Проведенные исследования показали, что релаксация сосудов, вызванная АХ, полностью зависит от интактного эндотелия и опосредована релаксирующими факторами эндотелиального происхождения, включая оксид азота.

#### *Мускариновые холинорецепторы в кровеносных сосудах*

Агонисты мХР могут вызывать как сокращение, так и расслабление стенки кровеносного сосуда. Подтипы мХР и результирующий эффект различаются в зависимости от анатомического расположения конкретного кровеносного сосуда, от того, повреждена ли эндотелиальная оболочка кровеносного сосуда, и даже от вида животного [76]. В общем виде М3 и/или М5 клеток эндотелия сосудов посредством белка Gq активируют фосфолипазу С, что приводит к синтезу инозитолтрифосфата и диацилглицерола с активацией протеинкиназы С и последующим высвобождением внутриклеточного кальция, который активирует эпителиальную NO-синтазу eNOS, конститутивно экспрессируемую в эндотелиальных клетках. Сосудистые эндотелиальные клетки могут вызывать вазодилатацию, высвобождая множество факторов релаксации, но основной эффект стимуляции мускариновых рецепторов в коронарных сосудах человека – вазодилатация за счет высвобождения оксида азота (NO) из функционального эндотелия [77]. Затем это мощное сосудорасширяющее соединение диффундирует в гладкомышечное волокно, где стимулирует синтез cGMP растворимой гуанилатциклазой, который через активацию протеинкиназы G запускает процесс вазорелаксации.

Однако у человека и некоторых других видов активация мХР также может вызывать вазоконстрикцию за счет активации рецепторов, присутствующих на гладких мышцах кровеносных сосудов (в частности, легочной артерии) [78]. В общем виде стимуляция М1 и/или М3 гладкомышечных клеток приводит аналогичным путем к высвобождению уже их собственного внутриклеточного кальция и активации кальмодулин-зависимой киназы, которая фосфорилирует киназу легкой

цепи миозина, что в итоге приводит к мышечно-му сокращению. В отсутствие функционального эндотелия эффект холинергической стимуляции гладкой мускулатуры становится незамаскированным, и в результате может наблюдаться вазоконстрикция [79].

**Подтип М1.** Рецептор М1 широко распространен по всей сосудистой системе, обнаруживается в эндотелии, артериях и легочных венах [80, 81]. Активация М1 в сосудистой сети способствует индукции вазодилатации. Вазодилатация зависит от интактного эндотелия из-за необходимой продукции NO. NO индуцирует вазодилатацию путем активации растворимой гуанилатциклазы, которая диффундирует в гладкомышечные клетки из эндотелия, что приводит к превращению GTP в cGMP. Затем cGMP активирует cGMP-зависимую протеинкиназу G, что приводит к удалению цитозольного Ca<sup>2+</sup>, ингибированию сократительного аппарата и стимулированию вазодилатации.

Характеристика подтипов мХР, вызывающих АХ-индуцированную эндотелий-независимую вазодилатацию в брыжеечных артериях крыс, показала, что в артериях с интактным эндотелием уровень экспрессии М1 и М3 был значительно выше, чем М2 [81]. Удаление эндотелия значительно снижало уровни экспрессии М2 и М3, но не М1.

В отличие от М3, М1 может вызывать дилатацию сосудов, не связанную с наличием эпителия. В перфузируемых мезентериальных сосудистых руслах с интактным эндотелием и активным тоном экзогенный АХ (1, 10 и 100 нМ) вызывал концентрационно-зависимую и длительную вазодилатацию. В препаратах без эндотелия АХ в концентрации 1 нМ к релаксации не приводил, но АХ при 10 и 100 нМ вызывал длительную вазодилатацию, которая заметно блокировалась при обработке пирензепином (антагонист М1) или 4-DAMP (антагонист М1 и М3) совместно с гексаметонием (антагонист нХР), но не метоктрамином (антагонист М2 и М4). Эти результаты свидетельствуют о том, что в брыжеечных артериях крысы присутствует в основном мХР подтипа М1, и его (и/или М3-подтипа) активация вызывает эндотелий-независимую вазодилатацию [81].

Однако М1 также играет определенную роль в вазоконстрикции. В частности, активация рецепторов М1 в гладкомышечных клетках сосудов может вызывать вазоконстрикцию в отсутствие эндотелия [17]. Этот подтип связан с вазоконстрикцией мозговых артерий кошек [82], подкожных вен собак [83] и церебральных артерий мышей [84]. Фармакологическая характеристика подтипов мХР, опосредующих сокращение пупочной вены человека, выявила участие рецепторов М1 в данном процессе. И в этом случае вазомоторная

активность, вызванная АХ, по-видимому, не модулируется эндотелиальными факторами [85].

Разработка специфических агонистов для рецепторов М1 может быть полезной для противодействия любому повышению артериального давления в малом круге кровообращения [74]. Интересно, что в этом круге имеется также и рецептор М3, а агонист М3 С1213 эффективен при легочной гипертензии [86]. Следует отметить еще один интересный факт о роли М1. На изолированных перфузируемых легких кроликов при моделировании тромбоемболии легочной артерии в условиях инфузии ацетилхолина показано, что блокатор М1 пирензепин не дает в этих условиях сильно повышаться давлению в легочной артерии [87].

АХ вызывает заложенность носа за счет вазодилатации интраназальных задних собирательных вен в сочетании с вазоконстракцией экстраназальных вен оттока (дорсальная носовая вена и клиновидно-небная вена). Характеристика подтипов мХР, участвующих в индуцированном АХ расслаблении и сокращении носовых вен собак, показала, что подтипы М1 и М3 локализованы в гладкой мускулатуре вен обоих типов. Это означает, что АХ расслабляет интраназальные вены и сужает экстраназальные вены в первую очередь за счет мХР М1 и М3, что указывает на терапевтическую ценность М1/М3-специфических или высокоселективных антихолинергических средств при заложенности носа [88].

**Подтип М2.** Хотя мХР подтипа М2 в основном связан с сердцем, он также обнаруживается по всей сосудистой сети, особенно в эндотелии коронарных сосудов. Физиологический эффект, связанный с активацией рецепторов этого подтипа, заключается в расширении сосудов [16]. Сосудорасширяющий эффект проявляется за счет высвобождения NO. Использование карбахола или пирензепина позволяет предположить, что М1 и М2 могут быть обнаружены в правой коронарной артерии человека, что также было подтверждено автордиографическими исследованиями сердца человека, хотя эти результаты предполагают, что М2 в основном экспрессируется в наружной оболочке коронарной артерии [16]. Методом ОТ-ПЦР гены рецепторов М2 и М3 были обнаружены в коронарных артериях человека [89]. Ни М1, ни М4 в исследованных образцах не экспрессировались.

**Подтип М3.** Рецепторы М3 также обнаружены в сосудистой системе, как в слое эндотелиальных клеток, так и в гладкомышечных клетках сосудов. Ген, кодирующий рецепторы М3, обнаружен в коронарных артериях человека [89]. Эти рецепторы, по-видимому, играют доминирующую роль в АХ-индуцированной вазодилатации большинства кровеносных сосудов [90]. М3 опосредует ва-

зодилатацию в бедренной артерии и грудной аорте только за счет продукции оксида азота эпителием сосудов [90]. Однако ответ на АХ зависит от функциональной целостности эндотелия. В сосудистой системе активация рецепторов М3 и М5 в эпителиальных клетках вызывает вазорелаксацию, в то время как активация рецепторов М3 или М1 в гладкомышечных клетках сосудов в отсутствие эндотелия может вызывать вазоконстрикцию [17]. Так, у кошек активация М3 при интактном эндотелии ведет к вазодилатации, тогда как активация гладкой мускулатуры в отсутствие эндотелия вызывает вазоконстрикцию [91]. При патологиях, при которых эндотелиальный слой повреждается или удаляется, активация М3 на гладкомышечных клетках вызывает вазоконстрикцию [92]. АХ-индуцированная вазоконстрикция, опосредованная стимуляцией подтипа М3 рецепторов при удалении или разрушении эндотелиального слоя, описана для легочной артерии человека [80], перфорирующей ветви внутренней грудной артерии человека [79], коронарной артерии крупного рогатого скота [93] и коронарных артерий свиней [94]. Не исключается участие рецепторов М3 (вместе с М1) и в индуцированной АХ вазоконстрикции в кольцах пупочной вены человека [85].

Исследование мХР М3 в глазных артериях мыши с помощью ПЦР в реальном времени показало, что в артериях с интактным эндотелием имеется мРНК, кодирующая все пять подтипов мХР, но с наибольшим содержанием мРНК рецептора М3. В артериях с удаленным эндотелием рецепторы М1, М2 и М3 демонстрировали сходные уровни экспрессии мРНК, которые были выше, чем у рецепторов М4 и М5. АХ вызывал сужение сосудов в артериях с удаленным эндотелием, которое практически исчезало после инкубации с атропином, блокирующим мХР. Данные, полученные с использованием мышей, дефицитных по М3 (М3R<sup>-/-</sup>), свидетельствуют о том, что в глазных артериях мыши М3 опосредует холинергическую эндотелий-независимую вазодилатацию и эндотелий-независимую вазоконстрикцию [92].

Рецепторы М3 локализованы в гладкой мускулатуре интраназальных задних собирательных вен и экстраназальных вен оттока (дорсальная носовая вена и клиновидно-небная вена), а также в эндотелии интраназальных вен носа собаки и, возможно, наряду с М1 и М2, участвуют в индуцированном АХ расслаблении интраназальных и сокращении экстраназальных вен [88].

**Подтипы М4 и М5.** Информация о наличии мХР подтипов М4 и М5 в кровеносных сосудах весьма ограничена. Так, использование селективного блокатора мХР М4-подтипа холинорецепторов тропикамида в опытах на крысах показало, что в зависимости от дозы у животных наблю-

дался целый ряд сосудистых эффектов. В частности, ингибирование М4 тропикамидом в дозах 1–100 мкг/кг (не превышающих порог селективности препарата) вызывает транзиторное и дозозависимое снижение артериального давления и общего периферического сосудистого сопротивления [34]. Интересно, что хотя сосудорасширяющий эффект тропикамида не органоспецифичный, он ярко проявляется только в отношении исследованных артерий; при этом скорость органного портального кровотока у большинства животных не изменяется, а у 25% крыс она временно незначительно возрастает [95]. На основании полученных данных авторы предполагают возможное участие М4 в ацетилхолин-индуцированной вазоконстрикции.

Что касается мХР подтипа М5, то сообщается, что этот рецептор опосредует холинергические реакции в церебральных кровеносных сосудах (данные получены с использованием нокаутных мышей М5R<sup>-/-</sup>) [96]. Воздействуя на М5 эндотелия сосудов, ацетилхолин дозозависимо вызывает повышение концентрации внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> в эндотелии через его резкий выброс из внутриклеточных депо с последующим поддержанием за счет входа внеклеточного Ca<sup>2+</sup>. Путь включает активацию фосфолипазы Сβ и синтез инозитолтрифосфата InsP<sub>3</sub>R3, что в конечном итоге приводит к выработке оксида азота и к эндотелий-зависимой вазодилатации [97]. Интересно, что результаты исследований с использованием мышей, нокаутных по М1, М3 и М5, показали, что за пределами церебральных сосудов М5, по видимому, не играет значительной роли в вазодилатации [98].

#### *Никотиновые холинорецепторы в кровеносных сосудах*

Следует отметить, что в кровеносных сосудах обнаружены практически все субъединицы нХР. Так, экспрессия нХР α7-типа в кровеносных сосудах была первоначально описана в эндотелиальных клетках бычьей аорты [99]. Вскоре после этого α7 нХР были аналогичным образом идентифицированы в эндотелиальных клетках человека из микроциркуляторного русла и вен пуповины, где они вносят вклад в ангиогенный ответ на гипоксию и ишемию [100].

Распределение различных α-субъединиц нХР в артериальной системе крыс исследовали *in situ* с помощью ОТ-ПЦР и иммуногистохимии [101, 102]. Было обнаружено, что в эндотелиальных клетках экспрессируются субъединицы α3, α5, α7 и α10, что позволяет предположить формирование каналов, предпочтительно проницаемых как для кальция (гомопентамерные α7 нХР), так и для моновалентных катионов (гетеропентамеры, со-



державшие  $\alpha 3$ - и  $\alpha 5$ -субъединицы). Все подтипы  $\alpha$ -субъединиц, кроме  $\alpha 9$ , экспрессировались гладкомышечными клетками сосудов с высоко-специфичным паттерном распределения по сосудистому дереву, в то время как каждая из субъединиц, кроме  $\alpha 9$ , была обнаружена в грудной аорте, внутрилегочные артериальные ветви содержали только иммунореактивную  $\alpha 7$ -субъединицу, а другие сосудистые русла занимали промежуточное положение по степени разнообразия экспрессируемых  $\alpha$ -субъединиц [101].

Экспрессия  $\alpha 7$  нХР также установлена в клетках гладкой мускулатуры аорты крыс [103], базиллярной артерии морской свинки [104], церебральных артерий человека [105] и артерий пуповины [106]. Наличие субъединиц  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$  и  $\alpha 10$  в гладкомышечных клетках показано в целом ряде работ (например, [99, 107]). Интересно, что  $\alpha 4$ -субъединица была обнаружена в брюшной аорте и не обнаруживается в восходящей аорте, легочном стволе, мышечных, почечных или легочных артериях [101, 107].  $\alpha 7$ -нХР экспрессируется на гладкомышечных клетках большинства сосудов, за исключением сосудов почек, и внутрилегочных артериях [107, 108]. В дополнение к указанным выше еще несколько работ показывают, что субъединицы  $\alpha 3$ -,  $\alpha 5$ -,  $\alpha 7$ -,  $\alpha 10$ - и  $\beta 2$ - $\beta 4$  также обнаруживаются в эндотелиальных клетках сосудов человека [99, 109, 110]. Кроме того, иммуногистохимическое окрашивание с использованием антител, специфичных к определенным субъединицам нХР, показало, что субъединицы  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 7$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 4$  экспрессируются эндотелиальными клетками пупочной вены человека [100]. Также было обнаружено, что эндотелиальные клетки коронарных микрососудов крысы экспрессировали мРНК субъединиц  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  и  $\alpha 7$ , а также  $\beta 2$  и  $\beta 4$  нХР, в то время как мРНК  $\beta 3$ -субъединицы не была обнаружена [111].

Методом позитронно-эмиссионной томографии *in vivo* с использованием радиоактивно меченого 2- $^{18}\text{F}$ -фтор-3-[2(S)-2-азетидинилметокси]пиридина ( $^{18}\text{F}$ ]-2-фтор-А85380), обладающего высоким сродством к нХР, содержащим  $\beta 2$ -субъединицу, проведена визуализация артериальных нХР человека [112]. Наличие [ $^{18}\text{F}$ ]-2-фтор-А85380 количественно обнаруживалось в восходящей и нисходящей аорте, дуге аорты и сонных артериях. Было продемонстрировано специфическое поглощение индикатора стенками артерий. Значительно более высокие значения поглощения были обнаружены в нисходящей аорте [112].

Из приведенных данных следует, что в сосудистой системе нХР представлены существенно шире, чем мХР, но, в отличие от последних, они мало связаны с регуляцией сосудистого тонуса, хотя такие сведения также имеются.

В частности, при ингибировании мХР атропином нХР опосредуют вызванное АХ расслабление аорты крыс [113]. Как уже отмечалось, АХ вызывает эндотелий-зависимую релаксацию в аорте, и мХР играют существенную роль в этом процессе. Однако никотин индуцировал эндотелий-зависимую релаксацию как у гипертензивных, так и у нормотензивных крыс посредством активации  $\alpha 7$  нХР. Таким образом, активация нХР может способствовать индуцированной АХ эндотелий-зависимой релаксации в аорте, т.е. эти рецепторы участвуют в эндотелий-зависимой регуляции сосудистого тонуса [113].

Следовательно, нХР играют значительную роль в осуществлении контроля нескольких важнейших для ССС физиологических и патофизиологических процессов.

Хорошо известна модулирующая роль эндотелиального  $\alpha 7$  нХР как в физиологическом, так и в патологическом ангиогенезе [114, 115]. Проведенные исследования показали, что активация эндотелиального  $\alpha 7$  нХР – существенна для процессов пролиферации, миграции, старения и выживания клеток эндотелия [100, 104, 115–117]. В эндотелии сосудов специфические ионотропные свойства  $\alpha 7$  нХР (высокая проницаемость для  $\text{Ca}^{2+}$ ) и последующие  $\text{Ca}^{2+}$ -опосредованные внутриклеточные каскады могут играть важную роль в физиологии (ангиогенез) и патологии (воспаление и атерогенез). Механизмы, лежащие в основе этих эффектов, включают повышение внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , активацию митоген-активируемой протеинкиназы, фосфатидилинозитол-3-киназы, эндотелиальной NOS и NF- $\kappa\text{B}$ , повышение активности сиртуина 1 и активацию циклина [100, 104, 115, 116, 118].

С использованием комбинации фармакологических и биохимических методов, а также флуоресцентной микроскопии показано, что  $\alpha 7$  нХР в клетках эндотелия артерий крыс и эндотелия вен человека обнаруживаются при чрезвычайно низких уровнях экспрессии (~50 фмоль/мг белка), однако никотин в концентрации 50 мкМ увеличивает экспрессию рецептора в ~300 раз с одновременным увеличением его экспонированности на поверхности клетки, и этот эффект зависит от липидного состава мембраны клеток [119]. Воздействие никотина заметно стимулировало миграцию клеток и ускоряло заживление ран, этот процесс замедлялся в клетках, лишенных стерола. Ангиогенный эффект никотина усиливался при увеличении содержания холестерина в мембране.

Установлено, что нХР вовлечены в развитие ряда патологий и заболеваний ССС. Курение представляет собой один из наиболее важных факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, и никотин играет в этих процессах

существенную роль. Никотин вызывает дисфункцию сосудов, изменяя вазореактивность посредством эндотелий-зависимых и/или эндотелий-независимых механизмов и приводя к клиническим проявлениям. Помимо этого, никотин индуцирует ремоделирование сосудов за счет своего влияния на пролиферацию, миграцию и продукцию матрикса как эндотелия сосудов, так и клеток гладкой мускулатуры сосудов [120]. Хотя начальные проявления сосудистой дисфункции, вызванной никотином, могут быть обнаружены не сразу, эти изменения вносят вклад в патогенез серьезных заболеваний, включая атеросклероз, аневризму брюшной аорты, ишемическую болезнь сердца и ОИМ [121–123].

Накопленные данные указывают на то, что вредное воздействие никотина в составе табачного дыма на артериальную стенку может быть опосредовано именно нХР [100, 108–111, 124]. Эти опосредующие эффекты нХР связаны с контролем пролиферации гладкомышечных клеток и ангиогенеза, пролиферации эндотелиальных клеток, среди прочего, путем индукции экспрессии эндотелиальных факторов роста и повышения уровня эндотелиальной NOS в эндотелиальных клетках. Ранее уже обсуждалось, что как эндотелиальные, так и гладкомышечные клетки сосудов экспрессируют множественные  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы нХР [102, 111, 115, 125, 126], что делает сосудистую сеть прямой мишенью для никотина.

В частности, обнаружена существенная роль  $\alpha 7$  нХР в развитии сосудистых патологий. Изменение активности и распределения в клетках этого типа нХР связаны с ангиогенезом (миграция ранозаживляющих клеток) и атерогенезом (изменение содержания холестерина) в эндотелиальных клетках. В гладкомышечных клетках сосудов активация  $\alpha 7$  нХР связана с модуляцией миграции, подавлением окислительного стресса, ингибированием гиперплазии неоинтимы, аневризмы брюшной аорты и ремоделированием цитоскелета [127]. Интересно, что неоваскуляризация, миграция/пролиферация гладкомышечных клеток сосудов, ремоделирование сосудов и окислительный стресс способствуют возникновению и прогрессированию атеросклеротических бляшек [128].

Атеросклероз – медленно прогрессирующее хроническое воспалительное заболевание артерий большого и среднего калибра; он включает сложное рекрутирование иммунных клеток, накопление липидов и структурное ремоделирование сосудов. В нескольких типах клеток, участвующих в генезе и прогрессировании атеросклероза, включая макрофаги, дендритные клетки, Т- и В-клетки, эндотелиальные клетки сосудов и гладкомышечные клетки, обнаружена экспрессия нХР  $\alpha 7$ -типа. Кроме того,  $\alpha 7$  нХР – важный регулятор воспаления, поскольку этот рецептор опо-

средует ингибирование синтеза провоспалительных цитокинов, что приводит к ослаблению атеросклеротического процесса. С другой стороны, активация  $\alpha 7$  нХР способствует ангиогенезу и пролиферации гладкомышечных клеток сосудов, что может усиливать атеросклеротические изменения. Вследствие всех этих эффектов  $\alpha 7$  нХР – один из ключевых элементов сложной патофизиологии атеросклероза и может представлять многообещающую мишень для лечения воспаления сосудов и атеросклероза [127].

Показано, что нарушение функции  $\alpha 7$  нХР с помощью фармакологических антагонистов (например,  $\alpha$ -бунгаротоксина или метиликаконитина) или с использованием методологии siРНК ослабляет ангиогенез в экспериментальных моделях ишемического повреждения [114, 124]. Таким образом, агенты, ингибирующие  $\alpha 7$  нХР, могут быть полезны для подавления ангиогенеза бляшек при атеросклерозе [129].

Интересно, что нХР, содержащий  $\alpha 1$ -субъединицу, так называемый мышечный нХР, также может быть вовлечен в патогенез атеросклероза [6, 43]. Так, введение плазмидной ДНК, экспрессирующей siRNA для  $\alpha 1$ -субъединицы, мышам с дефицитом аполипопротеина Е (ApoE<sup>-/-</sup>), получавшим атеросклеротическую диету с высоким содержанием жиров, приводило к снижению уровней  $\alpha 1$  нХР, значительному уменьшению площади атеросклеротического поражения и других проявлений атеросклероза [130, 131]. Следовательно, продукт гена  $\alpha 1$ -субъединицы нХР в стенке артерии обладает некоторым функционалом, и снижение его экспрессии замедляет развитие атеросклеротической бляшки.

Таким образом, нХР играют важную роль в процессах, способствующих развитию бляшек и включающих миграцию и пролиферацию гладкомышечных клеток, а также неоваскуляризацию бляшек [132]. Ранее уже обсуждалось использование меченного радиоактивным изотопом лиганда нХР для обнаружения нХР в ткани сонных артерий, дуги аорты и нисходящей аорты [112], а также сердца у человека *in vivo* [39]. Вполне возможно, что такие агенты могут быть использованы для визуализации атеросклеротических бляшек у пациентов.

Следовательно, никотиновый холинергический путь регулирует несколько компонентов атерогенеза, включая воспаление, фенотип гладкомышечных клеток, их пролиферацию и миграцию, а также неоваскуляризацию бляшек. Все это говорит о возможном использовании лигандов нХР в терапии атеросклероза.

Таблица 1. Участие холинорецепторов в регуляции сердечно-сосудистой системы\*

	Мускариновый холинорецептор.					Никотиновый холинорецептор.		
	Метаботропный рецептор, сопряженный с G-белком					Ионотропный рецептор – катионный канал		
	M1	M2	M3	M4	M5	$\alpha\beta\gamma\delta$	$\alpha\beta\beta_4$	$\alpha\gamma^{7**}$
Принципиальные локализации в ССС	Миокард (желудочки), эндотелий и мышечная стенка сосудов	Предсердия, проводящая система сердца, эндотелий коронарных сосудов	Миокард, водитель ритма, эндотелий и мышечная стенка сосудов	Предсердия, сосуды	Эндотелий церебральных сосудов	–	Кардиомиоциты	Проводящая система сердца, фибробласты, кардиомиоциты
Регулируемые процессы	Сократительная способность сердца					–	–	Холинергический противовоспалительный путь, ангиогенез, апоптоз
	–	Реперфузия после ишемии миокарда	–			–	–	–
Влияние на сердце	Увеличение частоты и силы сокращений сердца		Замедление ритма			Брадикардия (возможно)	–	Кардиопротекция, ингибирование апоптоза кардиомиоцитов
			Тонус кровеносных сосудов				–	Защита кардиомиоцитов от вирус-индуцированного апоптоза
Влияние на сосуды	Эндотелий-зависимая и независимая вазодилатация, вазоконстрикция некоторых сосудов		Эндотелий-зависимая вазодилатация, эндотелий-независимая вазоконстрикция			Вазоконстрикция	Развитие атеросклеротических бляшек	Прролиферация и выживание эндотелиальных и мышечных клеток сосудов, эндотелий-зависимая релаксация аорты, неоваскуляризация атеросклеротических бляшек
			Ацетилхолин, карбахол, бетанехол				–	Ацетилхолин, никотин (кроме $\alpha\beta\gamma$ ), холин
Общие агонисты***			С1213, холин			–	–	PNU-282987, GTS21
Селективные агонисты***			Катестатин			–	–	–
Общие антагонисты***			Мускарин			Катестатин, мекамиламин		
Селективные антагонисты***	Пирензепин, 4-DAMP (менее предпочтительно)	Галантамин****, AF-DX116, метоктрамин	4-DAMP (более предпочтительно)	Тропикамид, метоктрамин	–	–	–	Гексаметоний
								$\alpha$ -Бунгаротоксин, тубокурарин

\* Табл. 1 отражает не все сведения об ацетилхолиновых рецепторах: она суммирует данные, которые связаны с участием ацетилхолиновых рецепторов в регуляции ССС и обсуждаются в данном обзоре.

\*\* В тканях сердца и сосудов описана экспрессия ряда других подтипов nAChR (или их субъединиц), но их роль в регуляции ССС не установлена.

\*\*\* В качестве примера приведены те соединения, которые обсуждаются в тексте, или наиболее широко известные препараты.

\*\*\*\* Антихолинэстеразное вещество, одновременно выступающее аллостерическим ингибитором M2-подтипа nAChR.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Холинорецепторы, как метаботропные мускариновые, так и ионотропные никотиновые, участвуют в важнейших физиологических и патофизиологических процессах, протекающих в сердечно-сосудистой системе (табл. 1). При этом разные подтипы холинорецепторов различным образом вовлечены в эти процессы. Для более точного описания таких процессов требуется намного больше информации о структуре и функционировании данных рецепторов. Такая информация может быть получена с применением лигандов, селективных к определенным подтипам холинорецепторов, в этом плане более удобны селективные блокаторы, “выключающие” тот или иной подтип рецептора. Поиск таких соединений — важная фундаментальная задача биоорганической химии.

Для борьбы с некоторыми заболеваниями ССС, например, с аритмиями, медицина уже использует ряд лигандов холинорецепторов. Приведенные в обзоре результаты многочисленных экспериментов показывают, что положительное влияние на здоровье достигается чаще активацией рецепторов при соответствующих состояниях. Следовательно, поиск таких соединений, прежде всего активаторов (холиномиметиков), селективных к конкретным подтипам холинорецепторов, имеет уже и прикладное значение, поскольку будет способствовать решению ряда важных медицинских проблем. Среди них — лечение и профилактика аритмий, нарушений сосудистого тонуса, атеросклероза, миокардитов и других связанных с воспалением ССС нозологий.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-14-00316).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Орлов Р.С., Ноздрачев А.Д. // Нормальная физиология. Глава 23. Сердечно-сосудистая система. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2009. С. 472–526.

2. Kostenis E., Zeng F.Y., Wess J. // *Life Sci.* 1999. V. 64. P. 355–362.  
[https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(98\)00574-8](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(98)00574-8)
3. Leach K., Simms J., Sexton P.M., Christopoulos A. // *Handb. Exp. Pharmacol.* 2012. V. 208. P. 29–48.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-642-23274-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-23274-9_2)
4. Hulme E.C., Birdsall N.J., Buckley N.J. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1990. V. 30. P. 633–673.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.pa.30.040190.003221>
5. Haga K., Kruse A.C., Asada H., Yurugi-Kobayashi T., Shiroishi M., Zhang C., Weis W.I., Okada T., Kobilka B.K., Haga T., Kobayashi T. // *Nature.* 2012. V. 482. P. 547–551.  
<https://doi.org/10.1038/nature10753>
6. Maeda S., Qu Q., Robertson M.J., Skiniotis G., Kobilka B.K. // *Science.* 2019. V. 364. P. 552–557.  
<https://doi.org/10.1126/science.aaw5188>
7. Thompson A.J., Lester H.A., Lummis S.C. // *Q. Rev. Biophys.* 2010. V. 43. P. 449–499.  
<https://doi.org/10.1017/S0033583510000168>
8. Nys M., Kesters D., Ulens C. // *Biochem. Pharmacol.* 2013. V. 86. P. 1042–1053.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.07.001>
9. Noviello C.M., Gharpure A., Mukhtasimova N., Cabuco R., Baxter L., Borek D., Sine S.M., Hibbs R.E. // *Cell.* 2021. V. 184. P. 2121–2134.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.049>
10. Oakes J.M., Fuchs R.M., Gardner J.D., Lazartigues E., Yue X. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2018. V. 315. P. R895–R906.  
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00099.2018>
11. Jutkiewicz E.M., Rice K.C., Carroll F.I., Woods J.H. // *Drug Alcohol Depend.* 2013. V. 131. P. 284–297.  
<https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2012.12.021>
12. Casado M.A., Marín J., Salaices M. // *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1992. V. 346. P. 391–394.  
<https://doi.org/10.1007/BF00171079>
13. Alonso M.J., Arribas S., Marín J., Balfagón G., Salaices M. // *Brain Res.* 1991. V. 567. P. 76–82.  
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91438-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91438-7)
14. Deng A.Y., Huot-Marchard J.É., deBlois D., Thorin E., Chauvet C., Menard A. // *Can. J. Cardiol.* 2019. V. 35. P. 661–670.  
<https://doi.org/10.1016/j.cjca.2018.12.029>
15. Saw E.L., Kakinuma Y., Fronius M., Katare R. // *J. Mol. Cell Cardiol.* 2018. V. 125. P. 129–139.  
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.10.013>
16. Saternos H.C., Almarghalani D.A., Gibson H.M., Meqdad M.A., Antypas R.B., Lingireddy A., AbouAlaiwi W.A. // *Physiol. Genomics.* 2018. V. 50. P. 1–9.  
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00062.2017>
17. Harvey R.D. // In: *Muscarinic Receptors. Handbook of Experimental Pharmacology.* Berlin: Springer, 2012. V. 208. P. 299–316.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-642-23274-9\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-642-23274-9_13)
18. Brodde O.E., Michel M.C. // *Pharmacol. Rev.* 1999. V. 51. P. 651–690.
19. Harvey R.D., Belevych A.E. // *Br. J. Pharmacol.* 2003. V. 139. P. 1074–1084.  
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705338>

20. Sterin-Borda L., Echagüe A.V., Leiros C.P., Genaro A., Borda E. // *Br. J. Pharmacol.* 1995. V. 115. P. 1525–1531.  
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1995.tb16646.x>
21. Wang Y.G., Rechenmacher C.E., Lipsius S.L. // *J. Gen. Physiol.* 1998. V. 111. P. 113–125.  
<https://doi.org/10.1085/jgp.111.1.113>
22. Navarro-Polanco R.A., Moreno Galindo E.G., Ferrer-Villada T., Arias M., Rigby J.R., Sanchez-Chapula J.A., Tristani-Firouzi M. // *J. Physiol.* 2011. V. 589. P. 1741–1753.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.204107>
23. Moss R., Sachse F.B., Moreno-Galindo E.G., Navarro-Polanco R.A., Tristani-Firouzi M., Seemann G. // *PLoS Comput. Biol.* 2018. V. 14. P. e1006438.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006438>
24. Wang H., Lu Y., Wang Z. // *Auton. Autacoid Pharmacol.* 2007. V. 27. P. 1–11.  
<https://doi.org/10.1111/j.1474-8673.2006.00381.x>
25. Patanè S. // *Int. J. Cardiol.* 2014. V. 177. P. 646–649.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.09.178>
26. Wang H., Han H., Zhang L., Shi H., Schram G., Nattel S., Wang Z. // *Mol. Pharmacol.* 2001. V. 59. P. 1029–1036.  
<https://doi.org/10.1124/mol.59.5.1029>
27. Wang Z., Shi H., Wang H. // *Br. J. Pharmacol.* 2004. V. 142. P. 395–408.  
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705787>
28. Lymperopoulos A., Cora N., Maning J., Brill A.R., Sizova A. // *FEBS J.* 2021. V. 288. P. 2645–2659.  
<https://doi.org/10.1111/febs.15771>
29. Abramochkin D.V., Tapilina S.V., Sukhova G.S., Nikolsky E.E., Nurullin L.F. // *Pflugers Arch.* 2012. V. 463. P. 523–529.  
<https://doi.org/10.1007/s00424-012-1075-1>
30. Pérez C.C.N., Tobar I.D.B., Jiménez E., Castañeda D., Rivero M.B., Concepción J.L., Chiurillo M.A., Bonfante-Cabarcas R. // *Pharmacol. Res.* 2006. V. 54. P. 345–355.  
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2006.07.001>
31. Heijman J., Kirchner D., Kunze F., Chrétien E.M., Michel-Reher M.B., Voigt N., Knaut M., Michel M.C., Ravens U., Dobrev D. // *Int. J. Cardiol.* 2018. V. 255. P. 61–68.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.12.050>
32. Poller U., Nedelka G., Radke J., Pönicke K., Brodde O.E. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 1997. V. 29. P. 187–193.  
[https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(96\)00437-8](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(96)00437-8)
33. Shi H., Wang H., Wang Z. // *Mol. Pharmacol.* 1999. V. 55. P. 497–507.
34. Коваленко Н.Я., Мациевский Д.Д., Решетняк В.К. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2013. Т. 57. № 3. С. 23–26.
35. Krejčí A., Tucek S. // *Mol. Pharmacol.* 2002. V. 61. P. 1267–1272.  
<https://doi.org/10.1124/mol.61.6.1267>
36. Dvorakova M., Lips K.S., Brüggmann D., Slavikova J., Kuncova J., Kummer W. // *Cell Tissue Res.* 2005. V. 319. P. 201–209.  
<https://doi.org/10.1007/s00441-004-1008-1>
37. Li D.L., Liu B.H., Sun L., Zhao M., He X., Yu X.J., Zang W.J. // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2010. V. 37. P. 1114–1119.  
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2010.05448.x>
38. Li P., Yan Y., Shi Y., Cheng B., Zhan Y., Wang Q., Ye Q., Weng Y., Wu T., Wu R. // *Oxid. Med. Cell Longev.* 2019. V. 2019. P. e.9496419.  
<https://doi.org/10.1155/2019/9496419>
39. Bucerius J., Joe A.Y., Schmaljohann J., Gündisch D., Minnerop M., Biersack H.J., Wüllner U., Reinhardt M.J. // *Clin. Res. Cardiol.* 2006. V. 95. P. 105–109.  
<https://doi.org/10.1007/s00392-006-0342-6>
40. Brasch H., Iven H.B., Zetler G. // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1977. V. 299. P. 259–265.  
<https://doi.org/10.1007/BF00500318>
41. Fenton R.A., Dobson J.G. // *Am. J. Physiol.* 1985. V. 49. P. H463–H469.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1985.249.3.H463>
42. Nakatani T., Nakashima T., Satoh H. // *Gen. Pharmacol.* 1994. V. 25. P. 865–873.  
[https://doi.org/10.1016/0306-3623\(94\)90088-4](https://doi.org/10.1016/0306-3623(94)90088-4)
43. Malińska D., Więckowski M.R., Michalska B., Drabik K., Prill M., Patalas-Krawczyk P., Walczak J., Szymański J., Mathis C., Van der Toorn M., Luettich K., Hoeng J., Peitsch M.C., Duszyński J., Szczepanowska J. // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2019. V. 51. P. 259–276.  
<https://doi.org/10.1007/s10863-019-09800-z>
44. Katare R.G., Ando M., Kakinuma Y., Arikawa M., Handa T., Yamasaki F., Sato T. // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2009. V. 137. P. 223–231.  
<https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2008.08.020>
45. Calvillo L., Vanoli E., Andreoli E., Besana A., Omodeo E., Gneccchi M., Zerbi P., Vago G., Busca G., Schwartz P.J. // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2011. V. 58. P. 500–507.  
<https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31822b7204>
46. Li M., Zheng C., Sato T., Kawada T., Sugimachi M., Sunagawa K. // *Circulation.* 2004. V. 109. P. 120–124.  
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000105721.71640.DA>
47. Sun J., Lu Y., Huang Y., Wugeti N. // *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015. V. 8. P. 9334–9340.
48. Shinlapawittayatorn K., Chinda K., Palee S., Surinkaew S., Thunsiri K., Weerateerangkul P., Chattipakorn S., KenKnight B.H., Chattipakorn N.N. // *Heart Rhythm.* 2013. V. 10. P. 1700–1707.  
<https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2013.08.009>
49. Zhao M., He X., Bi X.Y., Yu X.J., Gil Wier W., Zang W.J. // *Basic Res. Cardiol.* 2013. V. 108. P. 345.  
<https://doi.org/10.1007/s00395-013-0345-1>
50. Xue R.Q., Sun L., Yu X.J., Li D.L., Zang W.J. // *J. Cell Mol. Med.* 2017. V. 21. P. 58–71.  
<https://doi.org/10.1111/jcmm.12938>
51. Intachai K., Chattipakorn S.C., Chattipakorn N., Shinlapawittayatorn K. // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. P. 2466.  
<https://doi.org/10.3390/ijms19092466>
52. Liu L., Zhao M., Yu X., Zang W. // *Neurosci. Bull.* 2019. V. 35. P. 156–166.  
<https://doi.org/10.1007/s12264-018-0286-7>
53. Li D.L., Liu J.J., Liu B.H., Hu H., Sun L., Miao Y., Xu H.F., Yu X.J., Ma X., Ren J., Zang W.J. // *J. Cell Physiol.* 2011. V. 226. P. 1052–1059.  
<https://doi.org/10.1002/jcp.22424>

54. Miao Y., Zhou J., Zhao M., Liu J., Sun L., Yu X., He X., Pan X., Zang W. // *Cell Physiol. Biochem.* 2013. V. 31. P. 189–198.  
<https://doi.org/10.1159/000343360>
55. Hang P.Z., Zhao J., Qi J.C., Wang Y., Wu J.W., Du Z.M. // *Curr. Drug Targets.* 2013. V. 14. P. 372–377.
56. Liu Y., Wang S., Wang C., Song H., Han H., Hang P., Jiang Y., Wei L., Huo R., Sun L., Gao X., Lu Y., Du Z. // *J. Transl. Med.* 2013. V. 11. P. 209.  
<https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-209>
57. Lu X.Z., Bi X.Y., He X., Zhao M., Xu M., Yu X.J., Zhao Z.H., Zang W.J. // *Br. J. Pharmacol.* 2015. V. 172. P. 5619–5633.  
<https://doi.org/10.1111/bph.13183>
58. Liu Y., Sun L., Pan Z., Bai Y., Wang N., Zhao J., Xu C., Li Z., Li B., Du Z., Lu Y., Gao X., Yang B. // *Mol. Med.* 2011. V. 17. P. 1179–1187.  
<https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00093>
59. Mavropoulos S.A., Khan N.S., Levy A.C.J., Faliks B.T., Sison C.P., Pavlov V.A., Zhang Y., Ojamaa K. // *Mol. Med.* 2017. V. 23. P. 120–133.  
<https://doi.org/10.2119/molmed.2017.00091>
60. Monassier J.P. // *Arch. Cardiovasc. Dis.* 2008. V. 101. P. 491–500.  
<https://doi.org/10.1016/j.acvd.2008.06.014>
61. Dhalla N.S., Golfman L., Takeda S., Takeda N., Naganomo M. // *Can. J. Cardiol.* 1999. V. 15. P. 587–593.
62. Palee S., Apaijai N., Shinlapawittayatorn K., Chattipakorn S.C., Chattipakorn N. // *Cell Physiol. Biochem.* 2016. V. 39. P. 341–349.  
<https://doi.org/10.1159/000445628>
63. Prathumsap N., Ongnok B., Khuanjing T., Arinno A., Maneechote C., Apaijai N., Chunchai T., Arunsak B., Shinlapawittayatorn K., Chattipakorn S.C., Chattipakorn N. // *Transl. Res.* 2022. V. 243. P. 33–51.  
<https://doi.org/10.1016/j.trsl.2021.12.005>
64. Xing R., Cheng X., Qi Y., Tian X., Yan C., Liu D., Han Y. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020. V. 522. P. 1015–1021.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.11.086>
65. Wang S., Han H.M., Jiang Y.N., Wang C., Song H.X., Pan Z.Y., Fan K., Du J., Fan Y.H., Du Z.M., Liu Y. // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2012. V. 39. P. 343–349.  
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2012.05672.x>
66. Liu Y., Sun H.L., Li D.L., Wang L.Y., Gao Y., Wang Y.P., Du Z.M., Lu Y.J., Yang B.F. // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2008. V. 86. P. 860–865.  
<https://doi.org/10.1139/Y08-094>
67. Wang S., Han H.M., Pan Z.W., Hang P.Z., Sun L.H., Jiang Y.N., Song H.X., Du Z.M., Liu Y. // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2012. V. 385. P. 823–831.  
<https://doi.org/10.1007/s00210-012-0740-4>
68. Zhao Y., Wang C., Wu J., Wang Y., Zhu W., Zhang Y., Du Z. // *Int. J. Biol. Sci.* 2013. V. 9. P. 295–302.  
<https://doi.org/10.7150/ijbs.5976>
69. Zhao J., Su Y., Zhang Y., Pan Z., Yang L., Chen X., Liu Y., Lu Y., Du Z., Yang B. // *Br. J. Pharmacol.* 2010. V. 159. P. 1217–1225.  
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00606.x>
70. Liu L., Lu Y., Bi X., Xu M., Yu X., Xue R., He X., Zang W. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 42553.  
<https://doi.org/10.1038/srep42553>
71. Zhao L., Chen T., Hang P., Li W., Guo J., Pan Y., Du J., Zheng Y., Du Z. // *Front. Pharmacol.* 2019. V. 10. P. 1386.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01386>
72. Hernandez C.C., Nascimento J.H., Chaves E.A., Costa P.C., Masuda M.O., Kurtenbach E., Campos D.E., Carvalho A.C., Gimenez L.E. // *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 2008. V. 28. P. 375–401.  
<https://doi.org/10.1080/10799890802262319>
73. Liao F., Zheng Y., Cai J., Fan J., Wang J., Yang J., Cui Q., Xu G., Tang C., Geng B. // *Sci. Rep.* 2015. V. 16. P. 16590.  
<https://doi.org/10.1038/srep16590>
74. Walch L., Brink C., Norel X. // *Therapie.* 2001. V. 56. P. 223–226.
75. Radu B.M., Osculati A.M.M., Suku E., Banciu A., Tsenov G., Merigo F., Di Chio M., Banciu D.D., Tognoli C., Kacer P., Giorgetti A., Radu M., Bertini G., Fabene P.F. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 5083.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-05384-z>
76. Eglen R.M., Hegde S.S., Watson N. // *Pharmacol. Rev.* 1996. V. 48. P. 531–565.
77. Konidala S., Gutterman D.D. // *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2004. V. 46. P. 349–373.  
<https://doi.org/10.1016/j.pcad.2003.10.001>
78. Walch L., Norel X., Leconte B., Gascard J.P., Brink C. // *Therapie.* 1999. V. 54. P. 99–102.
79. Pesić S., Grbović L., Jovanović A. // *Pharmacology.* 2002. V. 64. P. 182–188.  
<https://doi.org/10.1159/000056169>
80. Norel X., Walch L., Costantino M., Labat C., Gorenne I., Dulmet E., Rossi F., Brink C. // *Br. J. Pharmacol.* 1996. V. 119. P. 149–157.  
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15688.x>
81. Tangsucharit P., Takatori S., Zamami Y., Goda M., Pakdeechote P., Kawasaki H., Takayama F. // *J. Pharmacol. Sci.* 2016. V. 130. P. 24–32.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpshs.2015.12.005>
82. Dauphin F., Ting V., Payette P., Dennis M., Hamel E. // *Eur. J. Pharmacol.* 1991. V. 207. P. 319–327.  
[https://doi.org/10.1016/0922-4106\(91\)90006-4](https://doi.org/10.1016/0922-4106(91)90006-4)
83. O'Rourke S.T., Vanhoutte P.M. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1987. V. 241. P. 64–67.
84. Shimizu T., Rosenblum W.I., Nelson G.H. // *Am. J. Physiol.* 1993. V. 264. P. H665–H669.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1993.264.3.H665>
85. Pujol Lereis V.A., Hita F.J., Gobbi M.D., Verdi M.G., Rodriguez M.C., Rothlin R.P. // *Br. J. Pharmacol.* 2006. V. 147. P. 516–523.  
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706654>
86. Ahmed M., VanPatten S., Lakshminrusimha S., Patel H., Coleman T.R., Al-Abed Y. // *Physiol. Rep.* 2016. V. 4. P. e13069.  
<https://doi.org/10.14814/phy2.13069>
87. Евлахов В.И., Березина Т.П., Поясов И.З., Овсянников В.И. // *Бюлл. эксперим. биол. мед.* 2021. Т. 171. № 2. С. 159–163.

- <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2021-171-2-159-163>
88. Lung M.A. // *Am. J. Rhinol. Allergy*. 2011. V. 25. P. e60–e65.  
<https://doi.org/10.2500/ajra.2011.25.3604>
  89. Niihashi M., Esumi M., Kusumi Y., Sato Y., Sakurai I. // *Angiology*. 2000. V. 51. P. 295–300.  
<https://doi.org/10.1177/000331970005100404>
  90. Bény J.L., Nguyen M.N., Marino M., Matsui M. // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2008. V. 51. P. 505–512.  
<https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31816d5f2f>
  91. Dauphin F., Hamel E. // *Eur. J. Pharmacol.* 1990. V. 178. P. 203–213.  
[https://doi.org/10.1016/0014-2999\(90\)90476-M](https://doi.org/10.1016/0014-2999(90)90476-M)
  92. Gericke A., Steege A., Manicam C., Böhmer T., Wess J., Pfeiffer N. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2014. V. 55. P. 625–631.  
<https://doi.org/10.1167/iovs.13-13549>
  93. Duckles S.P., Garcia-Villalon A.L. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1990. V. 253. P. 608–613.
  94. Jaiswal N., Lambrecht G., Mutschler E., Tacke R., Malik K.U. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991. V. 258. P. 842–850.
  95. Коваленко Н.Я., Мацневский Д.Д., Решетняк В.К. // *Бюлл. эксперим. биол. мед.* 2013. Т. 156. № 12. С. 697–700.
  96. Yamada M., Lamping K.G., Duttaroy A., Zhang W., Cui Y., Bymaster F.P., McKinzie D.L., Felder C.C., Deng C.X., Faraci F.M., Wess J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. P. 14096–14101.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.251542998>
  97. Zuccolo E., Laforenza U., Negri S., Botta L., Berra-Romani R., Faris P., Scarpellino G., Forcaia G., Pellavio G., Sancini G., Moccia F. // *J. Cell. Physiol.* 2019. V. 234. P. 4540–4562.  
<https://doi.org/10.1002/jcp.27234>
  98. Gericke A., Sniatecki J.J., Mayer V.G., Goloborodko E., Patzak A., Wess J., Pfeiffer N. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2011. V. 300. P. H1602–H1608.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00982.2010>
  99. Conti-Fine B.M., Navaneetham D., Lei S., Maus A.D.J. // *Eur. J. Pharmacol.* 2000. V. 393. P. 279–294.  
[https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(00\)00036-34](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00036-34)
  100. Heeschen C., Weis M., Aicher A., Dimmeler S., Cooke J.P. // *J. Clin. Invest.* 2002. V. 110. P. 527–536.  
<https://doi.org/10.1172/JCI14676>
  101. Brüggmann D., Lips K.S., Pfeil U., Haberberger R.V., Kummer W. // *Histochem. Cell. Biol.* 2002. V. 118. P. 441–447.  
<https://doi.org/10.1007/s00418-002-0475-2>
  102. Brüggmann D., Lips K.S., Pfeil U., Haberberger R.V., Kummer W. // *Life Sci.* 2003. V. 72. P. 2095–2099.  
[https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(03\)00067-5](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(03)00067-5)
  103. Wada T., Naito M., Kenmochi H., Tsuneki H., Sasaoka T. // *Endocr. Rev.* 2007. V. 148. P. 790–799.  
<https://doi.org/10.1210/en.2006-0907>
  104. Li D.-J., Zhao T., Xin R.-J., Wang Y.-Y., Fei Y.-B., Shen F.-M. // *Cell. Physiol. Biochem.* 2014. V. 33. P. 468–478.  
<https://doi.org/10.1159/000358627>
  105. Clifford P.M., Siu G., Kosciuk M., Levin E.C., Venkataraman V., D'Andrea M.R., Nagele R.G. // *Brain Res.* 2008. V. 1234. P. 158–171.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.07.092>
  106. Lips K.S., Brüggmann D., Pfeil U., Vollerthun R., Grando S.A., Kummer W. // *Placenta*. 2005. V. 26. P. 735–746.  
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.10.009>
  107. Gotti C., Clementi F. // *Prog. Neurobiol.* 2004. V. 74. P. 363–396.  
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.09.006>
  108. Egleton R.D., Brown K.C., Dasgupta P. // *Pharmacol. Ther.* 2009. V. 121. P. 205–223.  
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.10.007>
  109. Cooke J.P., Bitterman H. // *Ann. Med.* 2004. V. 36. P. 33–40.  
<https://doi.org/10.1080/07853890310017576>
  110. Macklin K.D., Maus A.D., Pereira E.F., Albuquerque E.X., Conti-Fine B.M. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998. V. 287. P. 435–439.
  111. Moccia F., Frost C., Berra-Romani R., Tanzi F., Adams D.J. // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2004. V. 286. P. H486–H491.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00620.2003>
  112. Bucerus J., Manka C., Schmaljohann J., Mani V., Gündisch D., Rudd J.H., Bippus R., Mottaghy F.M., Wüllner U., Fayad Z.A., Biersack H.J. // *JACC Cardiovasc. Imaging*. 2012. V. 5. P. 528–536.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2011.11.024>
  113. Zou Q., Leung S.W., Vanhoutte P.M. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2012. V. 341. P. 756–763.  
<https://doi.org/10.1124/jpet.112.192229>
  114. Cooke J.P., Ghebremariam Y.T. // *Trends Cardiovasc. Med.* 2008. V. 18. P. 247–253.  
<https://doi.org/10.1016/j.tcm.2008.11.007>
  115. Wu J.C.F., Chruscinski A., Perez V.A.D.J., Singh H., Pitsiouni M., Rabinovitch M., Utz P.J., Cooke J.P. // *J. Cell. Biochem.* 2009. V. 446. P. 433–446.  
<https://doi.org/10.1002/jcb.22270>
  116. Li D.-J., Huang F., Ni M., Fu H., Zhang L.-S., Shen F.-M. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2016. V. 36. P. 1566–1576.  
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307157>
  117. Liu L., Wu H., Cao Q., Guo Z., Ren A., Dai Q. // *Mediators Inflamm.* 2017. V. 2017. P. 2401027.  
<https://doi.org/10.1155/2017/2401027>
  118. Li X., Wang H. // *Life Sci.* 2006. V. 78. P. 1863–1870.  
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.08.031>
  119. Peña V.B., Bonini I.C., Antollini S.S., Kobayashi T., Barrantes F.J. // *J. Cell. Biochem.* 2011. V. 112. P. 3276–3288.  
<https://doi.org/10.1002/jcb.23254>
  120. Whitehead A.K., Erwin A.P., Yue X. // *Acta Physiol. (Oxf)*. 2021. V. 231. P. e13631.  
<https://doi.org/10.1111/apha.13631>
  121. Centner A.M., Bhide P.G., Salazar G. // *Cells*. 2020. V. 9. P. 1035.  
<https://doi.org/10.3390/cells9041035>
  122. Li Z.Z., Dai Q.Y. // *Mediators Inflamm.* 2012. V. 2012. P. 103120.  
<https://doi.org/10.1155/2012/103120>



123. Gaemperli O., Liga R., Bhamra-Ariza P., Rimoldi O. // *Curr. Pharm. Des.* 2010. V. 16. P. 2586–2597. <https://doi.org/10.2174/138161210792062894>
124. Cooke J.P. // *Life Sci.* 2007. V. 80. P. 2347–2351. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.01.061>
125. Boswijk E., Bauwens M., Mottaghy F.M., Wildberger J.E., Bucerius J. // *Methods.* 2017. V. 130. P. 90–104. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.06.008>
126. Vazquez-Padron R.I., Mateu D., Rodriguez-Menocal L., Wei Y., Webster K.A., Pham S.M. // *Cardiovasc. Res.* 2010. V. 88. P. 296–303. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq213>
127. Vieira-Alves I., Coimbra-Campos L.M.C., Sancho M., da Silva R.F., Cortes S.F., Lemos V.S. // *Front Physiol.* 2020. V. 11. P. 621769. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.621769>
128. Libby P., Buring J. E., Badimon L., Hansson G.K., Deanfield J., Bittencourt S., Tokgözoğlu L., Lewis E.F. // *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2019. V. 5. P. 56. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0106-z>
129. Santanam N., Thornhill B.A., Lau J.K., Crabtree C.M., Cook C.R., Brown K.C., Dasgupta P. // *Atherosclerosis.* 2012. V. 225. P. 264–273. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.07.041>
130. Lee J., Cooke J.P. // *Atherosclerosis.* 2011. V. 215. P. 281–283. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.01.003>
131. Zhang G., Marshall A.L., Thomas A.L., Kernan K.A., Su Y., LeBoeuf R.C., Dong X.R., Tcho B.N. // *Atherosclerosis.* 2011. V. 215. P. 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.07.057>
132. Brown K.C., Lau J.K., Dom A.M., Witte T.R., Luo H., Crabtree C.M., Shah Y.H., Shiflett B.S., Marcelo A.J., Proper N.A., Hardman W.E., Egleton R.D., Chen Y.C., Mangiarua E.I., Dasgupta P. // *Angiogenesis.* 2012. V. 15. P. 99–114. <https://doi.org/10.1007/s10456-011-9246-9>

## Muscarinic and Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Regulation of the Cardiovascular System

A. V. Osipov\*, A. S. Averin\*\*, E. R. Shaykhutdinova\*\*\*, I. A. Dyachenko\*\*\*, V. I. Tsetlin\*, and Y. N. Utkin\*,#

#Phone: +7 (495) 336-65-22; e-mail: [utkin@ibch.ru](mailto:utkin@ibch.ru); [yutkin@yandex.ru](mailto:yutkin@yandex.ru)

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

\*\*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino, 142290 Russia

\*\*\*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Pushchino Branch, Russian Academy of Sciences, prosp. Nauki 6, Pushchino, 142290 Russia

Many different receptors and ion channels regulating ion currents are involved in the regulation of the cardiovascular system (CVS). The functioning of the CVS occurs via mechanisms of both nervous and humoral regulation, and in both cases, acetylcholine receptors of different families and subtypes with different localization participate in the regulation processes. It has been shown that acetylcholine receptors are located on the cell membranes directly of the heart and blood vessels; and this review examines the mechanisms of regulation of the functions of the CVS with the participation of only those cholinergic receptors that are located in the tissue of the heart and blood vessels. In general, both muscarinic and nicotinic cholinergic receptors are widely represented in the tissues of the CVS. While muscarinic acetylcholine receptors are generally involved in the regulation of vascular tonus and contractility of the heart, the nicotinic acetylcholine receptors are mainly involved in the regulation of a number of important pathophysiological processes directly affecting the functioning of the CVS. Regulation of the functioning of cholinergic receptors can be considered as an addition to existing methods for the treatment of diseases of the CVS, including such diseases as atherosclerosis and heart failure. The use of blockers and activators of cholinergic receptors for the study and/or treatment of pathological conditions of the CVS is discussed.

*Keywords:* agonists, acetylcholine, blockers, blood vessels, muscarinic acetylcholine receptors, nicotinic acetylcholine receptors, contractility of the heart, epithelium



УДК 577.218

## БЕЛКИ ХОЛОДОВОГО ШОКА БАКТЕРИЙ КАК ИНСТРУМЕНТ АДАПТАЦИИ К СТРЕССУ

© 2023 г. А. С. Григоров\*, #, Т. Л. Ажикина\*

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

Поступила в редакцию 20.06.2022 г.

После доработки 26.07.2022 г.

Принята к публикации 12.08.2022 г.

Бактерии выработали ряд механизмов, позволяющих справляться со стрессом и приспосабливаться к изменяющимся условиям окружающей среды. Семейство бактериальных белков, содержащих функциональный домен холодового шока, – высококонсервативные белки, связывающие нуклеиновые кислоты, модулирующие транскрипцию и посттранскрипционные события у бактерий. Для многих бактерий показано, что белки холодового шока регулируют экспрессию различных генов, вовлеченных в процессы вирулентности и устойчивости бактерий к стрессам. В обзоре освещены новые данные о механизмах действия и роли белков холодового шока в регуляции экспрессии у внутриклеточных бактериальных патогенов.

*Ключевые слова:* бактерия, белки холодового шока, вирулентность, регуляция экспрессии

DOI: 10.31857/S0132342323010104, EDN: GFEUFH

### СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	23
БЕЛКИ ХОЛОДОВОГО ШОКА КАК РЕГУЛЯТОРЫ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ.....	24
БЕЛКИ ХОЛОДОВОГО ШОКА И ВИРУЛЕНТНОСТЬ.....	27
БЕЛКИ ХОЛОДОВОГО ШОКА – ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ГОМОЛОГИ Hfq?.....	29
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	29

### ВВЕДЕНИЕ

РНК-связывающие белки (RBP) – один из важных компонентов, участвующих в регуляции транскрипции у бактерий и позволяющих бактериям адаптироваться к стрессовым и меняющимся условиям. Один из самых известных примеров бактериальных РНК-связывающих белков – белок-шаперон Hfq, главная функция которого – опосредование взаимодействия между мРНК и малыми некодирующими РНК (нкРНК) бактерий [1, 2]. Ранее считалось, что это основной механизм, благодаря которому происходит взаимо-

действие нкРНК с их мишенями, однако позже стало понятно, что в разных видах бактерий роль Hfq могут играть и другие белки, например, обнаруженный недавно белок ProQ [3, 4]. Другая хорошо изученная категория RBP, регулирующих адаптивные реакции бактерий, – это белки холодового шока (cold shock protein, CSP). CSP представляют собой семейство небольших белков, высококонсервативных как по последовательности, так и по структуре. Эти ДНК- и РНК-связывающие шапероны содержат домены холодового шока (CSD) [5] и широко распространены среди всех живых организмов.

Структура CSD достаточно проста. Он имеет небольшой размер (67–73 а.о.) и представляет собой β-бочонок, состоящий из пяти антипараллельных β-тяжей (рис. 1). Связывание нуклеиновых кислот происходит за счет стэкинга между нуклеотидными основаниями и ароматическими аминокислотными остатками, расположенными на положительно заряженной поверхности, образованной β-цепями [6, 7]. Такие взаимодействия объясняют малую селективность связывания.

CSP наиболее широко изучены у *Escherichia coli*, именно для кишечной палочки впервые было показано накопление одного из белков (названного позднее CspA) до 13% от тотальной белковой массы при холодном стрессе [9]. Всего у *E. coli* описаны девять белков холодового шока, экспрессия четырех из них (CspA, CspB, CspG, CspI) индуци-

Сокращения: CSD – домен холодового шока (cold shock domain); CSP – белок холодового шока (cold shock protein); RBP – РНК-связывающий белок (RNA binding protein); SD – сайт связывания рибосомы (Shine–Dalgarno sequence); нкРНК – некодирующая РНК.

# Автор для связи: (тел.: +7 (495) 330-69-92; эл. почта: artgrigorov@gmail.com).



Рис. 1. Кристаллическая структура белка CspA *E. coli* (PDB ID: 3MEF).

руется низкими температурами [8], одного (CspD) – голоданием и в ранней стационарной фазе, два экспрессируются на постоянном уровне (CspC и CspE) [10]. Триггеры экспрессии CspF и CspH до сих пор неизвестны.

Гомологичные белки классифицируются как CSP у многих других видов бактерий. Yu et al. на основании филогенетического расстояния между нуклеотидными последовательностями кластеризовали гены CSP эубактерий на 5 различных клад и 12 субклад [11]. Проведенный эволюционный анализ показал, что общий предок генов белков холодового шока существовал >3.5 млрд лет назад, что указывает на исключительно важную роль этих белков в развитии жизни.

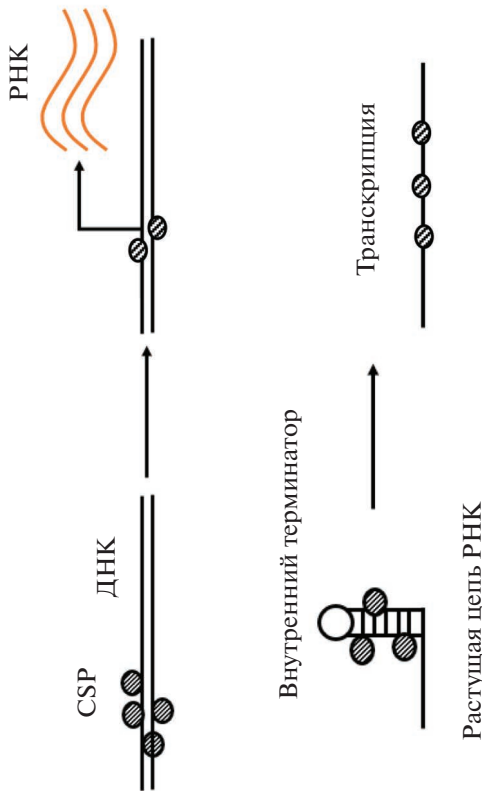
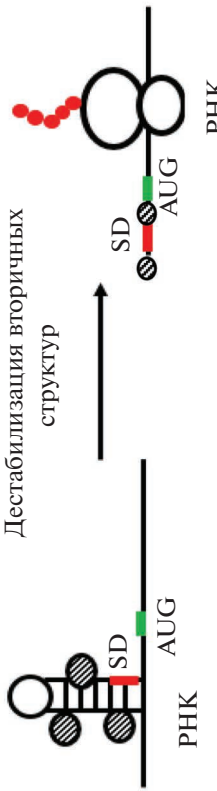
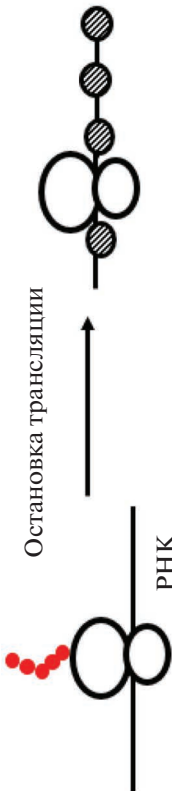
В последнее время широко обсуждаются другие роли CSP, не связанные с адаптацией к холодовому стрессу. Показано участие этих белков в процессах формирования биопленок, контроле подвижности бактерий и механизмах вирулентности у патогенных микроорганизмов. Активно исследуется вклад некоторых бактериальных CSP в механизмы инфекции у таких патогенов, как *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus aureus* (примеры будут рассмотрены ниже).

#### БЕЛКИ ХОЛОДОВОГО ШОКА КАК РЕГУЛЯТОРЫ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

CspA действует как шаперон, предотвращая формирование вторичных структур РНК при низких температурах [12]. В работе Rennella et al. [7] сообщается, что CspA *E. coli* предпочитительно связывает одноцепочечные богатые пиримидиновыми нуклеотидами последовательности мРНК, но также взаимодействует с двуцепочечными участками РНК. CspA активирует транскрипцию как минимум двух генов, участвующих в адаптации к низким температурам, – *hns* [13] и *gyrA* [14]. CspA может непосредственно участвовать в транскрипции генов как белок-антитерминатор, предотвращая преждевременную терминацию транскриптов [15]. CspA также подавляет собственную экспрессию, образуя петлю обратной связи [16]. Образованные при низких температурах высокоструктурированные участки РНК дестабилизируются в результате связывания с CSP, что может способствовать их деградации с помощью РНКаз [12].

В табл. 1 схематично представлены основные молекулярные процессы с бактериальными CSP в качестве ключевых участников.

Таблица 1. Белки холодОВОГО шока бактерий как регуляторы экспрессии генов у бактерий

Процесс	Схема	Примеры
<p>Активация транскрипции за счет связывания с регуляторными участками ДНК</p> <p>Транскрипционная антитерминация</p>	 <p>Схема</p> <p>ДНК</p> <p>РНК</p> <p>Внутренний терминатор</p> <p>Транскрипция</p> <p>Растущая цепь РНК</p>	<p><i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> [17], <i>Escherichia coli</i> [14, 18]</p> <p><i>Escherichia coli</i> [15], <i>Thermotoga maritima</i> [19]</p>
<p>Модуляция трансляции путем дестабилизации двухцепочечных участков РНК в регуляторных и кодирующих районах (как при низких температурах, так и в нормальных условиях)</p>	 <p>Дестабилизация вторичных структур</p> <p>РНК</p> <p>РНК</p> <p>Остановка трансляции</p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i> [20], <i>Escherichia coli</i> [21], <i>Salmonella enterica</i> [22]</p>
<p>Неселективное ингибирование трансляции при низких температурах и высоких концентрациях CSP за счет неспецифического связывания мРНК</p>	 <p>Остановка трансляции</p> <p>РНК</p>	<p>Эксперименты <i>in vitro</i> [23]</p>

Процесс	Схема	Примеры
Ускорение терминации транскрипции		<i>Bacillus subtilis</i> [24]
Регуляция деградации РНК за счет конформационных изменений, приводящих к формированию или экранированию участков гидролиза РНКаз		<i>Salmonella enterica</i> [25], <i>Staphylococcus aureus</i> [20], <i>Escherichia coli</i> [12]
Взаимодействие с нкРНК		<i>Staphylococcus aureus</i> [20], <i>Bacteroides</i> spp. [26]
Взаимодействие с деградосомой		<i>Mycobacterium tuberculosis</i> [27], <i>Escherichia coli</i> [28]

Примечание: CSP изображен в виде заштрихованных овалов.

БЕЛКИ ХОЛОДОВОГО ШОКА  
И ВИРУЛЕНТНОСТЬ

Роль белков холодового шока у бактерий с момента их открытия связывалась с адаптацией к изменяющимся условиям внешней среды и вирулентностью. Для *Listeria monocytogenes*, патогенной для человека бактерии, которая продуцирует три CSP (CspA, CspB и CspD), было показано, что экспрессия этих белков необходима для выживания в условиях пониженной температуры, окислительного и осмотического стресса [29, 30]. Делеция гена *cspD* приводит к сильному снижению вирулентных свойств штамма (аттенуации) в условиях холода. Делеция *cspA* полностью останавливает бактериальный рост при холодовом стрессе. CspD также участвует в адаптации бактерий к условиям осмотического стресса [30]. Однако экспрессия белков холодового шока необходима и в оптимальных для роста *L. monocytogenes* условиях как в культуре *in vitro*, так и при инвазии клеток хозяина, т.к. они регулируют формирование биопленок и биосинтез белков, входящих в состав жгутиков [31]. У штамма, содержащего делецию генов трех белков  $\Delta cspABD$ , а также у мутантных штаммов  $\Delta cspBD$ ,  $\Delta cspAD$  и  $\Delta cspAB$  было выявлено снижение количества мРНК и соответствующих продуктов генов *hly* (кодирует формирующий поры фактор вирулентности листериолизин O, LLO), *mpl* (металлопротеаза) и *plcA* (фосфолипаза C). Перечисленные белки – факторы, опосредующие выход *L. monocytogenes* из фагосом [32–34].

Также в мутантных штаммах практически отсутствовал белок ActA при повышении уровня мРНК *actA* по сравнению со штаммом дикого типа, что указывает на участие CSP в посттранскрипционной регуляции этого гена. ActA – многофункциональный вирулентный фактор. С одной стороны, ActA рекрутирует комплексы полимеризации актина, что способствует актиноопосредованной подвижности бактерии [35, 36]. С другой, этот белок ускоряет агрегацию бактерий и участвует в процессах персистенции внутри хозяина и трансмиссии [37].

Фенотипически делеция генов *csp* сопровождалась аттенуацией штаммов при заражении клеток моноцитов человека THP-1 и эмбрионов *Danio rerio*, частичной или полной потерей жгутика и снижением подвижности бактерий (у тройного мутанта подвижность вообще не наблюдалась) [31].

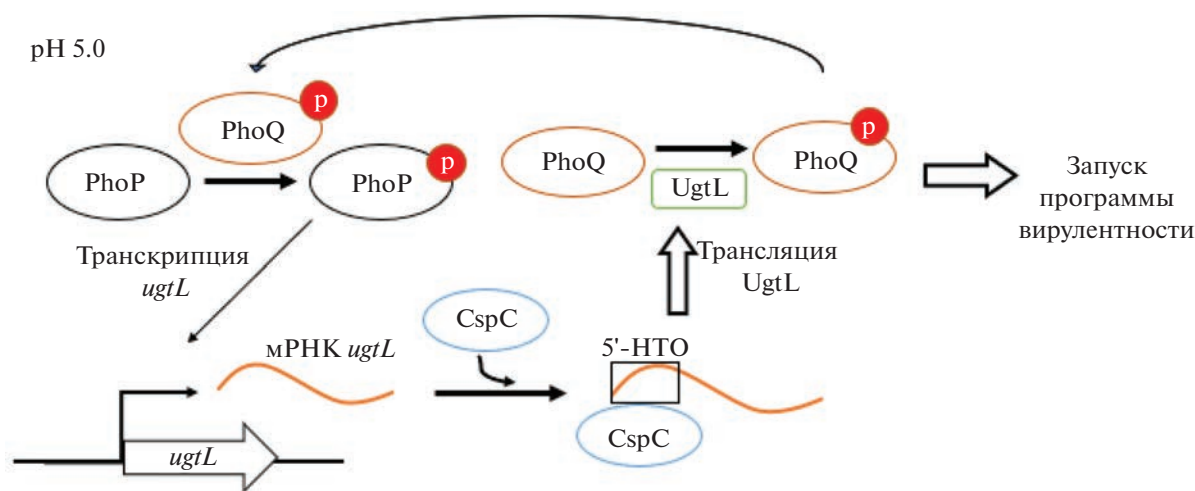
Важный фактор хронического бессимптомного носительства *Salmonella enterica* – колонизация желчного пузыря сальмонеллами. Для адаптации к высоким концентрациям желчи сальмонелла либо образует биопленки на поверхности желчных камней, либо поражает эпителий желчного пузыря [38]. Ray et al. [39] показали, что синтез CspE активируется во время стресса, вызванного

солями желчных кислот, а мутантный штамм *S. enterica*  $\Delta cspE$  проявляет дозозависимую чувствительность к солям желчных кислот. Авторы выявили новый транскрипционный фактор, кодируемый геном *yciF*, который активируется в ответ на желчный стресс в присутствии CspE. Эта регуляция обусловлена способностью CspE стимулировать образование одноцепочечной РНК, тем самым защищая мРНК *yciF* от деградации, которая может быть опосредована РНКазой E и РНКазой. Показано, что YciF подавляет синтез поринов OmpD, OmpF и OmpC, тем самым снижая проницаемость клеточной стенки и адаптируя бактерии к стрессовым условиям.

В исследовании белков холодового шока *S. enterica* был применен транскриптомный подход и проведен сравнительный анализ всех взаимодействующих с белком РНК (таргетомов) разных паралогов Csp [25]. Было показано, что белки CspC и CspE связывают большое число транскриптов, функциональный анализ которых выявил обогащение по категориям генов, связанных с ответом на различные стрессы и вирулентностью. При делеции генов *cspC* и *cspE* наблюдалось изменение экспрессии многих генов, входящих в РНК-таргетом этих белков (в том числе генов, связанных с бактериальной подвижностью). Штамм *S. enterica*, нокаутированный по генам *cspC/cspE*, становился полностью авирулентным в модели инфекции при заражении мышей линии BALB/c. При этом Choi et al. показали, что несмотря на высокую степень гомологии белков CspC и CspE, а также сильно перекрывающийся список их РНК-мишеней, существуют условия, в которых необходим только один из этих белков [22]. Так, при умеренно кислом значении pH, в том числе внутри макрофагов, CspC участвует в активации двухкомпонентной системы PhoP/PhoQ, которая запускает программу вирулентности *S. enterica*. CspC связывается с лидерной последовательностью мРНК гена *ugtL*, освобождая последовательность Шайна–Дальгарно, что приводит к инициации трансляции. UgtL критически важен для аутофосфорилирования PhoQ, при его отсутствии не активируется вся система (рис. 2). Авторы также показали, что при делеции гена *cspC* наблюдается уменьшение вирулентности штамма, что проявляется в снижении способности этого штамма колонизировать внутренние органы при заражении им мышей линии C3H/HeN [22].

Анализ таргета белка холодового шока CspA *S. aureus* также продемонстрировал тот факт, что подавляющее большинство РНК-мишеней вовлечено в реакцию адаптации бактерии в ответ на различные стрессы [20]. Кроме того, в таргетоме CspA найдены транскрипты генов, кодирующие белки, которые участвуют в катаболизме аминокислот, синтезе нуклеозидов и углеводов. При этом CspA способен как положительно влиять на





**Рис. 2.** Схематическое изображение запуска PhoP/PhoQ-системы *S. enterica* в условиях умеренно кислого pH. CspC усиливает трансляцию гена *ugtL*, продукт которого необходим для эффективного аутофосфорилирования PhoQ. Адаптировано из статьи Choi et al. [22].

экспрессию своих РНК-мишеней, так и негативно. Интересно, что до сих пор не очень понятно, каким образом CspA узнает свои мишени — консенсусных мотивов в нуклеотидной последовательности РНК обнаружить не удалось, а связывание белка может происходить с любым местом транскрипта.

В бактериях *S. aureus* CspA (MsaB) связывается с промоторной областью *cap*-оперона *in vitro* и активирует экспрессию генов, вовлеченных в образование капсульного полисахарида, что чрезвычайно важно для выживания бактерий в клетках хозяина [40]. CspA, совместно с транскрипционным фактором  $\sigma^B$  и белками стафилоксантинового оперона (*crtOPQMN*), также входит в сложную регуляторную сеть. Стафилоксантин, каротиноидный пигмент, действующий как антиоксидант, — это основной фактор вирулентности золотистого стафилококка, позволяющий бактерии уклоняться от иммунной защиты инфицированного организма. Делеция гена *cspA* приводит к снижению синтеза стафилоксантина и понижению уровня экспрессии фактора  $\sigma^B$ , что снижает уровень резистентности штамма к окислительному стрессу [20]. CspA связывается с мРНК  $\sigma^B$  и активирует его экспрессию, но также способен связываться с промотором оперона *crtOPQMN* [41]. Таким образом, связываясь как с РНК, так и с ДНК, CspA регулирует экспрессию генов, участвующих в различных процессах адаптации, и контролирует патогенность золотистого стафилококка.

Делеция гена *cspA* бактерии *Brucella melitensis* вызывает сильные транскриптомные изменения и приводит к аттенуации штамма как *in vitro*, так и *in vivo* [42]. В частности, делеция гена *cspA* вызывает снижение экспрессии ряда генов вирулент-

ности: генов системы секреции IV типа, входящих в *virB*-оперон, и некоторых генов жгутика [43]. Штамм, нокаутированный по гену *cspA*, обладает сниженной скоростью роста на минимальной среде, что говорит о важной роли этого гена в регуляции бактериального метаболизма.

Необычен для большинства белков холодового шока механизм работы белка CspA *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* — патогена, вызывающего бактериальный ожог у риса. Wu et al. показали [17], что CspA напрямую подавляет экспрессию двух генов, один из которых кодирует белок хемотаксиса (PXO\_RS11830), а другой — белок биосинтеза глюкогена (PXO\_RS01060), связываясь с последовательностью 5'-ССААТ-3' в области их промоторов. Делеция гена *cspA* значительно снижает вирулентность штамма, которая восстанавливается только при делеции генов, находящихся под контролем CspA [17].

У *Mycobacterium tuberculosis* CspA не исследовался так подробно, и сходство его функций и регуляции с гомологами остаются под вопросом. Тем не менее, учитывая важную роль гомологов CspA в других бактериях, есть все основания полагать, что и у *M. tuberculosis* этот белок выступает глобальным регулятором, контролирующим большое число процессов. В 1999 г. Weldingh и Andersen обнаружили CspA (Rv3648c) в супернатанте культуры *M. tuberculosis* [44]. В этой же работе было установлено, что CspA вызывает гиперчувствительность замедленного типа.

В одном из последних исследований CspA *M. tuberculosis* было показано, что этот белок менее структурирован и обладает наименьшей термостабильностью по сравнению с гомологами у других бактерий. Тем не менее белок функцио-



нально активен и способен связывать случайные последовательности олигонуклеотидов [45]. CspB *M. tuberculosis* еще менее изучен, однако интересен тот факт, что он больше похож на Y-белок эукариот, чем на бактериальные белки холодового шока [46].

CspA1 патогенной бактерии *Pseudomonas plecoglossicida*, экспрессия которого значительно возрастает в условиях холода [47], также управляет экспрессией сигма-фактора *sigX*, участвующего в процессах вирулентности при пониженной температуре, за счет связывания с промоторной областью его гена [48]. Показано, что гены *cspA1* и *sigX* необходимы для внутриклеточного выживания *P. plecoglossicida*, а их делеция ухудшает способность бактерии уходить от иммунного ответа. В регулоне *sigX* находятся гены, модулирующие подвижность бактерии и образование биопленок, делеция *sigX* приводит к значительному снижению вирулентности [48].

Вовлеченность белков холодового шока в процессы вирулентности была показана и на примере CspD3 бактерии *Ralstonia solanacearum*, возбудителя бурой гнили картофеля [49]. Продемонстрировано, что CspD3 не участвует в адаптации к холодовому стрессу и формировании биопленок, но его делеция приводит к увеличенной подвижности и существенной аттенуации штамма при заражении табака. Молекулярный механизм, по которому действует CspD3, до сих пор не определен, но было показано, что в штамме, нокаутированном по гену *cspD3*, снижается экспрессия генов, ассоциированных с вирулентностью по сравнению со штаммом дикого типа. В свою очередь, это может говорить о роли CspD3 как положительного регулятора вирулентности [49].

#### БЕЛКИ ХОЛОДОВОГО ШОКА – ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ГОМОЛОГИ Hfq?

Одна из важнейших систем адаптации бактерий к стрессам – регуляция транскрипции малыми нкРНК. Для большинства бактерий такие взаимодействия между мРНК и малыми нкРНК бактерий опосредованы белком-шапероном Hfq или недавно обнаруженным белком ProQ. Однако у некоторых бактерий (все виды микобактерий, *Helicobacter pylori*) до настоящего момента не выявлены гомологи Hfq, а также не предложены другие РНК-шапероны со схожим механизмом действия. Вопрос необходимости белка-шаперона для посттранскрипционной регуляции экспрессии с помощью нкРНК в таких бактериях остается открытым. Возможно, высокое содержание гуанина и цитозина в геномах микобактерий облегчает взаимодействие между малыми нкРНК и их мишенями, что позволяет обходиться без РНК-шаперона. Тем не менее в последнее время CspA рассматривается как возможный кандидат

на эту роль. Он экспрессируется на высоком уровне и достаточно равномерно в разных стрессовых ситуациях. Аминокислотная последовательность CspA *M. tuberculosis* на 43% идентична домену холодового шока эукариотических белков семейства Y-боксов, которые связываются с нуклеиновыми кислотами и принимают участие в регуляции транскрипции и трансляции [12].

CspA также упоминается в недавнем обзоре микобактериальных малых РНК [50], где отмечается, что этот белок хорошо подходит на роль РНК-шаперона с большим спектром мишеней благодаря своей способности дестабилизировать высокоструктурированные участки РНК, которые особенно характерны для организмов, геном которых обогащен гуанином и цитозином. Интересен факт совместной экспрессии гена *cspA* с нкРНК ncRv3648c.

В 2021 г. был проведен биоинформатический анализ геномов *Bacteroides* spp., выступающих основным компонентом микробиоты толстого кишечника млекопитающих [51]. В геномах бактероидов не были выявлены гомологи РНК-связывающих белков Hfq, ProQ и CsrA, однако обнаружен гомолог белка холодового шока WT\_1884. Гиперэкспрессия этого белка привела к изменению количеств транскриптов двух нкРНК, что позволило авторам статьи предположить, что WT\_1884 может выполнять роль РНК-шаперона [26].

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Белки холодового шока были открыты более 30 лет назад как регуляторы устойчивости бактерий к понижению температуры. Однако в настоящее время очевидно, что их функция не ограничивается приспособлением бактерий к холоду, они – одни из важнейших регуляторов внутриклеточных процессов. Активность многих белков холодового шока не зависит от понижения температуры, а связана с адаптацией к различным стрессам, включающим в том числе и защитные механизмы эукариотических клеток. CSP адаптируют бактериальную клетку к меняющимся условиям, взаимодействуя с ДНК, РНК (как матричными, так и некодирующими), а также, возможно, с другими белками. Воздействие на регуляторный аппарат бактерий может представлять не только научный, но и практический интерес, поскольку позволяет модулировать скорость роста бактерий в широком спектре условий.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-34-90149 “Аспиранты”).

## 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. Link T.M., Valentin-Hansen P., Brennana R.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 19292–19297. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0908744106>
2. Vogel J., Luisi B.F. // Nat. Rev. Microbiol. 2011. V. 9. P. 578–589. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO2615>
3. Smirnov A., Förstner K.U., Holmqvist E., Otto A., Günster R., Becher D., Reinhardt R., Vogel J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. P. 11591–11596. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609981113>
4. Smirnov A., Wang C., Drewry L.L., Vogel J. // EMBO J. 2017. V. 36. P. 1029–1045. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.201696127>
5. Ermolenko D.N., Makhatadze G.I. // Cell. Mol. Life Sci. 2002. V. 59. P. 1902–1913. <https://doi.org/10.1007/PL00012513>
6. Schindelin H., Jiang W., Inouye M., Heinemann U. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 5119–5123. <https://doi.org/10.1073/PNAS.91.11.5119>
7. Rennella E., Sára T., Juen M., Wunderlich C., Imbert L., Solyom Z., Favier A., Ayala I., Weinhäupl K., Schanda P., Konrat R., Kreutz C., Brutscher B. // Nucleic Acids Res. 2017. V. 45. P. 4255–4268. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKX044>
8. Horn G., Hofweber R., Kremer W., Kalbitzer H.R. // Cell. Mol. Life Sci. 2007. V. 64. P. 1457–1470. <https://doi.org/10.1007/S00018-007-6388-4>
9. Goldstein J., Pollitt N.S., Inouye M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 283–287. <https://doi.org/10.1073/PNAS.87.1.283>
10. Yamanaka K., Inouye M. // J. Bacteriology. 1997. V. 179. P. 5126–5130. <https://doi.org/10.1128/JB.179.16.5126-5130.1997>
11. Yu T., Keto-Timonen R., Jiang X., Virtanen J.P., Korkeala H. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 4059. <https://doi.org/10.3390/IJMS20164059>
12. Jiang W., Hou Y., Inouye M. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 196–202. <https://doi.org/10.1074/JBC.272.1.196>
13. Giangrossi M., Gualerzi C.O., Pon C.L. // Biochimie. 2001. V. 83. P. 251–259. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(01\)01233-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(01)01233-0)
14. Jones P.G., Krahl R., Tafuri S.R., Wolffe A.P. // J. Bacteriol. 1992. V. 174. P. 5798–5802. <https://doi.org/10.1128/JB.174.18.5798-5802.1992>
15. Bae W., Xia B., Inouye M., Severinov K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 7784–7789. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.14.7784>
16. Bae W., Jones P.G., Inouye M. // J. Bacteriology. 1997. V. 179. P. 7081–7088. <https://doi.org/10.1128/JB.179.22.7081-7088.1997>
17. Wu L., Ma L., Li X., Huang Z., Gao X. // Mol. Plant Pathol. 2019. V. 20. P. 382–391. <https://doi.org/10.1111/MPP.12763>
18. la Teana A., Brandi A., Falconi M., Spurio R., Pon C.L., Gualerzi C.O. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 10907–10911. <https://doi.org/10.1073/PNAS.88.23.10907>
19. Hwang J., Severinov K., Phadtare S., Inouye M. // Gen. Cells. 2003. V. 8. P. 801–810. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2003.00675.x>
20. Caballero C.J., Menendez-Gil P., Catalan-Moreno A., Vergara-Irigaray M., García B., Segura V., Irurzun N., Villanueva M., de Los Mozos I.R., Solano C., Lasa I., Toledo-Arana A. // Nucleic Acids Res. 2018. V. 46. P. 1345. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKX1284>
21. Zhang Y., Burkhardt D.H., Rouskin S., Li G.W., Weissman J.S., Gross C.A. // Mol. Cell. 2018. V. 70. P. 274.e7–286.e7. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2018.02.035>
22. Choi J., Salvail H., Groisman E.A. // Nucleic Acids Res. 2021. V. 49. P. 11614–11628. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB992>
23. Hofweber R., Horn G., Langmann T., Balbach J., Kremer W., Schmitz G., Kalbitzer H.R. // FEBS J. 2005. V. 272. P. 4691–4702. <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2005.04885.X>
24. Faßhauer P., Busche T., Kalinowski J., Mädler U., Poehlein A., Daniel R., Stülke J. // Microorganisms. 2021. V. 9. P. 1434. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071434>
25. Michaux C., Holmqvist E., Vasicek E., Sharan M., Barquist L., Westermann A.J., Gunn J.S., Vogel J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 114. P. 6824–6829. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620772114>
26. Prezda G., Ryan D., Mädler G., Reichardt S., Barquist L., Westermann A.J. // Mol. Microbiol. 2022. V. 117. P. 67–85. <https://doi.org/10.1111/MMI.14793>
27. Płociński P., Macios M., Houghton J., Niemiec E., Płocińska R., Brzostek A., Słomka M., Dziadek J., Young D., Dziembowski A. // Nucl. Acids Res. 2019. V. 47. P. 5892–5905. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ251>
28. Feng Y., Huang H., Liao J., Cohen S.N. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 31651–31656. <https://doi.org/10.1074/JBC.M102855200>
29. Loepfe C., Raimann E., Stephan R., Tasara T. // Food-borne Pathogens Dis. 2010. V. 7. P. 775–783. <https://doi.org/10.1089/FPD.2009.0458>
30. Schmid B., Klumpp J., Raimann E., Loessner M.J., Stephan R., Tasara T. // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. P. 1621–1627. <https://doi.org/10.1128/AEM.02154-08>
31. Eshwar A.K., Guldimann C., Oevermann A., Tasara T. // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2017. V. 7. P. 453. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00453>

32. *Portnoy D.A., Suzanne Jacks P., Hinrichs D.J.* // J. Exp. Med. 1988. V. 167. P. 1459–1471.  
<https://doi.org/10.1084/JEM.167.4.1459>
33. *Slepkov E.R., Bitar A.P., Marquis H.* // Biochem. J. 2010. V. 432. P. 557–566.  
<https://doi.org/10.1042/BJ20100557>
34. *Glomski I.J., Gedde M.M., Tsang A.W., Swanson J.A., Portnoy D.A.* // J. Cell. Biol. 2002. V. 156. P. 1029–1038.  
<https://doi.org/10.1083/JCB.200201081>
35. *Kocks C., Gouin E., Tabouret M., Berche P., Ohayon H., Cossart P.* // Cell. 1992. V. 68. P. 521–531.  
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90188-I](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90188-I)
36. *Welch M.D., Iwamatsu A., Mitchison T.J.* // Nature. 1997. V. 385. P. 265–269.  
<https://doi.org/10.1038/385265a0>
37. *Travier L., Guadagnini S., Gouin E., Dufour A., Chenal-Francisque V., Cossart P., Olivo-Marin J.C., Ghigo J.M., Disson O., Lecuit M.* // PLoS Pathog. 2013. V. 9. P. e1003131.  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1003131>
38. *Crawford R.W., Rosales-Reyes R., Ramírez-Aguilar M.D.L.L., Chapa-Azuela O., Alpuche-Aranda C., Gunn J.S.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 4353–4358.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1000862107>
39. *Ray S., da Costa R., Das M., Nandi D.* // J. Biol. Chem. 2019. V. 294. P. 9084–9099.  
<https://doi.org/10.1074/JBC.RA119.008209>
40. *Batte J.L., Samanta D., Elasri M.O.* // Microbiology (Reading). 2016. V. 162. P. 575–589.  
<https://doi.org/10.1099/MIC.0.000243>
41. *Pandey S., Sahukhal G.S., Elasri M.O.* // J. Bacteriol. 2019. V. 201.  
<https://doi.org/10.1128/JB.00417-19>
42. *Wang Z., Wang S., Wu Q.* // FEMS Microbiol. Lett. 2014. V. 354. P. 27–36.  
<https://doi.org/10.1111/1574-6968.12430>
43. *Wang Z., Liu W., Wu T., Bie P., Wu Q.* // Sci. China Life Sci. 2016. V. 59. P. 417–424.  
<https://doi.org/10.1007/S11427-015-4981-6>
44. *Weldingh K., Andersen P.* // FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1999. V. 23. P. 159–164.  
<https://doi.org/10.1111/J.1574-695X.1999.TB01235.X>
45. *D'Auria G., Esposito C., Falcigno L., Calvanese L., Iaccarino E., Ruggiero A., Pedone C., Pedone E., Berisio R.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010. V. 402. P. 693–698.  
<https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2010.10.086>
46. *Kumar A., Alam A., Tripathi D., Rani M., Khatoon H., Pandey S., Ehtesham N.Z., Hasnain S.E.* // Semin. Cell Dev. Biol. 2018. V. 84. P. 147–157.  
<https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2018.01.003>
47. *Huang L., Liu W., Jiang Q., Zuo Y., Su Y., Zhao L., Qin Y., Yan Q.* // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2018. V. 8. P. 207.  
<https://doi.org/10.3389/FCIMB.2018.00207/BIBTEX>
48. *Huang L., Zhao L., Qi W., Xu X., Zhang J., Zhang J., Yan Q.* // Aquaculture. 2020. V. 518. P. 734861.  
<https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2019.734861>
49. *Liu Y., Tan X., Cheng H., Gong J., Zhang Y., Wang D., Ding W.* // Microb. Pathog. 2020. V. 142. P. 104091.  
<https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2020.104091>
50. *Schwenk S., Arnvig K.B.* // Pathogens Dis. 2018. V. 76. P. 35.  
<https://doi.org/10.1093/FEMSPD/FTY035>
51. *Wexler A.G., Goodman A.L.* // Nat. Microbiol. 2017. V. 2. P. 1–11.  
<https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.26>

## Bacterial Cold Shock Proteins as a Factor of Adaptation to Stresses

A. S. Grigorov\*, # and T. L. Azhikina\*

#Phone: +7 (495) 330-69-92; e-mail: artgrigorov@gmail.com

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

Bacteria have evolved a number of mechanisms to cope with stresses and adapt to changing environmental conditions. A family of bacterial proteins containing a functional cold shock domain are highly conserved nucleic acid-binding proteins that modulate transcription and post-transcriptional events in bacteria. For many bacteria, these proteins have been shown to regulate the expression of various genes involved in virulence and resistance of bacteria to stresses. The review discusses the new data on the mechanisms of action and the roles of cold shock proteins in the regulation of expression in intracellular bacterial pathogens.

*Keywords: bacteria, cold shock proteins, virulence, gene expression regulation*



УДК 620.3

## ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КАТИОНОВ МЕТАЛЛОВ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ПРОТИВОМИКРОБНЫХ КОМПЛЕКСОВ

© 2023 г. А. В. Кадомцева\*, #, Г. М. Мочалов\*\*, И. В. Жданович\*, М. С. Пискунова\*

\*ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России,  
Россия, 603005 Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1\*\*ФГБОУ ВО «Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева»,  
Россия, 603950 Нижний Новгород, ул. Минина, 24

Поступила в редакцию 30.07.2022 г.

После доработки 10.08.2022 г.

Принята к публикации 23.08.2022 г.

Известно, что антибактериальные препараты при длительном применении вызывают антибиотикорезистентность у бактерий. Быстрое формирование устойчивости микроорганизмов к современным антибактериальным препаратам требует поиска новых методов терапии. Альтернативным направлением выступает использование наночастиц металлов и их оксидов в качестве основы для создания противомикробных средств нового поколения, поэтому представляется перспективным изучение методов синтеза наночастиц металлов, их физико-химических и фармакологических свойств. В обзоре рассмотрены механизмы формирования антибиотикорезистентности в биопленке и возможные пути их преодоления для наноразмерных частиц металлов, описаны синтез и механизм действия наночастиц, содержащих катионы серебра, меди и цинка, приведены результаты исследований по оценке влияния наночастиц металлов на чувствительность к антибиотикам у грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также грибов в сравнении с действием известных лекарственных форм. Катионы  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  обладают выраженным антибактериальным действием против *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*. Катионы  $\text{Ag}^+$  продемонстрировали наибольшую активность в отношении *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, а также *Candida albicans*.

*Ключевые слова:* наночастицы металлов, катионы меди, цинка, серебра, антибиотикорезистентность, биопленка, противомикробные препараты

DOI: 10.31857/S0132342323010128, EDN: GGJKEO

### СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	32
БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ.....	33
<i>Катионы серебра</i> .....	33
<i>Катионы цинка</i> .....	33
<i>Катионы меди</i> .....	34
СИНТЕЗ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ МЕТАЛЛОВ.....	34
<i>Соединения серебра</i> .....	34
<i>Соединения цинка</i> .....	35
<i>Соединения меди</i> .....	35
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	38
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	39

### ВВЕДЕНИЕ

Важная проблема терапии инфекционных заболеваний — устойчивость микроорганизмов к антибиотикам. Быстрое формирование устойчивости микроорганизмов к современным антибактериальным препаратам требует поиска новых методов терапии. Один из способов решения проблемы антибиотикорезистентности — разработка противомикробных средств нового поколения, содержащих наночастицы металлов. Благодаря особым свойствам наночастиц, таким как повышенное поглощение лекарственного средства и высокое отношение площади поверхности к объему, а также выявленной антимикробной активности (включая грамположительные, грамотрицательные бактерии и грибы) [1] актуально использование катионов металлов со сравнительно низкой токсичностью при разработке противомикробных комплексов. Представляется перспективным изучение методов синтеза наночастиц метал-

# Автор для связи: (эл. почта: kadamtseva@pimunn.ru).

лов, их физико-химических и фармакологических свойств.

Наночастицы металлов начинают антибактериальное действие с цитоплазматических мембран бактерий. Катионы металлов притягиваются к отрицательно заряженным клеточным мембранам бактерий. Таким образом, прилипшие ионы нарушают баланс заряда и начинают взаимодействовать с фосфолипидным бислоем на поверхности клеточных мембран, что вызывает изменение проницаемости бактериальных мембран. Происходит высвобождение ионов металлов, а некоторые наночастицы металлов проникают в бактерии, вследствие чего происходят повреждения клеточных мембран – как структурные, так и функциональные [2].

Аналитический обзор современных литературных данных актуален при разработке методов синтеза новых биологически активных соединений катионов различных металлов и изучении их физико-химических и фармакологических свойств. В обзоре описаны синтез и механизм действия наночастиц, содержащих катионы серебра, меди и цинка, приведены результаты исследований по оценке влияния наночастиц металлов на грамположительные и грамотрицательные бактерии, а также грибы в сравнении с действием известных лекарственных форм.

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ

Синтезированные лекарственные субстанции из биометаллов, в зависимости от способа получения, могут быть не только высокоэффективными, но и высокотоксичными. Широкий круг неизученных свойств обуславливает необходимость исследования токсикологических и терапевтических параметров этих соединений. Следует отметить, что биологическая активность наночастиц металлов зависит от физико-химических свойств, таких как форма, размер и др. Для разработки противомикробных комплексов наиболее перспективны катионы серебра, цинка и меди.

### Катионы серебра

Катионы серебра наиболее изучены, обладают выраженными антибактериальными свойствами при низкой токсичности и отсутствием отрицательного влияния на индигенную микрофлору. Основная сфера применения препаратов – лечение заболеваний, вызываемых условно-патогенной микрофлорой (маститы, желудочно-кишечные и гинекологические болезни).

Петрицкая с соавт. [3] установили, что коллоидные растворы серебра (50 и 100 мг/л) не влияют на рост микроорганизмов (штаммы *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, а также полученные из клинического материала штаммы *Candida albicans*), а растворы сравнения, содержащие нитраты других металлов (Co, Zn, Na), проявляют выраженный антибактериальный эффект.

Segura et al. [4] синтезировали комплексные соединения серебра  $[\{Ag(phen)(\mu-tu)\}_2](NO_3)_2$ ,  $[\{Ag(phen)(\mu-tu)\}_2](CF_3SO_3)_2$ ,  $[\{Ag(bpy)(\mu-tu)\}_2](NO_3)_2$  (phen – 1,10-фенантролин, bpy – 2,2'-бипиридин, tu – тиомочевина), которые проявили активность в отношении бактерий (*Mycobacterium tuberculosis*, *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), лейшманий (*Leishmania amazonensis*) и грибов (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*). Авторами отмечается, что путем варьирования количества и типов лигандов, присутствующих в координационной сфере, можно изменять физико-химические и биологические свойства полученных соединений.

Ronconi et al. [5] отмечают, что биологические свойства соединений могут быть усилены координацией с металлическим центром.

### Катионы цинка

Чекнёвым с соавт. при нанесении на диск катионов цинка с антибиотиком проведена оценка чувствительности бактерий *S. aureus* к стандартному набору антибиотиков [6]. На чашки Петри с питательным агаром газоном засеивали суспензию бактерий *S. aureus*, содержащую  $10^8$  КОЕ/мл. Далее на поверхность газона по стандартному шаблону помещали диски с антибиотиками. Катионы  $Zn^{2+}$  применяли в виде  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  с концентрацией 0.15 М в растворе NaCl. После предварительной обработки газона катионами  $Zn^{2+}$  защита бактерий от последующего воздействия антибиотиков выявлена в 27.3–45.5% наблюдений. Таким образом, можно сделать вывод, что обработка газона катионами  $Zn^{2+}$  оказывает выраженное протективное действие на бактерии *S. aureus*, которые становятся более устойчивыми к действию антибиотиков, чем в отсутствие катиона  $Zn^{2+}$ .

Одна из перспективных сфер применения катионов металлов – стоматологические препараты. Проведены микробиологические исследования воздействия на микрофлору зубного налета водных растворов наночастиц (10–100 нм) железа, олова, цинка, серебра и меди ( $Fe_3O_4$ , SnO, ZnO, Ag, Cu). Исследования показали, что химический состав частиц дисперсной фазы напрямую

влияет на антибактериальные свойства. Так, наиболее эффективными оказались дисперсные системы, содержащие оксид цинка с исходной концентрацией 7.03 мг/л, медь (2.07 мг/л), серебро (2.39 мг/л), а также  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (2.11 мг/л) [7].

### Катионы меди

В настоящее время во всех сферах заметно увеличился спрос на оксид одновалентной меди, применение которой перспективно благодаря таким характеристикам, как ширина запрещенной зоны (разница энергии электрона), которая обеспечивает поглощение большей части солнечного спектра, а также низкая себестоимость, и главное, отсутствие токсичности. Однако следует отметить, что не только физико-химические свойства соединений меди зависят от способа получения, но и активность. На сегодняшний день существует большое количество методов, позволяющих получать наноразмерные порошки металлов.

Из литературных данных известно, что наиболее перспективными считаются электрохимические методы получения высокодисперсных порошков (нанопорошков оксидов и гидроксидов меди из водных растворов щелочей) [8] за счет возможности получения очень чистых порошков и управления их структурой путем варьирования электрических параметров процесса. Преимущество заключается в том, что использование постоянного и переменного тока позволяет существенно интенсифицировать процесс.

В работе Коробочкина с соавт. [9] приведены экспериментальные данные разрушения металлов в щелочных растворах. Опубликованные материалы содержат опытные данные по скорости растворения металлов в зависимости от различных факторов или только на основе снятия циклических поляризационных кривых приводятся возможные механизмы образования тех или иных продуктов электролиза.

Абраменко [10] в зависимости от времени электролиза, плотности тока и концентрации катиона определил скорость разрушения (растворения) меди в условиях электролиза. Использовали бездиафрагменную ячейку, все исследования проведены в водных растворах щелочей. Рабочим электродом была предварительно подготовленная медная фольга (прошла шлифование, обезжиривание, промывку и сушку). Сделан вывод о том, что скорость окисления меди определяется количеством прошедшего электричества и не зависит от плотности тока.

Доказано, что биметаллические наночастицы медь–серебро обладают антибактериальной активностью и могут применяться для придания бактерицидных свойств полимерным материалам [11].

Чекнёв с соавт. [12] изучили антибактериальное действие катионов  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  в миллимолярных концентрациях хлоридов и сульфатов в культурах *S. aureus* и *P. aeruginosa*. При концентрации металлов 50–500 мМ ингибирующее действие  $\text{ZnSO}_4$  в отношении бактерий *S. aureus* в 1.3–1.6 раза ( $p < 0.001$ – $0.050$ ) превосходило эффекты  $\text{CuSO}_4$ . При увеличении концентрации катионов металлов до 100 и 500 мМ действие  $\text{ZnCl}_2$  в культуре *S. aureus* в 1.2–1.6 раза ( $p < 0.02$ ) превосходило эффекты  $\text{CuCl}_2$ . В культуре *P. aeruginosa* антибактериальное действие  $\text{CuSO}_4$  было сопоставимо с эффектами  $\text{ZnSO}_4$ . При концентрации металла 500 мМ действие  $\text{CuCl}_2$  на клетки *P. aeruginosa* было в 1.2 раза ( $p < 0.05$ ) выраженным, чем эффекты  $\text{ZnCl}_2$ . Сделан вывод о том, что в миллимолярных концентрациях катионы  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  обладают выраженным антибактериальным действием в культурах *S. aureus* и *P. aeruginosa*. Таким образом, в присутствии катионов цинка проявляется бактериостатическое действие, а катионов меди — бактерицидное. Задержка роста бактерии *S. aureus* при действии катионов цинка более значительна, чем у *P. aeruginosa*, проявляющего более высокую, чем *S. aureus*, толерантность к меди и цинку.

### СИНТЕЗ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ МЕТАЛЛОВ

В настоящее время актуальны синтез и исследование комплексных соединений переходных металлов с биологически активными лигандами. Разработка условий синтеза новых высокоэффективных биологически активных соединений — одна из задач не только современной медицины, но и сельского хозяйства, а также других отраслей.

Учеными разработаны надежные физико-химические экспериментальные методы синтеза металлических наночастиц с заданной морфологией, размерами и свойствами.

### Соединения серебра

Блинова с соавт. [13] изучили влияние параметров синтеза препарата на основе наночастиц серебра, стабилизированных бромидом дидецилдиметиламмония, который проводили постадийно. Для предотвращения процессов агрегации наночастиц Ag и интенсификации перемешивания

использовали обработку реакционной системы ультразвуком. Были выявлены параметры (объемная скорость подачи, массовая доля, массовое/мольное соотношение), оказывающие наиболее значимое влияние на процесс формирования наночастиц серебра в водных растворах четвертичного аммониевого соединения. В качестве восстановителя использовали боргидрид натрия ( $\text{NaBH}_4$ ).

Ranoszek-Soliwoda et al. [14] разработали методику синтеза (реакция восстановления) монодисперсных частиц серебра с растительным экстрактом из листьев *Mimusops elengi* (AgNP). В качестве источников полифенолов были выбраны экстракт какао-бобов и виноградных косточек. Показана антибактериальную активность синтезированных соединений серебра в отношении полирезистентных изолятов, таких как *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus* и *S. aureus*.

Биоактивные соединения, которые содержатся в растительном экстракте и участвуют в восстановлении серебра, действуют как блокирующие агенты для AgNP и тем самым оказывают бактериостатическое действие на грамположительные и грамотрицательные патогенные бактерии [15].

#### Соединения цинка

Ёрмамадова с соавт. [16] синтезировали координационные соединения цинка с водным раствором мерказолила. Подобраны оптимальные условия для синтеза соединений с заданными физико-химическими, а главное, биологическими свойствами.

В полученных координационных соединениях цинка активными компонентами выступают комплексообразователи и координированные лиганды (катионы металлов), например  $[\text{ZnHL}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ ,  $[\text{Zn}(\text{HL})\text{OH}]^+$ , где L – мерказолил. В статье приведен качественный состав соединений цинка, который установлен методами элементного анализа, оксидметрии и ИК-спектроскопии.

Довнар с соавт. [17] получили наночастицы серебра и оксида цинка методом лазерной абляции в жидкости. В работе использованы патогенные штаммы, обладающие множественной антибактериальной резистентностью. Минимальные ингибирующие концентрации составили 7.81–31.25 и 125–500 мкг/мл, минимальные бактерицидные – 31.25–62.50 и 250–1000 мкг/мл для наночастиц серебра и оксида цинка соответственно.

Ачиловой [18] синтезированы комплексные соединения цинка на основе глутаминовой кислоты (Глут-2Н), которые различались не только

формой кристаллов, но и физико-химическими свойствами, например, были получены растворимая и нерастворимая формы соединения  $\text{Zn}[\text{Cu}(\text{Глут-2Н})_2]$ .

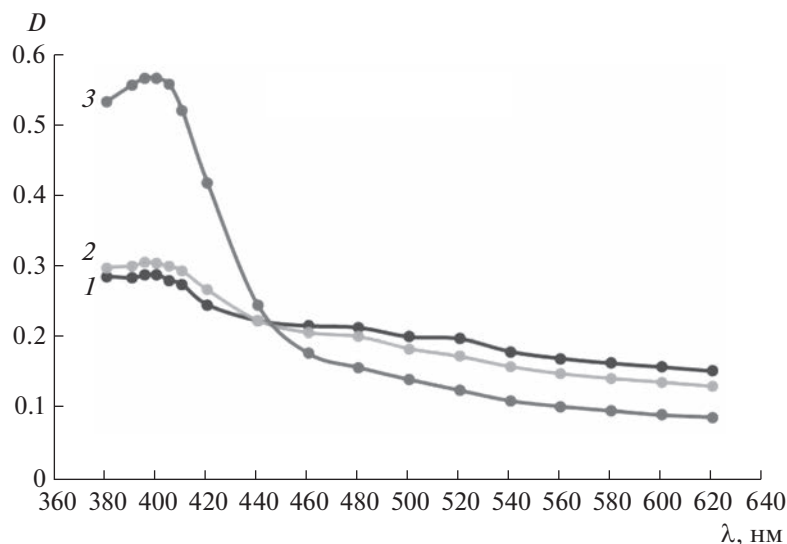
Объектами исследования Горбачевич с соавт. [19] выступали производные 1,2-дигидроксibenзола и комплексные соединения цинка(II). Авторы создали перевязочные материалы на основе комплексов цинка(II) с производными дигидроксibenзолов, которые обладают антибактериальной активностью, противогрибковым действием широкого спектра, а также ускоряют заживление ран. Установлено, что образование в водно-этанольном растворе комплексов производных 1,2-дигидроксibenзола с ионами цинка(II) происходит в соотношении  $\text{Zn}(\text{II})/\text{лиганд}$  1 : 2. В статье приведена информация о физико-химических свойствах комплексных соединений: элементный состав, геометрия образуемых координационных полиэдров, константы устойчивости (общие и ступенчатые). Также была выявлена противогрибковая активность комплексных соединений цинка(II), разработана технология нанесения их на бинты и на модели полнослойной инфицированной раны, изучена ранозаживляющая способность перевязочного материала.

#### Соединения меди

Кудрявцева и Буринская [20] в реакциях восстановления аскорбиновой кислоты в растворе получили биметаллические наночастицы медь/серебро (Cu/Ag) с использованием  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{NaOH}$  и поливинилового спирта  $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_x$ . Также за счет разности окислительных потенциалов катионов серебра и меди были получены наночастицы без добавления восстановителя. Способ приготовления биометаллических наночастиц заключался в следующем: в 40 мл 1%-ного раствора поливинилового спирта готовили раствор  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (20–500 мкМ), далее нагревали до кипения на водяной бане, добавляли 40 мл раствора  $\text{AgNO}_3$  в 1%-ном  $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_x$  (30–500 мкМ). После закипания раствора вводили 20 мл раствора аскорбиновой кислоты. Для подщелачивания в колбу по каплям добавляли раствор  $\text{NaOH}$ . В работе приведены ИК-спектры поглощения коллоидных растворов. Установлено, что pH среды оказывает влияние на получение наночастиц – при pH 10.0–11.0 наблюдается наибольшая скорость реакции.

Оптическая плотность коллоидных растворов медь-серебро в реакциях восстановления аскорбиновой кислотой при концентрациях сульфата меди и нитрата серебра, равных 20 и 30 мкМ соот-





**Рис. 1.** Оптическая плотность коллоидных растворов сульфата меди и нитрата серебра (медь–серебро), восстановленных аскорбиновой кислотой при соотношениях соли металлов : восстановитель, равных 1 : 30 (1), 1 : 50 (2) и 1 : 100 (3) [20].

ветственно, приведена на рис. 1 [20] (соотношение соль : восстановитель 1 : 30; 1 : 50; 1 : 100). В диапазоне длин волн 395–400 наблюдается наибольшая экстинкция, что свидетельствует о наличии в растворе биметаллических наночастиц медь(ядро)–серебро(оболочка)  $Cu_{core} - Ag_{shell}$ . Самое высокое значение экстинкции показано при соотношении металл : восстановитель 1 : 100.

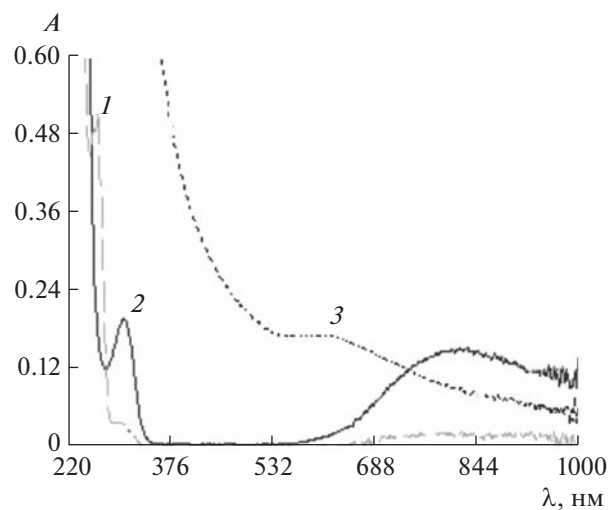
Ерохина с соавт. [21] разработали химический способ получения биметаллических наночастиц медь–серебро методом восстановления в растворе желатина тетрагидроборатом натрия (среда щелочная). Установлено антибактериальное воздействие биметаллических наночастиц на грамположительные бактерии *S. aureus* и культуру дрожжеподобного гриба *C. albicans*.

Харитоновой с соавт. [22] разработаны новые подходы, не только теоретические, но и экспериментальные, необходимые для изучения комплексообразования меди(II) с органическими соединениями (доноры – атомы кислорода и азота).

Уринов с соавт. [23] провели комплексообразование олигомера (лиганда) с медью в водной среде: к водному раствору олигомера на основе морфолина с эпихлоргидрином объемом 2.5 мл ( $10^{-3}$ – $10^{-5}$  М) добавляли 2.5 мл раствора нитрата меди ( $10^{-3}$ – $10^{-5}$  М) при постоянной температуре и перемешивании, анализировали спектры поглощения. Анализ зависимости оптической плотности при постоянной концентрации нитрата меди от длины волны показал, что увеличение опти-

ческой плотности происходит при увеличении концентрации олигомера, максимум смещается в длинноволновую область (рис. 2).

На основе результатов ИК-спектроскопии авторами предложена предполагаемая структура синтезированного комплексного соединения меди (схема 1 [23]).



**Рис. 2.** Зависимость оптической плотности (A) от длины волны ( $\lambda$ ) олигомера (лиганда) с медью в водной среде: 1 – олигомер на основе морфолина с эпихлоргидрином, 2 – нитрат меди, 3 – смесь олигомера с нитратом меди(II) [23].

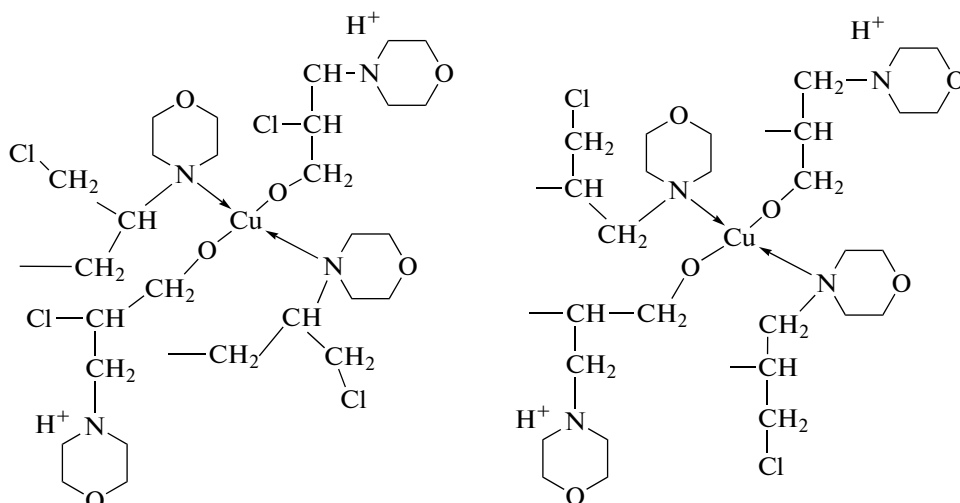
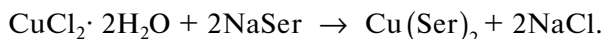


Схема 1. Структура комплекса на основе олигомера морфолина и эпихлоргидрина с нитратом меди [23].

Разработанный метод получения олигомерных соединений на основе морфолина с нитратом меди может использоваться в промышленности для получения антибактериального препарата для обработки каракулевых кожевенных изделий.

Пулатова с соавт. [24] синтезировали комплексное соединение меди(II) с серином:



В раствор аминокислоты приливали раствор гидроксида натрия (среда нейтральная, pH 7.0). Затем в образовавшийся прозрачный раствор добавляли раствор металла (0.01 г/моль  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Получившийся коллоидный раствор зелено-бирюзового цвета ставили на магнитную мешалку. Вы-

павший осадок голубого цвета помещали в воронку Бюхнера и фильтровали, далее промыли спиртом и оставляли на воздухе. Выход соединения составил 70%, т. пл.  $168^\circ\text{C}$ ,  $M_r$  307.5 г/моль.

Далее была проведена качественная и количественная характеристика соединения: зарегистрированы ИК-спектры ( $\nu\text{NH}_2 = 3344.4$ ;  $\delta\text{NH}_2 = 1656.7, 1687.9$ ;  $\nu\text{CO} = 1720$ ;  $\nu\text{OH}$  связ. =  $3283.3$ ;  $\nu\text{NH}_2^+ = 2224.4, 2348.1$ ;  $\nu\text{CH}_2 = 2923.2870$ ;  $\delta\text{CH}_2 = 1402-1408$ ;  $\nu\text{CH} = 2900$ ;  $\delta\text{CH} = 1338-1340$ ;  $\nu\text{COO}^- = 1554.1536$ ), проведен химический анализ, азот определяли по методу Кьельдаля. Предполагаемая структура полученного соединения представлена на схеме 2 [24].

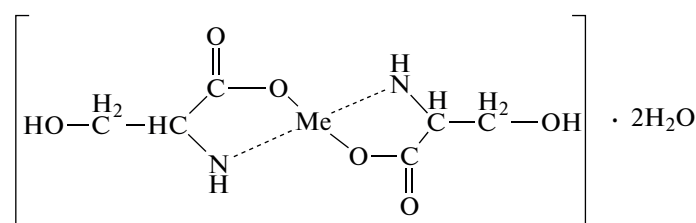
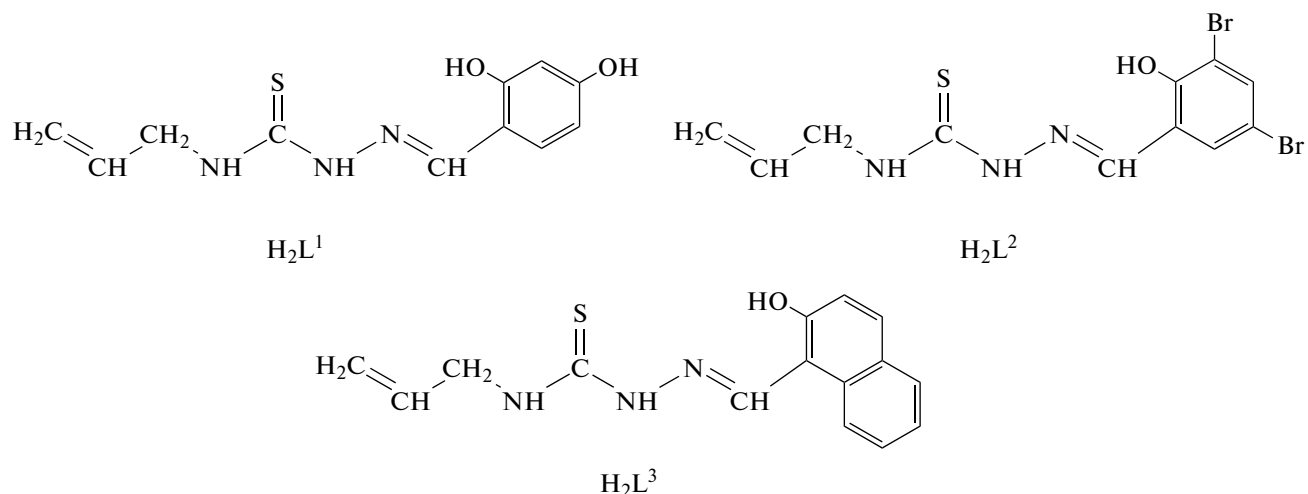


Схема 2. Предполагаемая структура комплексного соединения меди с серином [24].

Определены [25] оптимальные условия синтеза координационных соединений  $\text{Cu}(\text{II})$  с 4-аллилтиосемикарбазонами 2,4-дигидроксibenзальдегида ( $\text{H}_2\text{L}^1$ ), 3,5-дибромсалицилового альдегида ( $\text{H}_2\text{L}^2$ ) и 2-гидрокси-1-нафтальдегида ( $\text{H}_2\text{L}^3$ ) (рис. 3), содержащих в своем составе амины, а также установлен состав, изучены физико-химические и биологические свойства. Выявлена высокая противомикробная активность полученных соедине-

ний меди в отношении *S. aureus* и *E. coli*, а также установлено их противогрибковое действие.

Следует отметить, что аминсодержащие координационные соединения  $\text{Cu}(\text{II})$ , которые проявляют более высокую активность, чем комплексы без аминов и исходные тиосемикарбазоны, были синтезированы в несколько этапов. Для определения способа координации лиганда с центральными атомами был проведен сравнительный анализ ИК-спектров тиосемикарбазонов замещен-



**Рис. 3.** Строение 4-аллилтиосемикарбазонов 2,4-дигидроксибензальдегида (H<sub>2</sub>L<sup>1</sup>), 3,5-дибромсалицилового альдегида (H<sub>2</sub>L<sup>2</sup>) и 2-гидрокси-1-нафтальдегида (H<sub>2</sub>L<sup>3</sup>) [25].

ных салицилового альдегида и синтезированных комплексов.

Комплекс Cu(II) с 4-аллилтиосемикарбазоном 3,5-дибромсалицилового альдегида и пиридином был наиболее активен в отношении грамположительных бактерий (*S. aureus*) и грибов (*C. albicans*), введение метильной группы в пиридиновый фрагмент снижало активность синтезированных комплексов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время при разработке антимикробных комплексов актуально использование соединений биометаллов, таких как цинк, медь, с аминокислотами. Их взаимодействие приводит к изменению биохимических свойств соединения, обеспечивает противомикробную активность полученных комплексов. Ионы металлов, входящих в состав природных ферментов, выступают в качестве поляризующих факторов. Таким образом, синтезируют соединения, которые моделируют и имитируют активные центры ферментов и ведут себя как активированные и модифицированные аминокислоты.

Наиболее перспективно использование катионов переходных металлов, таких как Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> и Cu<sup>2+</sup>, которые способны к образованию донорно-акцепторных связей за счет переполненных *d*-орбиталей. В свою очередь, устойчивые координационные соединения с ионами металлов могут образовывать именно биолиганды с активными донорными атомами (атомами кислорода, азота,

серы и др.), такие как аминокислоты, пептиды, белки.

Ранее было доказано, что координационно связанный биометалл обладает меньшей токсичностью, чем его неорганическая соль. Сочетание микроэлементов и биоактивного органического вещества приводит к синергизму действия.

Установлена зависимость антимикробного действия различных катионов металлов от окислительной способности: антибактериальная эффективность увеличивается с ростом окислительно-восстановительного потенциала. Отсутствие бактерицидной активности показали катионы Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> и Co<sup>2+</sup>, умеренным действием обладают катионы Zn<sup>2+</sup>, а наиболее выраженным бактерицидным действием обладают катионы Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup> и Fe<sup>2+</sup>.

Таким образом, ингибирующее действие катионов тяжелых металлов (двухвалентных) с большой вероятностью включает бактериостатический и бактерицидный компоненты, проявление активности которых определяется первичными механизмами реализации токсических свойств катионов.

В настоящее время наночастицы металлов применяются при синтезе лекарственных форм, обладающих биоцидным, противомикробным действием широкого спектра по отношению к патогенным микроорганизмам. Эффективное применение катионов металлов обусловлено прежде всего механизмом взаимодействия с клетками организма (способностью осажать белки и другие органические соединения). Также к преимуще-

ствам применения наночастиц металлов можно отнести адресную доставку, скорость высвобождения лекарства, снижение токсичности, биосовместимость, повышение эффективности лечения.

Противомикробное действие катионов металлов зависит от природы солей и состава среды. Выраженный антибактериальный эффект демонстрируют катионы  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  в отношении *S. aureus* и *P. aeruginosa*, а также катионы  $\text{Ag}^+$  в отношении *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* и условно-патогенного гриба *C. albicans*.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке программы “Приоритет-2030”.

#### 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. Turner R.J. // Microb. Biotechnol. 2017. V. 10. P. 1062–1065. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12785>
2. Palza H. // Int. J. Mol. Sci. 2015. V. 19. P. 2099–2116. <https://doi.org/10.3390/ijms16012099>
3. Петрицкая Е.Н., Рогаткин Д.А., Русанова Е.В. // Альманах клин. мед. 2016. Т. 44. С. 221–226. <https://doi.org/10.18786/2072-0505-2016-44-2-221-226>
4. Segura D.F., Netto A.V.G., Frem R.C.G., Mauro A.E., da Silva P.B., Fernandes J.A., Paz F.A.A., Dias A.L.T., Silva N.C., de Almeida E.T., Marques M.J., de Almeida L., Alves K.F., Pavan F.R., de Souza P.C., de Barros H.B., Leite C.Q.F. // Polyhedron. 2014. V. 79. P. 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2014.05.004>
5. Ronconi L., Sadler P.J. // Coord. Chem. Rev. 2007. V. 251. P. 1633–1648. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.11.017>
6. Чекнёв С.Б., Вострова Е.И., Сарычева М.А., Востров А.В. // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. 2019. № 6. С. 5–12. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-5-12>
7. Леонтьев В.К., Погорельский И.П., Фролов Г.А., Карасенков Я.Н., Гусев А.А., Латута Н.В., Бороздкин Л.Л., Стефанцова Д.С. // Рос. нанотехнологии. 2018. Т. 13. № 3-4. С. 88–91.
8. Демьян В.В., Демьян Е.М., Беспалова Ж.И., Фесенко Л.Н. // Вестник Донского гос. аграр. ун-та. 2015. Т. 16. № 2-2. С. 130–138.
9. Коробочкин В.В., Усольцева Н.В., Горлушко Д.А., Балмашинов М.А. // Изв. Томского политехнич. ун-та. 2010. Т. 317. № 3. С. 13–16.
10. Абраменко Ю.А. // Молодой исследователь Дона. 2018. № 4 (13). С. 2–6.
11. Буринская А.А., Газизуллина А.Р., Кудрявцева Е.В. // Известия высш. учеб. завед. Технол. легк. промышл. 2020. Т. 47. № 1. С. 83–88. [https://doi.org/10.46418/0021-3489\\_2020\\_47\\_1\\_15](https://doi.org/10.46418/0021-3489_2020_47_1_15)
12. Чекнёв С.Б., Вострова Е.И., Апрессова М.А., Писковская Л.С., Востров А.В. // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. 2015. № 2. С. 9–17.
13. Блинова А.А., Блинов А.В., Серов А.В., Храмов А.Г. // Вестник Северо-Кавказского федер. ун-та. 2014. № 6 (45). С. 9–14.
14. Ranošek-Soliwoda K., Tomaszewska E., Małek K., Celichowski G., Orłowski P., Krzyżowska M., Grobelny J. // Colloids Surf. B Biointerfaces. 2019. V. 177. P. 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.01.037>
15. Ahmed M.J., Murtaza G., Mehmood A., Bhatti T.M. // Mater. Lett. 2015. V. 153. P. 10–13. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2015.03.143>
16. Ёрмамадова С.Г., Камолова И.У., Раджабов У.Р. // Наука и инновация. 2018. Т. 1. № 1. С. 133–140.
17. Довнар Р.И., Смотрин С.М., Ануфрик С.С., Соколова Т.Н., Анучин С.Н., Иоскевич Н.Н. // Журн. Гродненского гос. мед. ун-та. 2022. Т. 20. С. 98–107. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2022-20-1-98-107>
18. Ачилова Д.А. // Forcipe. 2020. Т. 3. № 3. С. 432–433. <https://cyberleninka.ru/article/n/sintez-i-issledovanie-geometricheski-izomernyh-koordinatsionnyh-soedineniy-medi-i-tsinka-s-glyutaminovoy-kislotoy>
19. Горбачевич Г.И., Стахевич С.И., Ковальчук-Рабчинская Т.В. // Свиридовские чтения: сб. ст. Вып. 14. Минск: Изд. центр БГУ, 2018. С. 53–63.
20. Кудрявцева Е.В., Буринская А.А. // Sci. Heritage. 2021. № 58. Вып. 14. С. 39–45. <https://doi.org/10.24412/9215-0365-2021-58-1-39-45>
21. Ерохина Е.В., Галашина В.Н., Дымникова Н.С., Морыганов А.П. // Рос. хим. журн. 2016. Т. 60. № 5-6. С. 9–16.
22. Харитоновна Е.В., Журавлев О.Е., Червинец В.М., Ворончихина Л.И. // Хим.-фарм. журн. 2012. № 5. С. 6–8.
23. Уринов У.К., Ирисбеков Б.Б., Хазраткулов Ш.Ш., Комолов Р.И., Юсупбаев К.П., Бахранова Д.Р. // Universum: хим. биол. 2021. № 4 (82). С. 81–85. <https://7universum.com/ru/nature/archive/item/11504>
24. Пулатова З.М., Сарымзакова Б.К., Эралиева М.Г., Сарымзакова Р.К. // Сб. статей междунаrod. научно-практич. конфер. “Приоритетные направления развития науки и образования”. Пенза: МЦНС “Наука и просвещение”, 2018. С. 26–29.
25. Улькина Я. // In: Conferința Științifică Națională cu Participare Internațională “Integrare Prin Cercetare și Inovare”, 10–11 Noiembrie 2021, USM. P. 176–178.

## Prospects for the Use of Metal Cations for the Development of Antimicrobial Complexes

A. V. Kadomtseva\*·#, G. M. Mochalov\*\*, I. V. Zhdanovich\*, and M. S. Piskunova\*

#E-mail: kadomtseva@pimunn.ru

\*Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation,  
pl. Minina i Pozharskogo 10/1, Nizhny Novgorod, 603005 Russia

\*\*Nizhny Novgorod State Technical University named after R.E. Alekseev, ul. Minina 24, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

It is known that antibacterial drugs with prolonged use cause antibiotic resistance in bacteria. Fast formation of resistance of microorganisms to modern antibacterial drugs requires the search for new methods of treatment. An alternative direction is the use of metal nanoparticles and their oxides as a basis for the creation of antimicrobial agents of a new generation, therefore, the study of methods for the synthesis of metal nanoparticles, their physico-chemical and pharmacological properties seems promising. The review examines the mechanisms of antibiotic resistance formation in biofilm and possible ways to overcome them for nanoscale metal particles, describes the synthesis and mechanism of action of nanoparticles containing silver, copper and zinc cations, presents the results of studies evaluating the effect of metal nanoparticles on antibiotic sensitivity in gram-positive and gram-negative bacteria, as well as fungi in comparison with the action of known dosage forms.  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  cations have a pronounced antibacterial effect in cultures *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.  $\text{Ag}^+$  cations showed the greatest efficacy against *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Candida albicans*.

*Keywords: metal nanoparticles, copper, zinc, silver cations, antibiotic resistance, biofilm, antimicrobials*



УДК 577.17+577.171.6

## ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА ЛКЕКК

© 2023 г. Е. В. Наволоцкая\*, #, Д. В. Зинченко\*, А. Н. Мурашев\*

\*Филиал ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, Россия, 142290 Пущино, просп. Науки, 6

Поступила в редакцию 05.07.2022 г.

После доработки 16.07.2022 г.

Принята к публикации 12.08.2022 г.

В обзоре суммированы и систематизированы данные о противовоспалительном действии синтетического пептида ЛКЕКК *in vitro* и *in vivo*. На основании проведенного анализа сделано заключение о значительном терапевтическом потенциале пептида ЛКЕКК в качестве противовоспалительного препарата при болезни Крона, различных формах колита и контактного дерматита.

Ключевые слова: белки, пептиды, рецепторы, цитокины, воспаление, лекарственные средства

DOI: 10.31857/S0132342323010207, EDN: GKKYDM

### СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	41
ДЕЙСТВИЕ СТ-В И ПЕПТИДА ЛКЕКК НА ЭПИТЕЛИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ КИШЕЧНИКА.....	41
ДЕЙСТВИЕ СТ-В И ПЕПТИДА ЛКЕКК ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КОЛИТЕ.....	43
ДЕЙСТВИЕ СТ-В И ПЕПТИДА ЛКЕКК НА КЕРАТИНОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА.....	43
ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДА ЛКЕКК НА МОДЕЛЯХ ОСТРОГО И ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ КОЖИ.....	44
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	45

### ВВЕДЕНИЕ

Более трех десятилетий назад был синтезирован октапептид ЛКЕКК<sub>1</sub>YSP – фрагмент 131–138 IFN- $\alpha_2$  человека – и установлена его способность с высоким сродством связываться с тимоцитами мыши [1] и фибробластами человека [2]. Связывание меченого октапептида конкурентно ингибировало немеченые IFN- $\alpha_2$ , ТМ- $\alpha_1$  и В-субъединица холерного токсина (СТ-В). Сравнение

аминокислотных последовательностей октапептида и ТМ- $\alpha_1$  показало, что они содержат одинаковый пятичленный фрагмент – ЛКЕКК, соответствующий последовательностям 16–20 ТМ- $\alpha_1$  и 131–135 IFN- $\alpha_2$  (рис. 1). Было высказано предположение, что этот фрагмент может участвовать в связывании ТМ- $\alpha_1$  и IFN- $\alpha_2$  с различными типами клеток, а соответствующий синтетический пептид может обладать не только рецепторной, но и биологической активностью.

Мы синтезировали пептид ЛКЕКК, получили [<sup>3</sup>H]ЛКЕКК и показали его способность с высоким сродством связываться с Т-лимфоцитами донорской крови человека [3] и мембранами, выделенными из эпителиальных клеток тонкого кишечника крысы [4]. Связывание меченого пептида конкурентно ингибировало ТМ- $\alpha_1$ , IFN- $\alpha_2$  и СТ-В. Обработка клеток и мембран протеазами не влияла на связывание, что указывает на небелковую природу рецептора или, по крайней мере, той его части, которая непосредственно участвует в связывании. Полученные результаты свидетельствуют о том, что на лимфоцитах и эпителиальных клетках кишечника имеется небелковый рецептор, общий для ТМ- $\alpha_1$ , IFN- $\alpha_2$  и СТ-В. Было высказано предположение, что этим рецептором может быть рецептор холерного токсина – ганглиозид GM1.

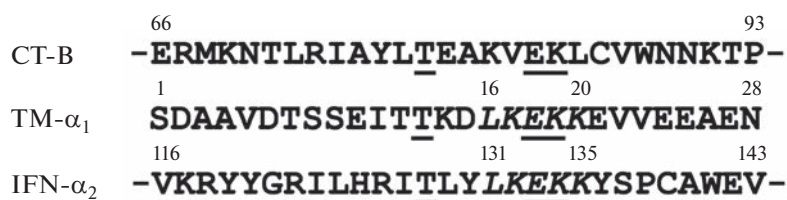
### ДЕЙСТВИЕ СТ-В И ПЕПТИДА ЛКЕКК НА ЭПИТЕЛИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ КИШЕЧНИКА

Проведенные нами исследования показали, что <sup>125</sup>I-меченная СТ-В с высоким сродством свя-

Сокращения: СТ-В – В-субъединица холерного токсина; cGMP – циклический гуанозин-3',5'-монофосфат; DSS – декстран сульфата натрия; IFN – интерферон; iNOS – индуцибельная NO-синтаза; LPS – липополисахарид; ODQ – 1H-[1,2,4]оксадиазол[4,3- $\alpha$ ]хиноксалин-1-он; pGC – мембраносвязанная гуанилатциклаза; sGC – растворимая гуанилатциклаза; ТМ- $\alpha_1$  – тимозин- $\alpha_1$ ; ТРА – 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетат.

# Автор для связи: (тел.: +7 (496) 773-66-68; эл. почта: navolotskaya@bibch.ru).





**Рис. 1.** Сравнение аминокислотных последовательностей СТ-В, TM- $\alpha_1$  человека и IFN- $\alpha_2$  человека. Совпадающие аминокислотные остатки подчеркнуты, последовательность пептида LKEKK выделена курсивом.

зывается с эпителиальными клетками тонкого кишечника линий IEC-6 крысы [5] и Caco-2 человека ( $K_d$  3.6 и 3.7 нМ соответственно) [5, 6]. В обоих случаях связывание меченого белка конкурентно ингибировали немеченые TM- $\alpha_1$ , IFN- $\alpha_2$  и пептид LKEKK, но не ингибировал немеченый пептид с инвертированной последовательностью KKEKL ( $K_i > 10$  мкМ). Аналогичные результаты были получены при исследовании рецепции  $^{125}$ I-меченной СТ-В мембранами, выделенными из эпителиальных клеток тонкого кишечника крысы [7]: связывание характеризовалось высокой аффинностью ( $K_d = 3.7$  нМ) и ингибировалось немечеными IFN- $\alpha_2$ , TM- $\alpha_1$  и пептидом LKEKK ( $K_i$  2.0, 1.5 и 1.0 нМ соответственно), немеченый пептид KKEKL был неактивен ( $K_i > 1$  мкМ). Кроме того, СТ-В и пептид LKEKK не влияли на активность аденилатциклазы и мембраносвязанной гуанилатциклазы pGC [7]. В то же время в диапазоне концентраций 10–1000 нМ СТ-В и пептид LKEKK дозозависимо увеличивали активность растворимой гуанилатциклазы (sGC) в клетках IEC-6 и Caco-2 и продукцию активатора этого фермента – NO; протестированный параллельно пептид с инвертированной последовательностью KKEKL был неактивен [6].

Растворимая гуанилатциклаза (sGC) – это гетеродимер, состоящий из  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц; фермент катализирует превращение гуанозин-5'-трифосфата (GTP) в циклический гуанозин-3',5'-монофосфат (сGMP) и активируется прямым взаимодействием NO с гемом  $\beta$ -субъединицы [8]. Помимо sGC, существуют мембраносвязанные ферменты, синтезирующие сGMP [9]. Геном млекопитающих кодирует семь форм мембраносвязанных гуанилатциклаз (pGC-A–pGC-G), все они имеют сходную топологию: внеклеточный лигандсвязывающий домен, короткую трансмембранную область и внутриклеточный домен с каталитическим участком на C-конце [9].

NO – это диффузный мессенджер, опосредующий широкий спектр физиологических и патологических процессов в организме человека [10]. Он выполняет несколько защитных функций: улучшает перфузию тканей, ингибирует агрегацию тромбоцитов [11], снижая адгезию лейкоцитов к

эндотелиальным клеткам [12, 13] и пролиферацию клеток гладкой мускулатуры [14], способствует сохранению тканевой и органной архитектуры. Помимо регуляции нормальных физиологических функций, NO участвует в развитии ряда патологических состояний, таких как септический шок, инсульт и нейродегенеративные заболевания [15, 16]. NO синтезируется из L-аргинина индуцибельной (iNOS), эндотелиальной (eNOS) и нейрональной (nNOS) изоформами NO-синтазы (NOS) [10, 17] и активирует sGC, связываясь с гемом ее  $\beta$ -субъединицы [8]. Накапливающийся в клетке сGMP передает сигналы к нижестоящим элементам сигнального каскада: сGMP-зависимым протеинкиназам, сGMP-регулируемым катионным каналам и сGMP-активируемым фосфодиэстеразам [8, 18].

Следует отметить, что в клетках кишечника NO функционирует в качестве основного нейромедиатора торможения, эндотелиальный NO участвует в локальной регуляции кровотока слизистой оболочки, в то же время высокие концентрации NO при воспалении провоцируют потерю ее целостности [19, 20]. Как полагают, гиперпродукция NO эпителиальными клетками слизистой оболочки – один из основных механизмов развития некротизирующего энтероколита (NEC) [21]. В отличие от конститутивно экспрессируемых eNOS и nNOS [22], высокий уровень экспрессии iNOS индуцируется в кишечнике во время воспаления, что приводит к повышенному образованию NO [21]. На экспериментальных моделях NEC показано, что ингибирование iNOS ослабляет воспалительное повреждение кишечника [10, 23–26].

Имеются неопровержимые доказательства того, что эффекты низких концентраций NO (~5–50 мкМ) опосредованы сGMP [27, 28]. Согласно полученным нами результатам, возрастание в присутствии 100 нМ СТ-В или пептида LKEKK продукции NO в клетках IEC-6 (с 16 в контроле до 28 и 26 мкМ) и Caco-2 (с 18 в контроле до 33 и 30 мкМ) приводило к почти двукратному увеличению активности внутриклеточной sGC [6]. Эти данные также свидетельствуют о том, что низкие уровни NO активируют sGC и, следовательно,

опосредованный ею путь передачи сигнала от рецептора внутрь клетки.

Таким образом, связывание СТ-В и пептида LKEKK с общим рецептором на клетках кишечника приводит к увеличению продукции клетками NO и активации sGC.

### ДЕЙСТВИЕ СТ-В И ПЕПТИДА LKEKK ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КОЛИТЕ

Установлено, что пероральное введение рекомбинантного СТ-В (rCT-V) мышам с индуцированным тринитробензолсульфоновой кислотой (TNBS) колитом (модель болезни Крона) подавляет развитие воспалительного процесса на ранних и поздних сроках болезни. Исследования доза–реакция показали, что у 68% мышей, получавших rCT-V в дозе 100 мкг 4 раза в день, и у 30% мышей, получавших rCT-V в дозе 10 мкг 4 раза в день, наблюдалось полное ингибирование прогрессирования колита; при этом в обоих случаях у остальных мышей отмечалось некоторое снижение тяжести воспаления. Введение rCT-V сопровождалось снижением секреции IFN- $\gamma$ , обусловленным выраженным ингибированием секреции IL-12 Th1-клетками. Кроме того, введение rCT-V приводило к усилению апоптоза клеток собственной пластинки – тонкого слоя соединительной ткани, выступающей частью слизистой оболочки, эффект, ранее показанный как признак депривации IL-12. Из этих исследований следует, что rCT-V – мощный ингибитор воспаления, управляемого Th1-клетками [29]. Необходимо отметить, что согласно данным Kulig et al. [30], связывание IL-12 с рецептором на кератиноцитах инициирует защитную программу транскрипции, ограничивающую воспаление.

Противовоспалительная активность rCT-V была подтверждена в клинических испытаниях, которые показали, что белок способен подавлять воспаление при легком и умеренном течении болезни Крона: у семи из пятнадцати пациентов, получавших перорально по 5 мг rCT-V через день в течение двух недель, отмечалась ремиссия; побочные эффекты при этом отсутствовали. Авторы исследования сделали вывод, что rCT-V имеет значительный терапевтический потенциал в качестве безопасного противовоспалительного средства, для установления клинической эффективности которого необходимы рандомизированные исследования [31].

Чтобы выяснить, может ли пептид LKEKK, подобно СТ-В, оказывать противовоспалительное действие *in vivo*, мы изучили влияние белка СТ-В и пептида LKEKK на течение воспалительного процесса в кишечнике мышей с DSS-индуцированным колитом. Животным перорально вводили СТ-В или пептид LKEKK (5–20 мг/кг

массы тела в течение 14 дней), а чтобы вызвать колит, на 7-й день в питьевую воду добавляли 5% DSS (декстран сульфата натрия). На 14-й день ткань кишечника отбирали для анализа. Эксперименты показали, что на 7-й день приема DSS у мышей проявлялись характерные признаки колита: потеря веса, диарея и ректальное кровотечение. В то же время у животных, получавших в течение 14 дней СТ-В или пептид LKEKK (20 мг/кг), все клинические признаки болезни были выражены значительно слабее, а потеря веса и укорочение толстой кишки практически отсутствовали. Параллельно было показано, что снижение тяжести заболевания сопровождается значительным уменьшением продукции клетками кишечника провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$  и IL-6 [32].

Поскольку, как уже было сказано выше, СТ-В и пептид LKEKK повышают активность sGC клеток-мишеней, мы предположили, что этот фермент может участвовать в реализации их эффектов. Для проверки этого предположения мы исследовали влияние СТ-В и пептида LKEKK на TNF- $\alpha$ -индуцированную секрецию провоспалительного цитокина IL-8 в клетках Caco-2 при частичном или полном отсутствии у них активности sGC. Фермент ингибировали с помощью специфического ингибитора ODQ (1*H*-[1,2,4]оксадиазоло[4,3- $\alpha$ ]хиноксалин-1-он), который окисляет связывающую NO протестическую группу гема [33]. Было установлено, что снижение активности sGC сопровождается потерей способности белка и пептида ингибировать секрецию IL-8 [32]. Таким образом, действие СТ-В и пептида LKEKK на секрецию провоспалительного цитокина IL-8 в TNF- $\alpha$ -стимулированных клетках Caco-2 опосредовано sGC.

### ДЕЙСТВИЕ СТ-В И ПЕПТИДА LKEKK НА КЕРАТИНОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА

Кератиноциты – это основные клетки эпидермиса, они реагируют на различные факторы внешней среды и непосредственно участвуют в регуляции воспалительного ответа кожи [34]. Показано, что пять провоспалительных цитокинов, продуцируемых кератиноцитами, напрямую участвуют в индукции и развитии воспалительного процесса в эпидермисе: IL-17A, IL-22, онкостатин M, TNF- $\alpha$  и IL-1 $\alpha$  [35]. Установлена роль отдельных цитокинов в развитии воспаления: IL-22 и онкостатин M контролируют эпидермальную гиперплазию и потерю дифференцировки, тогда как IL-1 $\alpha$ , IL-17A и TNF- $\alpha$  обеспечивают активацию врожденного иммунитета [36].

Изучение рецепции нормальными кератиноцитами человека пептида LKEKK показало, что меченный тритием пептид способен обратимо, с



высоким сродством и специфичностью связываться с этими клетками ( $K_d = 2.6$  нМ). В качестве потенциальных конкурентов меченого пептида были протестированы немеченые ТМ- $\alpha_1$ , IFN- $\alpha_2$  и пептид с инвертированной последовательностью ККЕКЛ. Эксперименты показали, что ТМ- $\alpha_1$  и IFN- $\alpha_2$  конкурентно ингибировали связывание, в то время как пептид ККЕКЛ был неактивен. Неспособность пептида с инвертированной последовательностью вытеснить [ $^3\text{H}$ ]LKEKK из комплекса с рецептором указывает на высокую специфичность связывания меченого пептида [37].

Далее мы исследовали противовоспалительную активность пептида LKEKK, используя модель IL-17A-индуцированного воспаления кератиноцитов человека *in vitro*: к клеткам, предварительно обработанным пептидом, добавляли IL-17A (20 нг/мл) для индукции воспаления. Эксперименты показали, что пептид LKEKK в диапазоне концентраций 50–1000 нМ дозозависимо снижает IL-17A-индуцируемую продукцию трех провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-1 $\alpha$ ) и одновременно увеличивает выработку противовоспалительного цитокина IL-10. Протестированный параллельно пептид с инвертированной последовательностью ККЕКЛ был неактивен, что указывает на высокую специфичность действия пептида LKEKK [37, 38].

Согласно полученным нами данным, пептид LKEKK при концентрациях 50–1000 нМ дозозависимо увеличивает активность sGC в кератиноцитах, но не влияет на активность pGC; протестированный параллельно пептид с инвертированной последовательностью был неактивен. Таким образом, связывание пептида LKEKK с кератиноцитами человека приводит к увеличению в них активности sGC. Мы также исследовали действие пептида на способность кератиноцитов к IL-17A-индуцированной продукции TNF- $\alpha$  и IL-1 $\alpha$  при частичной или полной потере активности sGC. Для ингибирования активности фермента использовали ODQ, специфический ингибитор sGC [33]. Эксперименты показали, что ODQ дозозависимо снижал активность sGC и ингибирующий эффект 500 нМ пептида LKEKK на IL-17A-индуцированную продукцию кератиноцитами TNF- $\alpha$  и IL-1 $\alpha$ . Таким образом, снижение активности фермента сопровождалось потерей пептидом LKEKK способности ингибировать секрецию противовоспалительных цитокинов, и, следовательно, действие пептида опосредовано через sGC.

## ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДА LKEKK НА МОДЕЛЯХ ОСТРОГО И ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ КОЖИ

Мы оценили противовоспалительную активность пептида на моделях острого хронического контактного дерматита у мышей, индуцированного 12-*O*-тетрадеканойлфорбол-13-ацетатом (ТРА). Повышенное утолщение кожи – первый признак раздражения и локального воспаления, которое возникает из-за повышения проницаемости сосудов, отека дермы и пролиферации эпидермальных кератиноцитов.

Для изучения действия пептидов LKEKK и ККЕКЛ при остром кожном воспалении внутреннюю и наружную поверхности уха мышей обрабатывали одним из двух пептидов (10–300 мкг в 20 мкл среды, содержащей 2%-ный диметилсульфоксид, 20%-ный пропиленгликоль и 70%-ный ацетон, трижды с интервалом в 15 мин). Уши животных групп отрицательного и положительного контроля обрабатывали, соответственно, базовой средой или дексаметазоном (0.05 мг/ухо в ацетоне). Через 15 мин на кожу наносили 20 мкл ТРА (12-*O*-тетрадеканойлфорбол-13-ацетат, 2.0 мкг/ухо в ацетоне). Отек (увеличение толщины уха) измеряли с помощью цифрового толщиномера (Mitutoyo Corporation, Япония) до и через 5 ч после применения ТРА.

Эксперименты показали, что локальное воздействие ТРА приводит к значительному (более чем на 300 мкм) увеличению толщины уха на фоне применения базовой среды (отрицательный контроль). В то же время пептид LKEKK (50–300 мкг/ухо) или дексаметазон (0.05 мг/ухо, положительный контроль) снижали отек до 140–200 и 60 мкм соответственно. Протестированный параллельно пептид с инвертированной последовательностью ККЕКЛ был неактивен. Гистологические исследования окрашенных гематоксилином и эозином срезов ткани уха мышей, получавших ТРА, показали заметное увеличение толщины уха с явными признаками отека и появлением значительного количества воспалительных клеток в дерме. Таким образом, местное применение пептида LKEKK (50–300 мкг/ухо) значительно уменьшало отек уха и связанные с отеком патологические показатели [39]. Следует отметить, что эффективность пептида в концентрациях 150–300 мкг/ухо была сопоставима с эффективностью дексаметазона [39].

Известно, что местное воздействие ТРА приводит к заметному увеличению уровней провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-1 $\beta$ ) в пробах биопсии уха мыши [40, 41]. Полученные нами результаты полностью согласуются с этими данными: уровни TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-1 $\beta$  резко возрастали в области ТРА-индуцированного

воспаления. В то же время обработка пептидом (50–300 мкг/ухо) дозозависимо снижала уровни этих цитокинов, а значит, и опосредуемое ими развитие воспалительного процесса. Следовательно, пептид ЛКЕКК может быть эффективным в качестве противовоспалительного средства при остром контактном дерматите.

Чтобы окончательно убедиться в том, что пептид ЛКЕКК обладает противовоспалительной активностью *in vivo*, мы исследовали его действие на разработанной Stanley et al. [42] модели хронического воспаления кожи, вызванного многократным нанесением ТРА на уши мышей. Воспалительный ответ в этой модели характеризуется увеличением веса уха, инфильтрацией воспалительных клеток и гиперплазией эпидермиса. Эксперименты проводили по следующей схеме: 20 мкл раствора ТРА (2.0 мкг/ухо в ацетоне) или ацетона (наполнитель) наносили на внутреннюю и наружную поверхности уха 6 раз через день. На 7–9-е сутки внутреннюю и наружную поверхности правого уха мышей обрабатывали пептидом ЛКЕКК (100–300 мкг/ухо) или дексаметазоном (0.05 мг/ухо в ацетоне, положительный контроль) 2 раза в день. Толщину уха измеряли с помощью цифрового толщиномера через 5 ч после последней обработки ТРА. Результаты экспериментов показали, что обработка ТРА приводит к значительному увеличению толщины и веса уха, а пептид ЛКЕКК заметно снижал степень выраженности этих изменений, при этом активность пептида была сопоставима с активностью дексаметазона. Гистологическое исследование окрашенных срезов ткани уха мышей, получавших ТРА, показало, что его многократное применение приводит к заметному увеличению толщины уха и гиперплазии эпидермиса. Лечение пептидом ЛКЕКК (300 мкг/ухо) значительно уменьшало отек и другие патологические признаки воспаления. Эти данные подтверждают способность пептида ЛКЕКК подавлять персистирующие воспалительные поражения при многократном местном применении.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пептид ЛКЕКК обладает выраженной противовоспалительной активностью *in vitro* и *in vivo*, имеет простую структуру, не токсичен, не иммуногенен – все перечисленное делает пептид ЛКЕКК пригодным для разработки на его основе противовоспалительного препарата.

## 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. *Zav'yalov V.P., Navolotskaya E.V., Abramov V.V., Galaktionov V.G., Isaev I.S., Kaurov O.A., Kozhich A.T., Maiorov V.A., Prusakov A.N., Vasilenko R.N., Volodina E.Yu.* // FEBS Lett. 1991. V. 278. P. 187–189. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80113-h](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80113-h)
2. *Zav'yalov V.P., Navolotskaya E.V., Vasilenko R.N., Abramov V.M., Volodina E.Y., Roslovvtseva O.A., Prusakov A.N., Kaurov O.A.* // Mol. Immunol. 1995. V. 32. P. 425–431. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(94\)00161-s](https://doi.org/10.1016/0161-5890(94)00161-s)
3. *Наволоцкая Е.В., Зинченко Д.В., Золотарев Ю.А., Колобов А.А., Липкин В.М.* // Биохимия. 2016. Т. 81. С. 1109–1114. [*Navolotskaya E.V., Zinchenko D.V., Zolotarev Y.A., Kolobov A.A., Lipkin V.M.* // Biochemistry (Moscow). 2016. V. 81. P. 871–875.] <https://doi.org/10.1134/S0006297916080071>
4. *Наволоцкая Е.В., Садовников В.Б., Зинченко Д.В., Владимиров В.И., Золотарев Ю.А., Колобов А.А.* // Биоорг. химия. 2016. Т. 42. С. 533–538. [*Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Zinchenko D.V., Vladimirov V.I., Zolotarev Y.A., Kolobov A.A.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2016. V. 42. P. 479–483.] <https://doi.org/10.1134/S1068162016050137>
5. *Наволоцкая Е.В., Садовников В.Б., Зинченко Д.В., Владимиров В.И., Золотарев Ю.А., Липкин В.М.* // Биоорг. химия. 2018. Т. 44. С. 401–406. [*Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Zinchenko D.V., Vladimirov V.I., Zolotarev Y.A.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. P. 403–407.] <https://doi.org/10.1134/S1068162018030123>
6. *Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Lipkin V.M., Zav'yalov V.P.* // Toxicology in Vitro. 2018. V. 47. P. 269–273. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.12.010>
7. *Наволоцкая Е.В., Садовников В.Б., Зинченко Д.В., Владимиров В.И., Золотарев Ю.А.* // Биоорг. химия. 2017. Т. 43. С. 655–660. [*Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Zinchenko D.V., Vladimirov V.I., Zolotarev Y.A.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2017. V. 43. P. 673–677.] <https://doi.org/10.1134/S1068162017060115>
8. *Kots A.Y., Martin E., Sharina I.G., Murad F.* // Handb. Exp. Pharmacol. 2009. V. 191. P. 1–14. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-68964-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-540-68964-5_1)
9. *Potter L.R.* // Cell. Signal. 2011. V. 23. P. 1921–1926. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.09.001>
10. *Bredt D.S., Snyder S.H.* // Annu. Rev. Biochem. 1994. V. 63. P. 175–195. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.001135>
11. *Tsikis D., Ikic M., Tewes K.S., Raida M., Frolich J.C.* // FEBS Lett. 1999. V. 442. P. 162–166. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)01633-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01633-0)

12. *Gidday M., Park T.S., Shah A.R., Gonzales E.R.* // *Stroke*. 1998. V. 29. P. 1423–1430.  
<https://doi.org/10.1161/01.str.29.7.1423>
13. *Polte T., Schroder H.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. V. 251. P. 460–465.  
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9486>
14. *Hassid A., Yao J., Huang S.* // *Am. J. Physiol.* 1999. V. 277. P. H1014–H1026.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1999.277.3.H1014>
15. *Bolaños J.P., Almeida A.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1999. V. 1411. P. 415–436.  
[https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(99\)00030-4](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(99)00030-4)
16. *Titheradge M.A.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1999. V. 1411. P. 437–455.  
[https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(99\)00031-6](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(99)00031-6)
17. *Stuehr D.J.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1999. V. 1411. P. 217–230.  
[https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(99\)00016-x](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(99)00016-x)
18. *Denninger J.W., Marletta M.A.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1999. V. 1411. P. 334–350.  
[https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(99\)00024-9](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(99)00024-9)
19. *Stark M.E., Szurszewski J.H.* // *Gastroenterology*. 1992. V. 103. P. 1928–1949.  
[https://doi.org/10.1016/0016-5085\(92\)91454-c](https://doi.org/10.1016/0016-5085(92)91454-c)
20. *Alican I., Kubes P.* // *Am. J. Phys.* 1996. V. 270. P. G225–G237.  
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2003.11.046>
21. *Chokshi N.K., Guner Y.S., Hunter C.J., Upperman J.S., Grishin A., Ford H.R.* // *Semin. Perinatol.* 2008. V. 32. P. 92–99.  
<https://doi.org/10.1053/j.semperi.2008.01.002>
22. *Moncada S.* // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1997. V. 811. P. 60–67.  
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb51989.x>
23. *Ciftçi I., Dilsiz A., Aktan T.M., Gürbilek M., Duman S.* // *Eur. J. Pediatr. Surg.* 2004. V. 14. P. 398–403.  
<https://doi.org/10.1055/s-2004-821105>
24. *Giannone P.J., Schanbacher B.L., Bauer J.A., Reber K.M.* // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2006. V. 43. P. 284–290.  
<https://doi.org/10.1097/01.mpg.0000232572.56397.d6>
25. *Ford H., Watkins S., Rebbeck K., Rowe M.* // *J. Pediatr. Surg.* 1997. V. 32. P. 275–282.  
[https://doi.org/10.1016/s0022-3468\(97\)90194-9](https://doi.org/10.1016/s0022-3468(97)90194-9)
26. *Cintra A.E., Martins J.L., Patrício F.R., Higa E.M., Montero E.F.* // *Transplant. Proc.* 2008. V. 40. P. 830–835.  
<https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.02.044>
27. *Niedbala W., Wei X.Q., Piedrafita D., Xu D., Liew F.Y.* // *Eur. J. Immunol.* 1999. V. 29. P. 2498–2505.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199908\)29:08<2498::AID-IMMU2498>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199908)29:08<2498::AID-IMMU2498>3.0.CO;2-M)
28. *Niedbala W., Wei X.Q., Campbell C., Thomson D., Komai-Koma M., Liew F.Y.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. P. 16186–16191.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.252464599>
29. *Boirivant M., Fuss I.J., Ferroni L., de Pascale M., Strober W.* // *J. Immunol.* 2001. V. 166. P. 3522–3532.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.5.3522>
30. *Kulig P., Musiol S., Freiberger S.N., Schreiner B., Gyülveszi G., Russo G., Pantelyushin S., Kishihara K., Alessandrini F., Kündig T., Sallusto F., Hofbauer G.F., Haak S., Becher B.* // *Nat. Commun.* 2016. V. 28. P. 13466.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms13466>
31. *Stal P., Befrits R., Ronnblom A., Danielsson A., Suhr O., Stahlberg D., Brinkberg Lapidus A., Lofberg R.* // *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2010. V. 31. P. 387–395.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2009.04185.x>
32. *Navolotskayaa E.V., Sadovnikov V.B., Lipkin V.M., Zav'yalov V.P.* // *J. Clin. Exp. Immunol.* 2019. V. 4. P. 1–6.  
<https://doi.org/10.33140/JCEI.04.04.03>
33. *Feelisch M.I., Kotsonis P., Siebe J., Clement B., Schmidt H.H.* // *Mol. Pharmacol.* 1999. V. 56. P. 243–253.  
<https://doi.org/10.1124/mol.56.2.243>
34. *Breitkreutz D., Mirancea N., Nischt R.* // *Histochem. Cell. Biol.* 2009. V. 132. P. 1–10.  
<https://doi.org/10.1007/s00418-009-0586-0>
35. *Guilloteau K., Paris I., Pedretti N., Boniface K., Juchaux F., Huguier V., Guillet G., Bernard F.-X., Lecron J.-C., Morel F.* // *J. Immunol.* 2010. V. 184. P. 5263–5270.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902464>
36. *Robeony H., Petit-Paris I., Garnier J., Barrault C., Pedretti N., Guilloteau K., Jegou J.-F., Guillet G., Huguier V., Lecron J.-C., Bernard F.-X., Morel F.* // *PLoS One*. 2014. V. 9. P. e101937.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101937>
37. *Наволоцкая Е.В., Садовников В.Б., Зинченко Д.В., Золотарев Ю.А., Липкин В.М., Мурашев А.Н.* // *Биоорг. химия*. 2020. Т. 46. С. 670–675. [*Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Zinchenko D.V., Zolotarev Y.A., Lipkin V.M., Murashev A.N.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. P. 1038–1043.]  
<https://doi.org/10.1134/S1068162020060229>
38. *Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Zav'yalov V.P., Murashev A.N.* // *J. Clin. Immunol. Immunother.* 2021. V. 7. P. 064.  
<https://doi.org/10.24966/CIIT-8844/1000064>
39. *Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Zinchenko D.V., Zav'yalov V.P., Murashev A.N.* // *J. Clin. Exp. Immunol.* 2021. V. 6. P. 356–361.  
<https://doi.org/10.33140/JCEI.06.05.02>
40. *Murakawa M., Yamaoka K., Tanaka Y., Fukuda Y.* // *Biochem. Pharmacol.* 2006. V. 71. P. 1331–1336.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.01.005>
41. *De Vry C.G., Valdez M., Lazarov M., Muhr E., Buelow R., Fong T., Iyer S.* // *J. Invest. Dermatol.* 2005. V. 125. P. 473–481.  
<https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23831.x>
42. *Stanley P.L., Steiner S., Havens M., Tramposch K.M.* // *Skin Pharmacol.* 1991. V. 4. P. 262–271.  
<https://doi.org/10.1159/000210960>

**Anti-Inflammatory Effect of Peptide LKEKK****E. V. Navolotskaya\*<sup>#</sup>, D. V. Zinchenko\*, and A. N. Murashev\***<sup>#</sup>Phone: +7 (496) 773-66-68; e-mail: navolotskaya@bibch.ru

\*Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, prosp. Nauki 6, Pushchino, 142290 Russia

The review summarizes and systematizes data on the anti-inflammatory effect of the synthetic peptide LKEKK *in vitro* and *in vivo*. Based on the analysis, it was concluded that this peptide has a significant therapeutic potential as an anti-inflammatory drug in Crohn's disease, various forms of colitis and contact dermatitis.

*Keywords: proteins, peptides, receptors, cytokines, inflammation, drugs*



УДК 619:616.98:578.831.1:615.371/372

## ЛИПОСОМЫ С НАБОРОМ Т-КЛЕТОЧНЫХ ЭПИТОПОВ ВИРУСА SARS-CoV-2 КАК ПРОТОТИП ВАКЦИННОЙ КОНСТРУКЦИИ

© 2023 г. Д. С. Третьякова\*, А. С. Алексеева\*, Н. Р. Онищенко\*, И. А. Болдырев\*,  
Н. С. Егорова\*, Д. В. Васина\*\*, В. А. Гуцин\*\*, А. С. Чернов\*\*\*, Г. Б. Телегин\*\*\*,  
В. А. Казаков\*\*\*, К. С. Плохих\*\*\*\*, М. В. Коновалова\*, Е. В. Свирищевская\*, Е. Л. Водовозова\*,#

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

\*\*ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии  
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, ул. Гамалеи, 18

\*\*\*Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
Россия, 142290 Пущино, Институтская ул., 8

\*\*\*\*ФГБУ «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,  
Россия, 123182 Москва, пл. Академика Курчатова, 1

Поступила в редакцию 04.07.2022 г.

После доработки 10.07.2022 г.

Принята к публикации 14.07.2022 г.

На основании анализа публикаций по результатам полногеномного иммуноинформационного анализа Т-клеточных эпитопов вируса SARS-CoV-2 (уханский штамм), а также ряда клинических исследований иммунодоминантных эпитопов среди выздоравливающих после перенесенного заболевания COVID-19 пациентов, отобраны и синтезированы потенциальные нонамерные эпитопы CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов из состава структурных, вспомогательных и неструктурных белков вируса (13 пептидов) и 15-мерный эпитоп CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов из S-белка. Пять композиций из 6–7 пептидов включали в липосомы из яичного фосфатидилхолина и холестерина (размер ~200 нм), полученные методом экструзии. После двукратной подкожной иммунизации конвенциональных мышей оценивали активацию клеточного звена иммунитета по уровню синтеза цитокинов спленоцитами *in vitro* в ответ на стимуляцию соответствующими пептидными композициями. Лучший результат, свидетельствующий о формировании специфического клеточного иммунитета в ответ на вакцинацию, отмечен у одной из липосомальных формуляций. Проверка протективной эффективности этой формуляции на инфекционной модели мышей показала положительную динамику частоты встречаемости гиалиноподобных мембран в просвете альвеол, а также коррекцию выраженности микроциркуляторных нарушений. Последнее обстоятельство потенциально может способствовать снижению тяжести заболевания и предупреждению неблагоприятных его исходов. Отрабатывается метод получения препаратов липосом с пептидными композициями для длительного хранения.

**Ключевые слова:** Т-клетки, эпитопы, SARS-CoV-2, вакцины, пептиды, липосомы, цитокины

**DOI:** 10.31857/S0132342322060252, **EDN:** POMUEE

### ВВЕДЕНИЕ

Традиционные вакцины для лечения и профилактики инфекционных заболеваний представляют собой живые ослабленные или инактивиро-

ванные/убитые патогены. Они не нуждаются в адьювантах (костимуляторах), т.к. содержат не только антигены, но и другие компоненты бактерий или вирусов, которые эффективно активируют несколько компонентов врожденной иммунной системы. Однако такие вакцины могут вызывать аллергические и аутоиммунные реакции [1]. Так называемые субъединичные вакцины содержат обычно только поверхностные антигены (белки или пептиды) патогенов, что снижает не только аллергенность вакцин, но и их иммуногенность. Упаковка антигенов в частицы сравнимых с вирусами или бактериями размеров (от сотен нанометров до нескольких микрон) позво-

Сокращения: APCs – антиген-презентирующие клетки (antigen-presenting cells); МНС – главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex); CTL – цитотоксические Т-лимфоциты; T<sub>H</sub> – Т-хелперные клетки; CpG-ODN – олигодезоксирибонуклеотид, содержащий мотивы CpG; TLRs – Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors); ePC – яичный фосфатидилхолин; Chol – холестерин; IFN-γ – интерферон гамма; TNF-α – фактор некроза опухоли альфа; IL – интерлейкин.

# Автор для связи: (тел.: 8+7 (495) 330-66-10; эл. почта: elvod@lipids.ibch.ru).

ляет свести к минимуму риски описанных нежелательных реакций, а также обеспечивает защиту антигенов от преждевременной деградации и способствует созданию антигенного депо [2, 3]. Захваченные антиген-презентирующими клетками (APC, дендритные клетки и макрофаги) частицы подвергаются внутриклеточному процессингу, и, в зависимости от пути расщепления, антигены презентуются на поверхности плазмалеммы для распознавания “свой-чужой” Т-лимфоцитам в виде эпитопов – пептидных фрагментов длиной 9 аминокислотных остатков (а.о.) в комплексе с белками главного комплекса гистосовместимости I класса (MHC I) или фрагментов длиной 14–20 а.о. в комплексе с белками MHC II класса (MHC II). Комплексы “пептид–MHC I” стимулируют наивные CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоциты и превращают их в цитотоксические Т-лимфоциты (CTLs), ответственные за клеточный иммунитет и уничтожение инфицированных клеток. Комплексы “пептид–MHC II” активируют наивные CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоциты, которые пролиферируют и дифференцируются в субпопуляции так называемых хелперных клеток T<sub>H</sub>1 и/или T<sub>H</sub>2, в зависимости от типа инфекции [4]. Клетки T<sub>H</sub>1 секретируют различные цитокины, активирующие и регулирующие CTLs. Таким образом, для формирования клеточного иммунитета необходимо стимулировать как CD8<sup>+</sup>-, так и CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоциты.

Липосомы, будучи адьювантами как таковые, представляют интерес в качестве носителей антигенов благодаря своей высокой биосовместимости и пластичности. Способность липосом индуцировать иммунный ответ на антигены, инкапсулированные во внутренний объем или ассоциированные с поверхностью, впервые была описана Аллисон и Грегориadisом [5]. В зависимости от состава и структуры они могут одновременно активировать различные пути трансдукции сигнала и вызывать специфический Т- и/или В-клеточный ответ: антигены, экспонированные на поверхности липосом, могут стимулировать В-лимфоциты, вызывая гуморальный иммунный ответ, и индуцировать Т-клеточные реакции; инкапсулированные антигены, для которых требуется внутриклеточное разрушение липосом, способны индуцировать CTLs. В настоящее время применяются липосомальные вакцины против вирусов гриппа и гепатита А, малярии и вируса *Varicella zoster* (Inflexal®, Epaxal®, Mosquirix® и Shingrix® соответственно); целый ряд липосомальных препаратов проходит клинические испытания в качестве профилактических и лечебных вакцин против малярии, гриппа, туберкулеза, ВИЧ, лихорадки Денге [6–10].

Адьювантные свойства липосом можно усилить или направить по пути того или иного типа иммунного ответа с использованием иммуности-

муляторов – специфических лигандов, которые вызывают активацию рецепторов APC, распознающих патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs) [11]. Одними из таких PAMPs являются неметилованные CpG-мотивы бактериальных ДНК, которые гораздо реже содержатся в хромосомах эукариот, поэтому синтетические CpG-ODN обладают иммуностимулирующей активностью. CpG-мотивы распознаются рецептором TLR9, который экспрессируется в мембране эндосомальных компартментов множества иммунокомпетентных клеток, включая В-клетки, моноциты, НК-клетки, дендритные клетки и макрофаги [12, 13]. В результате стимулируется выработка провоспалительных цитокинов и хемокинов, повышается экспрессия MHC II и костимуляторных молекул (CD40, CD80, CD83, CD86). Синтетические CpG-ODN с успехом применяются при конструировании липосомальных вакцин, причем иммуностимулятор коинкапсулируют во внутренний водный объем липосом либо адсорбируют на катионных липосомах [13].

Пептидные вакцины безопаснее вакцин на основе полноразмерных антигенов или других молекул патогенного происхождения, которые могут содержать онкогенные последовательности [14]. В ряде доклинических исследований показана иммуногенность вакцин на основе липосом с инкапсулированными или связанными с поверхностью специфическими пептидами [13, 15–18] (при совместном введении с CpG-ODN). Авторы [15, 16] конъюгировали с поверхностью липосом нонамерные Т-клеточные эпитопы нуклеокапсидного [15] и неструктурного белка полипротеин 1a [16] коронавируса SARS (SARS-CoV). В первом случае четыре CTL-эпитопа, рестриктированные HLA-A\*0201 (HLA-A2 – один из наиболее распространенных аллельных вариантов молекул MHC I), были идентифицированы с использованием трансгенных мышей и рекомбинантного аденовируса, экспрессирующего 8 предсказанных *in silico* эпитопов; два липосомальных пептида стимулировали специфический Т-клеточный ответ, а одна из этих вакцин вызвала у мышей клиренс вируса осповакцины, экспрессирующего эпитопы SARS-CoV [15]. Во втором случае из 30 предсказанных пептидов восемь значительно стимулировали ответ CTLs и были конъюгированы с липосомами. Из них 7 были активны против вируса *in vivo*, причем один вариант вакцины индуцировал образование клеток памяти [16]. Другие авторы [17] исследовали различные методы инкапсулирования в катионные липосомы разнообразных по физико-химическим свойствам 24-членных пептидов, содержащих последовательность SIINFEKL (иммунодоминантный CTL-эпитоп овальбумина), на предмет достижения эффективной загрузки липосом; липосомы эффективно доставляли пептиды в дендритные

клетки с последующей SIINFEKL-специфической активацией CD8<sup>+</sup>-Т-клеток. При конструировании вакцины против вируса гриппа типа А [18] в липосомы инкапсулировали одновременно 10 консервативных пептидов структурных и неструктурных белков, из которых 5 нонамерных эпитопов были вычислены *in silico* как потенциальные для пандемического свиного гриппа H1N1. В сочетании с кристаллическим уратом натрия вакцинация поросят в интраназальной аэрозольной форме вызвала увеличение частоты вирус-специфических Т<sub>H</sub>-клеток, клеток памяти, стимулировала ответ CTLs, что в итоге привело к частичной защите животных от лихорадки и поражения легких.

В связи с пандемией новой коронавирусной инфекции COVID-19 мировое научное сообщество приступило к ускоренной разработке вакцин, способных активировать как гуморальное, так и клеточное звенья иммунитета. Однако данных о вирулентности белков, кодируемых вирусным геномом, все еще недостаточно. Важным представляется поиск наиболее иммуногенных эпитопов не только в составе спайк-белка (S-белка) вируса SARS-CoV-2, но и других мембранных белков и белков вирусного капсида и нуклеопротеина. Судя по первым опубликованным данным иммуноинформатического анализа полноразмерного генома вируса, в ранжированном списке нонамерных эпитопов CTLs и 15-мерных эпитопов хелперных CD4<sup>+</sup>-Т-клеток (Т<sub>H</sub>-клеток), общих по всем аллелям МНС и охватывающим все преобладающие супертипы HLA (лейкоцитарный антиген человека) в мировой популяции, эпитопы S-белка могут уступать по иммуногенности эпитопам других белков вируса, в том числе неструктурных [18–20]. Целью настоящего исследования стала разработка прототипа вакцинной конструкции на основе липосом, содержащих композицию Т-клеточных эпитопов из первичных структур различных белков вируса SARS-CoV-2. В случае обнаружения иммуногенных эпитопов, не относящихся к S-белку, появляется перспектива разработки вакцин для лечения и профилактики COVID-19, эффективность которых будет мало зависеть от мутаций вирусного генома.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Выбор Т-клеточных эпитопов для получения вакцинных конструкций.** Для выбора пептидов был проанализирован массив опубликованных результатов полногеномного иммуноинформатического анализа Т-клеточных эпитопов вируса SARS-CoV-2 [19–21] и результатов ряда клинических исследований иммунодоминантных эпитопов среди выздоравливающих после перенесенного заболевания COVID-19 пациентов [22–26].

На основании сопоставления всех данных были выбраны и синтезированы 14 потенциальных эпитопов: нонамерные CTL-эпитопы из S-белка, белка оболочки (Е-белок), мембранного белка (М-белок), нуклеокапсидного белка (N-белок), вспомогательных белков *orf6*, *orf8* и неструктурных белков *orf1a*, *orf1b*, *orf3a*, а также 15-мерный Т-хелперный эпитоп S-белка. Перечень синтезированных пептидов приведен в табл. 1.

В соответствии с физико-химическими свойствами пептидов (табл. 1) были подобраны условия их растворения в высокой концентрации (5–7 мМ, т.е. в диапазоне ~7–11 мг/мл, в зависимости от числа пептидов в композиции и молекулярной массы пептида), чтобы при пассивном инкапсулировании смесей пептидов в липосомы загрузка каждого из них была достаточной для проявления потенциальной иммуногенности. В среде 20 мМ фосфатного буфера pH поддерживался в интервале 6.0–7.2. В буфере содержался изотонический раствор сахарозы вместо хлорида натрия как для повышения растворимости пептидов, так и для обеспечения возможности получения липосомальных вакцин длительного хранения, поскольку сахароза является криопротектантом. Пептиды **6** и **11** растворяли в органической фазе вместе с липидами при формировании липосом. К сожалению, не удалось подобрать условия растворения пептида **9** (KVSINWNLDY) вспомогательного белка *orf6*: по данным иммуноинформатического анализа [19], этот пептид относится к консенсусной последовательности эпитопов CTLs и Т<sub>H</sub>-лимфоцитов, и он был выявлен как иммуногенный у шести из семи переболевших пациентов [24, 26].

**Получение липосом с композициями пептидов.** Исходя из принадлежности пептидов к различным вирусным белкам, а также необходимости сочетания в вакцине эпитопов цитотоксических и хелперных Т-клеток, были составлены 4 композиции по 6 пептидов для включения в липосомы L<sub>1</sub>–L<sub>4</sub>, где пептиды **6** и **11** встраивались в липидный бислой, а остальные инкапсулировались во внутренний водный объем, и композиция из семи водорастворимых пептидов для инкапсулирования в липосомы L<sub>5</sub> (табл. 2; композицию для липосом L<sub>5</sub> подбирали исходя из результатов первого цикла экспериментов, см. следующий раздел). Липосомы формировали на основе яичного фосфатидилхолина (ePC) и холестерина (Chol), ePC–Chol, 67 : 33 (мол. %), методом экструзии. При таком соотношении липидных компонентов создается конденсированная прочная мембрана липосом (так называемая жидкокристаллическая упорядоченная фаза липидного бислоя L<sub>o</sub> [27]), способная предотвратить преждевременную потерю пептидов из внутреннего водного объема.

Таблица 1. Синтезированные Т-клеточные эпитопы и их физико-химические свойства

№	Эпитоп	Белок	Локация а.о.	Гидрофобность, % а.о.*	pI**	Консервативность	Число ответивших пациентов	Частота ответов	HLA-аллели	Литература
<b>CTL-эпитопы</b>										
Структурные белки										
1	VGYLQPRTF	S	267–275	44.44	9.82	1	5	0.714	MHC-II покрытие 100%, MHC-I покрытие 65%	[19–21, 24, 26]***
2	YVYSRVKNL	E	56–64	33.33	10.06	0.997	12	0.545	MHC-I покрытие 74%; HLA-DRB1*04:01/HLA-DRB1*11:01	[20, 25]
3	KTPRPTEPK	N	361–369	44.44	9.84	0.998	10	1	HLA-A*03:01/HLA-A*11:01	[21, 22–24, 25]
4	KAYNVTAQAF	N	266–274	44.44	9.69	0.999	2	0.286	MHC-I покрытие 74%	[20, 22, 24]
5	ATEGALNTPK	N	134–143	40	6.92	0.997	13	0.812	HLA-A*11:01	[23, 25]
6	SPRWYFYLL	N	105–113	44.44	9.44	1	4	0.8	HLA-B*07:02	[22–24, 26]
7	GMSRIGMEV	N	316–324	44.44	6.94	0.999	12	0.522	HLA-DRB1*01:01/HLA-DRB1*04:01/HLA-DRB1*07:01/HLA-DRB1*11:01	[21, 24, 25]
8	ATSRTLSTYYK	M	171–179	20	9.58	0.981	3	0.6	HLA-A*01:01	[23]
Вспомогательные белки										
9	KVSIWNLDY	orf6	23–31	44.44	6.66	0.995	6	0.857	Из консенсусной последовательности CTL/T <sub>H</sub> -лимфоцитов: HLVDFQVTTAEIILLIMR TFKVSINLDDYIINLI	[19, 24, 26]
10	IYIDIGNY	orf8	71–79	33.33	3.14	0.999	1	0.143	—	[19, 24, 26]
Неструктурные белки										
11	VLWANGFEL	Orf1b	1708–1716	66.67	5.17	1	2	0.286	Покровыте 85% мировой популяции	[24, 26]
12	TTDPSFLGRY	Orf1a	1637–1646	30	6.67	0.998	15	0.882	HLA-A*01:01	[23, 24, 25, 26]
13	FTSDYYQLY	Orf3a	207–215	22.22	3.14	0.999	5	1	HLA-A*01:01	[23, 24, 26]
Эпитопы T <sub>H</sub> -лимфоцитов										
14	SYGFQPTNGV-GYQPY	S	494–508	26.67	5.83	—	—	—	Хорошо презентуется комплексом MHCII/MHCII и теоретически предсказан как эпитоп В-клеток; локализация рядом с рецептор-связывающим доменом S-белка	[20]

\* [https://www.peptide2.com/N\\_peptide\\_hydrophobicity\\_hydrophilicity.php](https://www.peptide2.com/N_peptide_hydrophobicity_hydrophilicity.php).\*\* <http://isoelectric.org/index.html>.

\*\*\* Поужирным шрифтом выделены ссылки на данные клинических исследований.



Таблица 2. Характеристики липосом с инкапсулированными пептидами

Образец	Пептиды (обозначение композиции)	Диаметр (нм) $\pm$ $\pm$ SD <sup>1</sup>	PDI $\pm$ SD <sup>1</sup>	Пептиды вне липосом (%) $\pm$ $\pm$ SD <sup>2</sup>	Включение в липосомы, % <sup>5</sup>
Эксперимент I					
L <sub>K</sub>	—	141.4 $\pm$ 2.1	0.047 $\pm$ 0.026	—	—
L <sub>1</sub>	1, 2, 3, 5, 11, 14 (P <sub>1</sub> )	107.5 $\pm$ 0.8	0.096 $\pm$ 0.024	40.4 $\pm$ 1.7 <sup>3</sup>	59.6
L <sub>2</sub>	1, 2, 4, 6, 8, 14 (P <sub>2</sub> )	123.0 $\pm$ 0.6	0.076 $\pm$ 0.009	51.9 $\pm$ 3.3 <sup>3</sup>	48.1
L <sub>3</sub>	5, 7, 10, 11, 12, 14 (P <sub>3</sub> )	113.4 $\pm$ 1.3	0.073 $\pm$ 0.018	57.0 $\pm$ 4.0 <sup>3</sup>	43
L <sub>4</sub>	3, 7, 10, 11, 13, 14 (P <sub>4</sub> )	101.0 $\pm$ 0.8	0.095 $\pm$ 0.004	48.0 $\pm$ 4.9 <sup>3</sup>	52
Эксперимент II					
L <sub>K</sub>	—	193.9 $\pm$ 1.4	0.092 $\pm$ 0.015	—	—
L <sub>1</sub>	1, 2, 3, 5, 11, 14 (P <sub>1</sub> )	201.9 $\pm$ 2.5	0.081 $\pm$ 0.017	66.5 $\pm$ 6.1 <sup>4</sup>	33.5
L <sub>5</sub>	1, 2, 3, 5, 8, 12, 14 (P <sub>5</sub> )	191.7 $\pm$ 1.7	0.080 $\pm$ 0.022	47.2 $\pm$ 7.6 <sup>4</sup>	52.8

<sup>1</sup> По данным измерений на установке Brookhaven 90PLUS Particle Size Analyzer (Brookhaven Instruments Corp., США).

<sup>2</sup> Рассчитано без учета пептидов **6** и **11**, встроенных в мембрану липосом, по формуле: (масса невключившихся пептидов в смывах после ультрафильтрации)/(масса исходно взятых пептидов для инкапсулирования в липосомы)  $\times$  100.

<sup>3</sup> По данным измерения модифицированным методом Лоури невключившихся пептидов в смывах после ультрафильтрации,  $n = 8$ .

<sup>4</sup> По данным измерения оптической плотности при 273 нм в смывах после ультрафильтрации,  $n = 3-5$ .

<sup>5</sup> Рассчитано по формуле: 100 – (пептиды вне липосом).

Для получения высокой загрузки пептидов в липосомы в ходе пассивного инкапсулирования концентрация липидов в водной фазе должна быть максимально высокой. Мы применили методику, описанную в работе [18], где смесь компонентов мембраны липосом лиофилизовали из *трет*-бутанола и затем гидратировали минимальным объемом растворов пептидов, достигая концентрации до 200 мг/мл по липидам. После прохождения нескольких циклов замораживания-оттаивания получается чрезвычайно густая суспензия, которая подвергается многократной экструзии через мембраны с порами 200, а затем 100 нм [18]. Размеры липосом по-разному влияют на эффективность вакцинации в зависимости от способа введения (подкожно, внутримышечно, внутривожно), состава компонентов, этиологии инфекции и т.д. [7–10], и они могут варьировать от 100–150 нм до 1 мкм и более. Поэтому мы проводили экструзию через поры 200 нм с целью получения максимальной эффективности загрузки липосом. Тем не менее размеры полученных липосом оказались значительно меньше заданных (табл. 2, эксперимент I). При концентрации липидов 200 мг/мл (после экструзии за счет потерь на мембране концентрация липидов 140 мг/мл) получить более-менее однородные моноламеллярные везикулы размером порядка 200 нм вряд ли возможно, исходя из стереометрических расчетов. Кроме того, растворенные

пептиды также повлияли на процесс формирования везикул: липосомы без пептидов, контрольные (L<sub>K</sub>), все же чуть крупнее остальных образцов (~141 нм против 101–123 нм). Когда в процедуру получения липосом было внесено изменение – перед экструзией суспензию с концентрацией 200 мг/мл разбавляли в 2 раза, – размеры липосом стали сравнимы с размерами пор 200 нм (табл. 2, эксперимент II).

При определении эффективности включения пептидов в липосомы была использована ультрафильтрация в варианте ступенчатой диафильтрации: дисперсии концентрировали примерно в 2 раза, разбавляли до исходного объема, вновь концентрировали и затем еще дважды повторяли цикл. По данным измерений концентрации невключившихся пептидов в фильтрах с помощью модифицированного метода Лоури [28] либо по оптической плотности в пике поглощения смесей пептидов при 273 нм, эффективность загрузки липосом составила 40–60% от исходно взятого количества пептидов (табл. 2). Важно также отметить, что расчеты проведены без учета пептидов **6** и **11**, которые, вероятнее всего, остаются внедренными в мембрану липосом, и можно считать, что загрузка в липосомы L<sub>1</sub>–L<sub>4</sub> на самом деле выше примерно на 16% (~1/6 часть пептидных композиций).

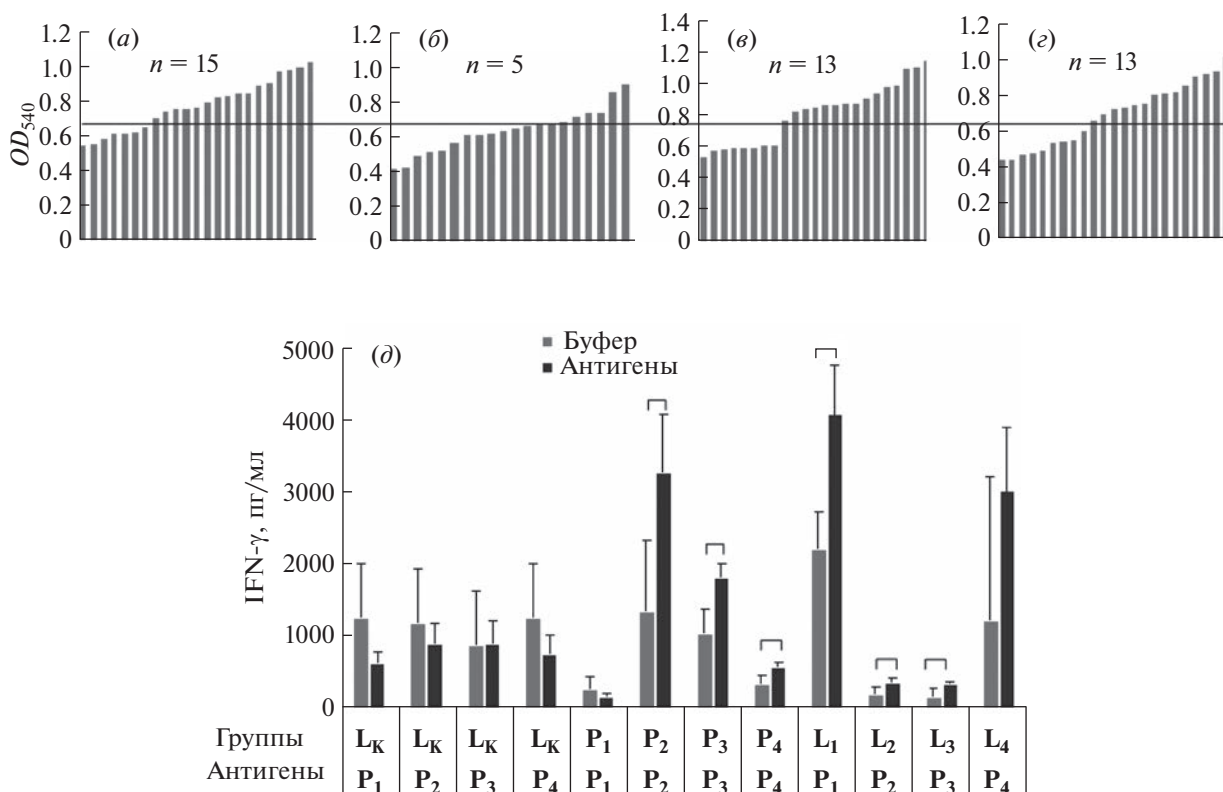
Невысокая загрузка при пассивном инкапсулировании во внутренний водный объем нано-

размерных липосом характерна для растворов любых субстанций в случае отсутствия электростатических либо каких-либо иных специфических взаимодействий с липидной матрицей. Например, в работах [29–31] приведены значения эффективности включения пептидов в липосомы 25–40%. Ограничения включения связаны с малым внутренним объемом липосом и пределом концентрации коллоидного раствора, с одной стороны, и с невысокой растворимостью пептидов в водной фазе – с другой. Авторы [32, 33] определили высокое включение пептидов – более 80% – для липосом размера ~200 нм по флуоресценции BODIPY-меченого пептида после диализа липосомальной дисперсии. Однако по данным других авторов [17], различные пептиды включались в катионные липосомы размера несколько меньше 200 нм лишь с эффективностью 30–40% (несмотря на то, что электростатические взаимодействия должны способствовать загрузке соответствующих пептидов), как показал ВЭЖХ-анализ экстрагированных из липосом пептидов. Причем эффективность включения флуоресцентно-меченых аналогов этих же пептидов варьировала в интервале 9–50% (после ультрафильтрации в таких же концентраторах, какие использованы в нашей работе) [17]. В работе [18] эффективность включения различных по полярности и размерам – от нонамерных до 34-мерных – пептидов в липосомы из соевого лецитина и холестерина диаметра 130–140 нм составила 54–92% по данным флэш-гель-хроматографии (невключившиеся пептиды в элюате определяли по поглощению при 223 нм). Судя по приведенным данным публикаций, различные методы анализа эффективности загрузки липосом пептидами могут давать противоречивые результаты. При получении субъединичных вакцин неключившиеся антигены (белки, пептиды) обычно не отделяют, чтобы избежать потерь целевого материала за счет сорбции при очистке методами гель-фильтрации или ультрафильтрации/диафильтрации и последующей необходимости концентрирования [18, 29–33]. Технологичный в плане потерь метод тангенциальной фильтрации не применим при работе с аналитическими количествами растворов, как в нашем случае [34]. Поэтому мы не отделяли неключившиеся пептиды от липосом в расчете на получение достоверного биологического эффекта от инкапсулирования в липосомы какой-либо из композиций пептидов.

**Оценка специфической эффективности композиций пептидов и липосомальных формуляций.** Поскольку отбор пептидов осуществлен на основе известных Т-клеточных эпитопов человека, требовалось оценить возможность их распознавания Т-клетками мышей. С этой целью спленоциты интактных мышей инкубировали 7 дней с пептидными композициями  $P_1$ – $P_4$ . В состав клеток

селезенки входит ~20–25%  $CD4^+$ -Т-клеток, 10–13%  $CD8^+$ -Т-клеток, 35–40% В-клеток, 4–7% натуральных киллеров и 5–8% макрофагов. Макрофаги относятся к APC и могут представлять антигены Т-клеткам. Среди Т-клеток специфических клонов мало, в связи с чем анализ проводили для 1 млн спленоцитов в каждой лунке и в 24 повторностях, что позволяет оценить частоту специфических клонов среди 24 млн клеток. На рис. 1а–1г приведены данные по распознаванию композиций пептидов  $P_1$ – $P_4$  спленоцитами интактных мышей. В качестве контроля использовали аналогичное количество клеток без антигенов. За вычетом пролиферации спленоцитов без добавления пептидов в группах  $P_1$ – $P_4$  выявили 15, 5, 13 и 13 положительных клонов соответственно (рис. 1а–1г). Эти данные позволяют предположить, что часть отобранных пептидов может распознаваться Т-клетками мышей. Соответственно, полученные формуляции мы использовали для иммунизации мышей.

Для оценки иммуногенности полученных пептидных и липосомальных формуляций  $P_1$ – $P_4$ ,  $L_1$ – $L_4$  мышам линии C57BL/6 препараты вводили в подушечку задней лапы 2 раза с интервалом в 3 недели. Через неделю после последней иммунизации забирали селезенки и культивировали спленоциты с соответствующими пептидными композициями ( $P_1$ – $P_4$ ) в течение 24 ч. Активацию клеточного звена иммунитета оценивали по уровню синтеза IFN- $\gamma$  в супернатантах спленоцитов иммунизированных мышей. На рис. 1д  $L_K$  соответствует группе контроля, которой вводили липосомы, не несущие пептидов, но содержащие CpG-ODN. Поскольку такие липосомы могут быть иммуностимуляторами врожденного иммунитета, анализ продукции IFN- $\gamma$  проводили при культивировании со всеми пулами пептидов  $P_1$ – $P_4$ . Действительно, в ответ на иммунизацию  $L_K$  спленоциты отвечали продукцией IFN- $\gamma$ , однако специфического ответа на пептиды не было. Дополнительно в исследование включали группу, иммунизированную буфером на основе сахарозы, в котором вводили липосомальные формуляции с пептидами. В этой группе продукция IFN- $\gamma$  была значительно ниже (данные не приведены). В группах мышей, иммунизированных пептидными композициями и липосомальными формуляциями с пептидами, наблюдали антиген-специфическую продукцию IFN- $\gamma$  при иммунизации пептидными композициями  $P_2$ ,  $P_3$ ,  $P_4$  и всеми липосомальными формуляциями. Максимальные ответы наблюдали в группах  $P_2$ ,  $P_3$ ,  $L_1$  и  $L_4$ . Однако в группе  $L_4$  наблюдалась значительная вариабельность в ответе на буфер, что привело к отсутствию достоверных отличий с ответом на пептиды. В целом, полученные результаты свидетельствуют о формировании специфиче-



**Рис. 1.** Характеристика иммунного ответа на композиции пептидов  $P_1$ – $P_4$  и их липосомальные формуляции  $L_1$ – $L_4$ . (a–d) – Спонтанная пролиферация (МТТ-метод) спленоцитов ( $10^6$ /лунку) интактных мышей в ответ на композиции  $P_1$  (a),  $P_2$  (б),  $P_3$  (в) и  $P_4$  (г); среднее значение + стандартное отклонение пролиферации спленоцитов без добавления антигенов отмечено линией;  $n$  – число позитивных клонов; (д) – продукция *in vitro* IFN- $\gamma$  спленоцитами мышей, иммунизированных различными препаратами, в ответ на специфические антигены  $P_1$ – $P_4$ . Достоверные отличия ( $p < 0.05$ , критерий Манна–Уитни) отмечены скобками.

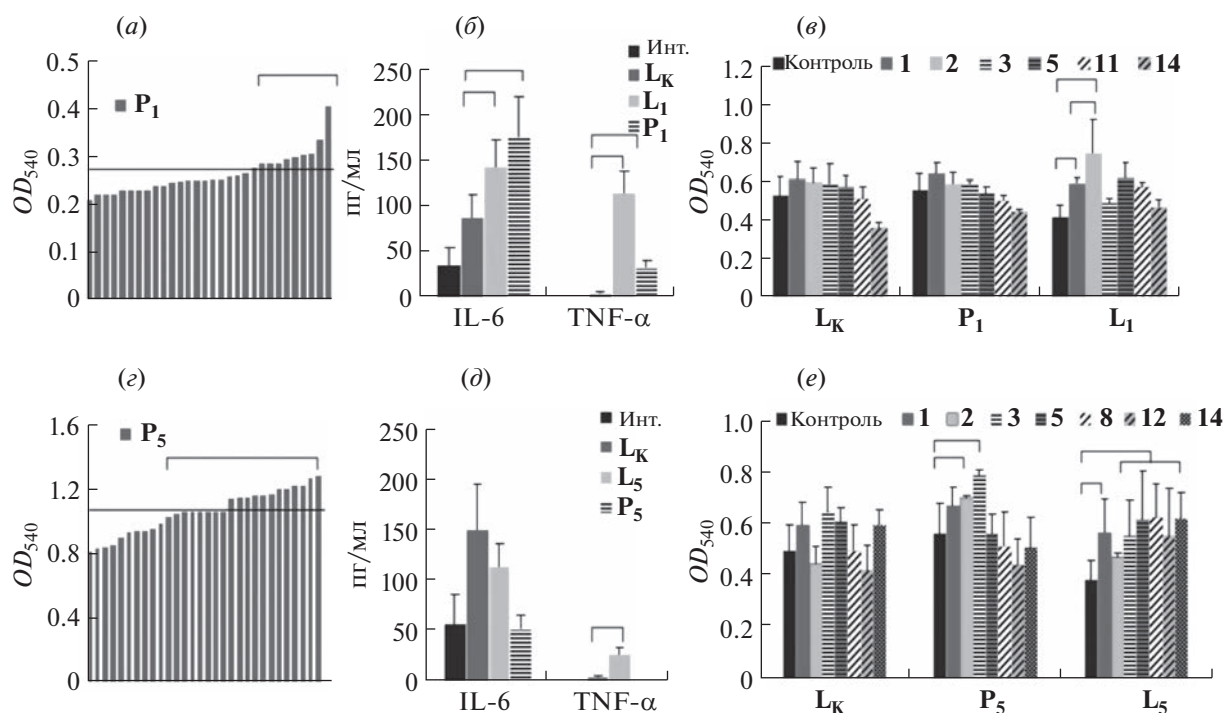
ского клеточного иммунитета в ответ на вакцинацию липосомальными формуляциями  $L_1$ – $L_4$ , а также пептидными композициями  $P_2$ – $P_4$  (рис. 1д).

Как было показано ранее, подкожная вакцинация трансгенных мышей против коронавируса SARS-CoV липосомами с ковалентно связанными пептидами — нонамерными СТL-эпитопами вирусного нуклеокапсида (N-белка) [15] и полипротеина 1a (pp1a) [16], рестриктированными HLA-A\*0201, индуцировала образование антиген-специфических CD8<sup>+</sup>-Т-клеток. Также при вакцинации трансгенных мышей липосомами с инкапсулированными нонамерными Т-эпитопами вируса гепатита С и CpG-ODN авторы получили продукцию IFN- $\gamma$  в тесте ELISPOT около 2000 пг/мл [33]. А в работе [18], при исследовании кандидатной пептидной вакцины против гриппа типа А на свиньях, уровень IFN- $\gamma$ , продуцируемого фракцией мононуклеарных клеток периферической крови, достигал 1000–1500 пг/мл (в тесте ELISA). В связи с этим результаты, полученные для формуляции  $L_1$ , можно считать сопоставимыми и перспективными для иммунизации с точки зрения получения Т-клеточного ответа.

Для дальнейшей работы была отобрана формуляция  $L_1$ , для которой была выявлена достоверная разница между контролем и ответом *in vitro* на антиген. Из композиций  $P_2$  и  $P_3$  в следующем цикле экспериментов были отобраны пептиды для составления новой формуляции  $L_5$ .

При составлении новой пептидной композиции  $P_5$  за основу был взят состав композиции  $P_1$ , с изменениями: вместо пептида **11** были введены пептиды **8** и **12**. Последние входили в состав композиций  $P_2$  и  $P_3$  (рис. 1д), которые проявили иммуногенность при вакцинации нелипосомальными растворами в первом цикле экспериментов. Таким образом, в липосомальной формуляции  $L_5$  пептиды в липидный бислой не включались, и эффективность загрузки липосом составила 52.8% (табл. 2).

Анализ распознавания пептидов интактными спленоцитами провели для формуляции  $P_5$ , а также  $P_1$  в качестве контроля. Результаты подтвердили ранее полученные данные о совместимости части из отобранных пептидов с молекулами МНС мышей (рис. 2а, 2г).



**Рис. 2.** Характеристика иммунного ответа на композиции пептидов  $P_1$  и  $P_5$  и липосомальные формуляции  $L_1$  (а–в) и  $L_5$  (г–е). Спонтанная пролиферация спленоцитов ( $10^6$ /лунку) интактных мышей в ответ на композиции  $P_1$  (а) и  $P_5$  (г); среднее + стандартное отклонение значения пролиферации спленоцитов без антигенов обозначено линией; позитивные клоны отмечены скобками. Концентрация IL-6 и TNF- $\alpha$  в сыворотках мышей, иммунизированных препаратами  $L_K$ ,  $L_1$  или  $P_1$  (б),  $L_K$ ,  $L_5$  или  $P_5$  (д); Инт. – интактный контроль. Пролиферация спленоцитов мышей, иммунизированных препаратами  $L_K$ ,  $L_1$  или  $P_1$  (в),  $L_K$ ,  $L_5$  или  $P_5$  (е), в ответ на индивидуальные пептиды. Достоверные отличия ( $p < 0.05$ , критерий Манна–Уитни) отмечены скобками.

Далее полученные формуляции использовали для иммунизации мышей. Сыворотки собирали через неделю после второй иммунизации и оценивали уровень цитокинов в крови. Для анализа использовали мультиплексный тест, включавший 10 цитокинов (IFN- $\gamma$ , интерлейкины 2, 4, 6, 9, 10, 13, 17, 22 и TNF- $\alpha$ ). Среди 10 цитокинов в сыворотке зарегистрировали только три: IFN- $\gamma$ , IL-6 и TNF- $\alpha$ . Уровень IFN- $\gamma$  в крови был низким (данные не приведены). Иммунизация формуляциями  $P_1$  и  $L_1$  привела к повышению уровня как IL-6, так и TNF- $\alpha$  (рис. 2б) по сравнению с их уровнем в крови интактных мышей и контрольной группы  $L_K$ . Иммунизация формуляцией  $L_5$  также вызывала повышение уровней IL-6 и TNF- $\alpha$  (рис. 2д), но в меньшей степени, чем в случае  $L_1$ .

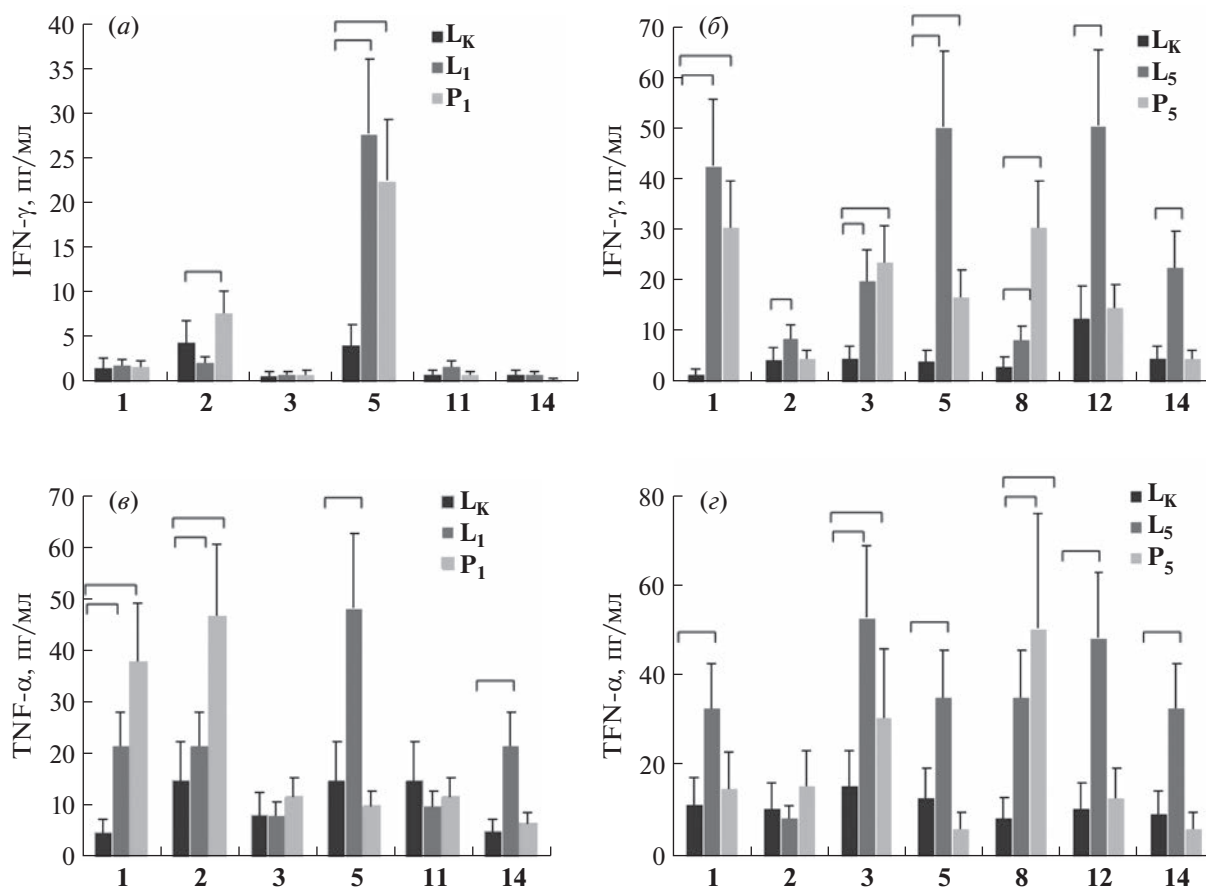
Спленоциты иммунных мышей стимулировали *in vitro* индивидуальными пептидами. Общие для всех препаратов пептиды 1, 2, 3 и 5 распознавались спленоцитами после иммунизации липосомами  $L_1$  (рис. 2в),  $L_5$  и композицией пептидов  $P_5$  (рис. 2е). При иммунизации липосомами  $L_5$  распознавались также пептиды 8, 12 и 14. В целом при иммунизации липосомальными формуляциями Т-клеточный ответ формировался эффек-

тивнее, чем при иммунизации композициями пептидов.

Уровень цитокинов в надосадочных средах спленоцитов иммунных мышей при стимуляции индивидуальными пептидами анализировали с помощью мультиплексного метода. Как и в сыворотке крови, из 10 факторов выявили только три: IFN- $\gamma$ , IL-6 и TNF- $\alpha$ . Общий уровень IFN- $\gamma$  был значительно ниже, чем в первом эксперименте, что можно объяснить различием методов определения. В первом эксперименте использовали иммуноферментную систему для определения концентрации IFN- $\gamma$ , во втором случае использовали мультиплексный цитометрический анализ. Продукция IL-6 не коррелировала с антиген-специфическим ответом (данные не приведены). Продукция IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  представлена на рис. 3.

Т-клетки в ответ на пептиды 1, 2, 5 и 14 в группе мышей, иммунизированных липосомами  $L_1$ , и на все пептиды из формуляции  $L_5$ , за исключением пептида 2, продуцировали IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  (рис. 3).

Высокогидрофобный пептид 11 из неструктурного белка Orf1b (табл. 1) был отобран по результатам клинических исследований, хотя ча-



**Рис. 3.** Продукция *in vitro* IFN- $\gamma$  (а, б) и TNF- $\alpha$  (в, з) спленоцитами мышей, иммунизированных контрольными липосомами  $L_K$ , композициями пептидов  $P_1$  и  $P_5$  и липосомальными формуляциями  $L_1$  и  $L_5$ , в ответ на специфические пептиды. Достоверные отличия ( $p < 0.05$ , критерий Манна–Уитни) отмечены скобками.

стота иммунных ответов в мультиплексном тесте по идентификации антигенной специфичности Т-клеточных рецепторов была не столь высока (2 ответа из семи) [24, 26]. Судя по выработке IFN- $\gamma$  спленоцитами иммунизированных конвенциональных мышей, не все композиции с пептидом **11** проявили иммуногенность (например,  $L_3$ , рис. 1а). Кроме того, этот пептид не вызывал значительного усиления пролиферации спленоцитов по сравнению с остальными пептидами композиции  $P_1$ , в отличие от пептида **2** белка вирусной оболочки E (рис. 2в), и не распознавался Т-клетками в мультиплексном варианте анализа (рис. 3а, 3в). Тем не менее при замене в композиции пептида **11** на два гидрофильных пептида (пептиды **8** из М-белка и **12** из неструктурного Orf1b) в сыворотках иммунизированных мышей уровень цитокинов IL-6 и TNF- $\alpha$  уменьшился (ср. рис. 2б и 2д). Поэтому для исследования протективной эффективности на инфекционной модели мышей hACE2 была выбрана липосомальная формуляция  $L_1$ .

**Проверка протективной эффективности формуляции  $L_1$  на инфекционной модели мышей.** Одной из характеристик эффекта вакцинации является протективный эффект. Для его оценки использовали генномодифицированных мышей линии C57BL/6JtgTn(CAG-human ACE2-IRES-Luciferase-WPRE-polyA) (сокращенно hACE2), несущих гуманизированный рецептор ангиотензин-превращающего фермента-2 (ACE2), обеспечивающего проникновение в клетку штаммов коронавируса SARS-CoV-2, а также вирусов NL63 и SARS-CoV. Данная модель мышей может использоваться в исследованиях протективной эффективности препаратов, предназначенных для профилактики и лечения коронавирусной инфекции COVID-19 [35].

В настоящей работе проведена двукратная иммунизация самцов мышей hACE2 с интервалом в 21 день липосомами  $L_1$  ( $n = 6$ ) и контрольными липосомами  $L_K$  ( $n = 4$ ). По истечении двух недель после второй иммунизации мышей заражали летальной дозой (3 lg БОЕ) SARS-CoV-2 (уханьский штамм).

Среднее время жизни до гибели в группах не отличалось. После заражения вирусом все животные погибли в течение 4–5 дней (контрольную группу иммунизировали буфером,  $n = 3$ ). Отсутствие различий в продолжительности жизни у самцов мышей различных групп объясняется, вероятно, изначально высокой дозой заражения SARS-CoV-2.

У всех мышей забирали легкие и проводили гистологический анализ. Результаты патоморфологического исследования легких зараженных мышей показали, что в контроле без лечения в легких мышей hACE2, зараженных уханьским штаммом SARS-CoV-2 в дозе 3 Ig БОЕ, отмечалось диффузное выраженное полнокровие крупных сосудов, а также сосудов микроциркуляторного русла с явлениями стаза и сладжа эритроцитов (рис. 4а, 4б). В стенках и в просвете альвеол отмечали, как правило, умеренную диффузную мононуклеарную инфильтрацию с примесью многочисленных нейтрофилов. В просвете отдельных альвеол в разных долях органа встречались гиалиноподобные мембраны и трансудат. В просвете большинства бронхов обращало на себя внимание выраженное слущивание респираторного эпителия с начальным разрушением целостности стенки бронхов.

У животных, иммунизированных липосомами  $L_K$  во всех долях легких не обнаруживали трансудат в легочных ацинусах (рис. 4в, 4г). Кроме того, у 3 из 4 животных отсутствовали выраженные микроциркуляторные нарушения и полнокровие крупных сосудов легких. У 2 из 4 самцов мышей данной группы отмечали снижение степени альтерации респираторного эпителия бронхов. Гиалиноподобные мембраны в данной группе животных встречались в 3 из 4 случаев со средним оценочным баллом 1.25 против 2.00 у самцов мышей без лечения. При этом выраженность мононуклеарной и нейтрофильной инфильтрации стенок и просвета альвеол была сопоставимой с таковой

среди животных, не получавших лечения и профилактической иммунизации.

На фоне иммунизации животных препаратом  $L_1$  выраженных микроциркуляторных нарушений в легких не обнаруживали в 2/3 случаев, средний оценочный балл по данному признаку соответствовал 3.17 против 4.00 у животных без терапии (рис. 4д, 4е). Гиалиноподобные мембраны среди животных, получавших  $L_1$ , также встречались реже (1.33 против 2.00 соответственно). Однако по остальным признакам каких-либо отличий от “фонового” течения заболевания не наблюдали.

Таким образом, введение липосом – как контрольных, так и с пептидами – улучшало состояние легочной функции, хотя и не предупреждало гибель животных, что связано с использованием летальной дозы вируса. Определенный протективный эффект липосом, как частиц, сравнимых по размеру с вирусами, связан, по-видимому, с активацией врожденной иммунной системы. Поскольку основной задачей была индукция адаптивного иммунитета с помощью специфических пептидов, отсутствие эффекта связано с быстро протекающим инфекционным процессом. Меньший эффект пептидной формуляции липосом по сравнению с контрольными липосомами может быть связан с активацией адаптивного иммунитета, на что расходуются энергетические ресурсы организма. Для выявления роли адаптивного иммунитета в дальнейшем следует использовать сублетальные дозы вируса.

**Липосомальные формуляции длительного хранения.** Формуляции липосом  $L_1$  и  $L_5$  исследовали на возможность получения препаратов длительного хранения. Дисперсии липосом подвергали лиофилизации, а затем восстанавливали регидратацией соответствующим объемом воды. Данные о размерах липосом до лиофилизации и после восстановления, а также о содержании в них пептидов представлены в табл. 3.

**Таблица 3.** Характеристики образцов липосом до и после лиофилизации

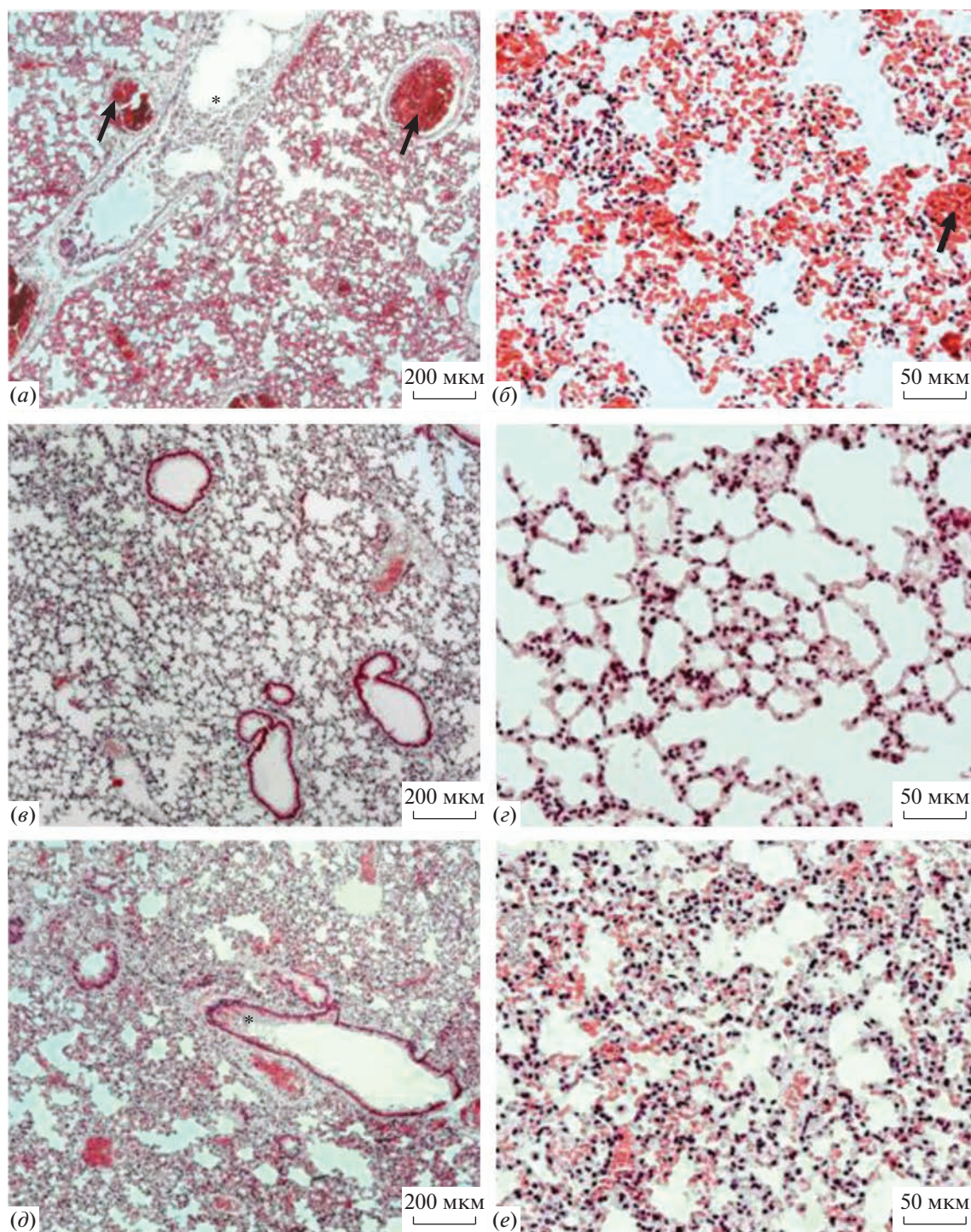
Образец	До лиофилизации			После лиофилизации и регидратации		
	диаметр (нм) $\pm$ $\pm$ SD <sup>1</sup>	PDI $\pm$ SD <sup>1</sup>	включение в липосомы, % <sup>2</sup>	диаметр (нм) $\pm$ $\pm$ SD <sup>1</sup>	PDI $\pm$ SD <sup>1</sup>	включение в липосомы, % <sup>2</sup>
$L_K$	211.3 $\pm$ 2.1	0.103 $\pm$ 0.022	–	187.9 $\pm$ 0.6	0.093 $\pm$ 0.028	–
$L_1$	220.6 $\pm$ 1.7	0.114 $\pm$ 0.029	33.5 <sup>3</sup>	188.9 $\pm$ 1.7	0.099 $\pm$ 0.028	49.2 <sup>3</sup>
$L_5$	212.0 $\pm$ 1.3	0.088 $\pm$ 0.026	52.8	185.3 $\pm$ 1.5	0.070 $\pm$ 0.022	51.9

<sup>1</sup> По данным измерений на установке Brookhaven 90PLUS Particle Size Analyzer (Brookhaven Instruments Corp., США).

<sup>2</sup> Рассчитано по формуле:  $100 - (\text{пептиды вне липосом})$ . По данным измерения оптической плотности при 273 нм в смывах после ультрафильтрации,  $n = 3-5$ .

<sup>3</sup> Рассчитано без учета пептида **11**, встроенного в мембрану липосом.



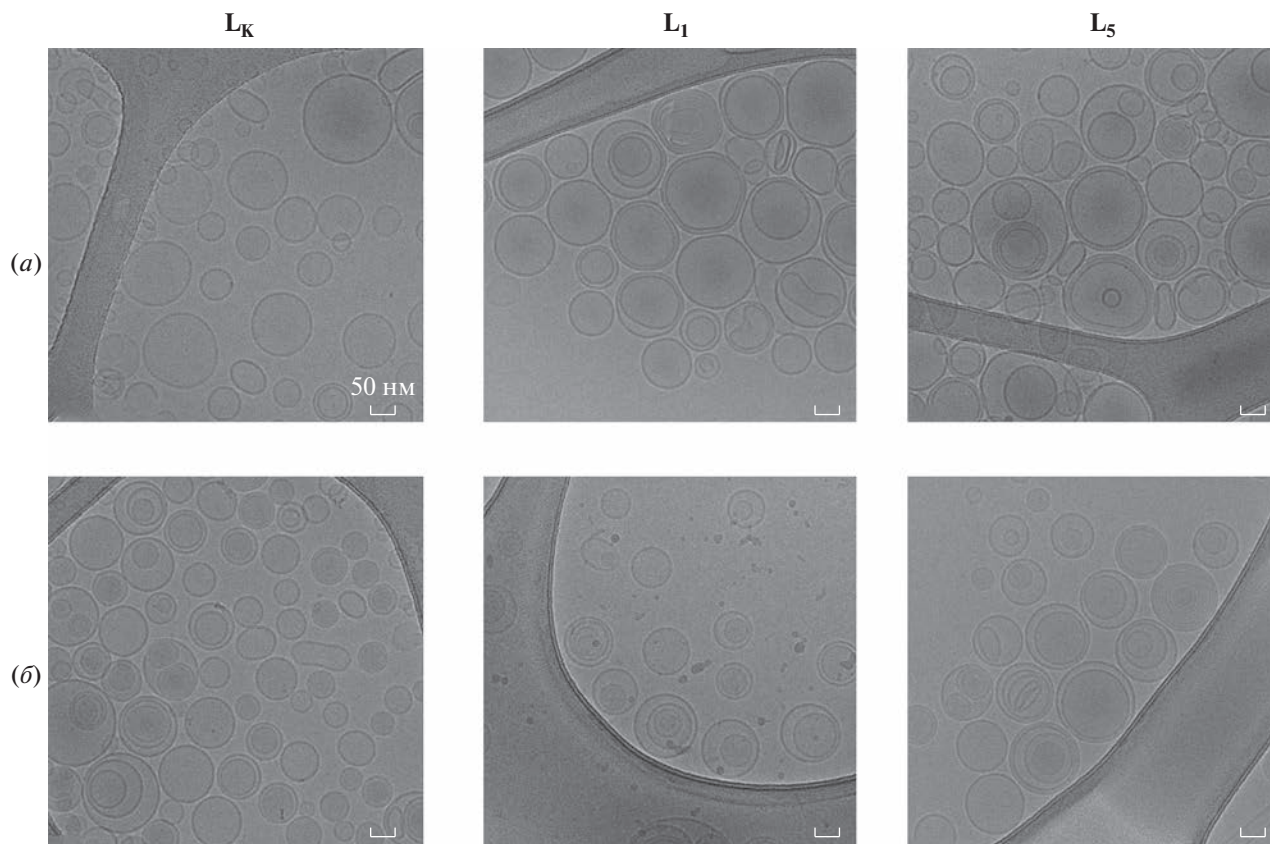


**Рис. 4.** Гистология легких трансгенных мышей hACE2, зараженных уханьским штаммом SARS-CoV-2 в дозе 3 lg БОЕ без лечения (*a, б*) и на фоне иммунизации с введением контрольных липосом  $L_K$  (*в, г*) и формуляции  $L_I$  (*д, е*). Диффузное полнокровие крупных сосудов с явлениями стаза и сладжа эритроцитов отмечено стрелками, слипание респирационного эпителия с начальным разрушением целостности стенки бронхов – звездочками. Шкала соответствует 200 (*a, в, д*) и 50 (*б, г, е*) мкм. Окрашивание гематоксилином и эозином.

Можно заключить, что после лиофилизации обе формуляции липосом не претерпели значительных изменений размеров. Содержание же инкапсулированных пептидов в образце  $L_I$  суще-

ственно увеличилось. Мы предположили, что такое изменение может быть связано с нарушением целостности мембраны липосом при лиофилизации/регидратации и перераспределением пепти-





**Рис. 5.** Криоэлектронные микрофотографии контрольных липосом  $L_K$  и липосомальных формуляций пептидов  $L_1$  и  $L_5$  до (а) и после лиофилизации и регидратации (б). Масштабный отрезок 50 нм.

дов между липосомами и раствором неинкапсулированных пептидов. Структуру липосом анализировали с помощью криогенной просвечивающей электронной микроскопии (рис. 5).

Действительно, в образце  $L_1$  в ходе лиофилизации/регидратации от липосом отделяются мелкие частицы, вероятнее всего, сгустки-осадки гидрофобного пептида **11** (рис. 5б, центр). Возможно, данный пептид изначально присутствовал в липидном бислое в виде агрегатов, которые и высаживаются как достаточно крупные образования, наблюдаемые на изображениях, полученных в электронном микроскопе. Для липосом  $L_5$ , которые содержат только водорастворимые пептиды, отдельных невезикулярных частиц не наблюдается. Таким образом, лиофилизация в данном случае является подходящим методом для длительного хранения вакцинных конструкций.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы и реагенты.** Пептиды получены твердофазным синтезом с применением стратегии Fmoc/*трет*-бутил на тритилхлорид-полистирольном полимере как описано ранее [36]. Оли-

гонуклеотид CpG-ODN 1826 (TCCATGAC-GTTCCTGACGTT), специфический для TLR9 мышей, любезно предоставлен д-ром В.А. Гуциным (“НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи”). Использовали фосфатидилхолин из яичного желтка (ePC, Lipoid E PC S) и холестерин (Chol) производства Lipoid GmbH (Heidelberg, ФРГ) квалификации USP (United States Pharmacopoeia); сахарозу и этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA) производства Panreac (USP, Испания); сефарозу CL-4B (Pharmacia, США);  $Na_2HPO_4$ ,  $NaH_2PO_4$  и  $KH_2PO_4$  квалификации ACS (Хеликон, Россия); остальные реагенты производства фирм Sigma и Flow Laboratories (США). Растворители очищали стандартными методами; упаривание проводили в вакууме при температурах не выше  $40^\circ C$ .

**Получение липосомальных формуляций пептидов.** Индивидуальные пептиды в виде солей с трифторуксусной кислотой растворяли (кроме пептидов **6** и **11**) в фосфатном буфере с изотоническим раствором сахарозы PB-Suc, pH 7.2 (6.25 mM  $Na_2HPO_4$ , 1.3 mM  $NaH_2PO_4$ , 1.2 mM  $KH_2PO_4$ , 1 mM EDTA, 240 mM сахароза,  $H_2O_{dd}$ ). Затем готовили растворы смесей пептидов, где конечная концентрация каждого из пептидов составляла 1 mM (со-

став композиций см. в табл. 2) и, при необходимости, титровали 1 н. NaOH до pH ~ 6.3–7.0. Растворы замораживали в жидком азоте (–196°C) и хранили при –20°C до применения.

Яичный фосфатидилхолин и холестерин растворяли в *трет*-бутаноле в мольном соотношении 67 : 33. В случае формуляций L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> и L<sub>4</sub> в *трет*-бутанольный раствор липидов добавляли 0.5 мкмоль пептидов **11**, **6**, **11** и **11** соответственно. Растворы замораживали и лиофилизировали в течение 12 ч при давлении ~3 Па (лиофильная сушилка ИНЕЙ-4; ИБП РАН, Россия). Лиофилизированные липидно-пептидные смеси гидратировали растворами пептидных композиций в течение 2 ч при периодическом встряхивании. После гидратации суспензию липосом, 200 мг/мл по липидам, подвергали 10-кратной процедуре замораживания (–196°C) – оттаивания (водяная баня, 40°C) – встряхивания (вортекс FV-2400, Biosan, Латвия), разбавляли в 2 раза буфером PB-Suc и продавливали последовательно по 10 раз через поликарбонатные мембранные фильтры Whatman Nuclepore (Cytiva, США) с размерами пор 400 и 200 нм на установке Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids, США). Концентрацию ePC в липосомальных дисперсиях определяли с помощью ферментативного колориметрического метода (набор Phospholipids, Sentinel Diagnostics, Италия): 3 мкл образца и 150 мкл рабочего раствора (фосфолипаза D, >1500 ед./л; холиноксидаза, >7500 ед./л; 4-аминоантипирин, 1.2 мМ; пероксидаза, >7000 ед./л; TES-буфер, 50 мМ, pH 7.6; гидроксибензойная кислота 12 мМ; EDTA, 1.3 мМ; азид натрия, <0.1%) добавляли в лунку 96-луночного планшета, инкубировали при 37°C 10 мин и измеряли оптическую плотность при 540 нм с помощью микропланшетного фотометра Multiscan FC (ThermoFisher Scientific, США); количество ePC в образцах определяли по калибровочной кривой для дисперсий ePC в PB-Suc. Для получения контрольных липосом L<sub>K</sub> лиофилизированную смесь ePC–Chol (67 : 33, мольн.) гидратировали буфером PB-Suc и проводили экструзию, как описано выше.

Размер липосом определяли методом динамического лазерного светорассеяния на установке Brookhaven 90PLUS Particle Size Analyzer (Brookhaven Instruments Corp., США). Проводили по меньшей мере 3 измерения разбавленных дисперсий липосом (50 мкг липидов/мл PBS) с использованием гелий-неонового лазера,  $\lambda = 633$  нм, под углом 90°, 3 цикла по 1 мин. Липосомальные формуляции в концентрациях, использованных для вакцинаций (~40 мг/мл по суммарным липидам), сохраняли стабильность не менее трех недель при 4–8°C.

**Определение количества невключившихся в липосомы пептидов.** Образцы липосомальных фор-

муляций L<sub>1</sub> и L<sub>5</sub> (500 мкл, ~8.5 мг/мл липидов) разбавляли в 2 раза буфером PB-Suc и помещали в предварительно промытые H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> концентраторы Vivaspin 2 (300000 MWCO, Sartorius, ФРГ). Центрифугировали 35 мин при 2300 об/мин, ~1000 g (СМ-6М, ELMi, Латвия). Затем измеряли оптическую плотность в прошедшем объеме буфера (~400–500 мкл) при 273 нм (СФ-2000, ОКБ-Спектр, Россия). Описанные этапы промывки и измерений проводили 3 раза. Молярные коэффициенты экстинкции смесей пептидов, рассчитанные по Tug, составили 1536 и 1646 M<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> для композиций P<sub>1</sub> (без гидрофобного пептида **11**) и P<sub>5</sub> соответственно. Суммировали количество свободных пептидов в трех фильтрах.

При определении количества пептидов в сыворотках по Лоури [28] в образцах L<sub>1</sub>–L<sub>4</sub> для построения градуировочной функции готовили растворы смесей соответствующих пептидов (P<sub>1</sub>–P<sub>4</sub>). При использовании для этой цели стандартных растворов альбумина получали завышенные (до 3 раз) значения концентраций пептидов.

**Криогенная просвечивающая электронная микроскопия.** Для подготовки образцов использовали медные поддерживающие сетки с отверстиями в аморфной пленке углерода (Lacey C only, 01895-F/01896-F, Ted Pella, США), гидрофилизированные в тлеющем разряде на установке PELCO easiGlow (Ted Pella, США) при следующих условиях: время обработки образца – 25 с, сила тока – 0.20 мА, остаточное давление в камере – 0.26 мбар. На сетку наносили 3 мкл образца и с помощью автоматизированной системы Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США) удаляли фильтровальной бумагой излишки раствора в течение 2.5 с при влажности в камере 95–100% и температуре 4°C, затем проводили витрификацию. Образцы исследовали с помощью криогенного просвечивающего электронного микроскопа Titan Krios 60-300 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США), оборудованного устройством прямого детектирования электронов Falcon II и корректором сферических аберраций CEOS Image Corrector, работающего под управлением программного обеспечения EPU. Основные параметры получения данных: ускоряющее напряжение 300 кВ, номинальное увеличение 37000×, время экспозиции 4 с, дефокусировка от –3 до –5 мкм.

**Иммунизация мышей.** Самок мышей линии C57BL/6 весом 18–20 г, полученных из питомника “Столбовая” (Россия), содержали в конвенционных условиях без ограничения в воде и корме. Все исследования и процедуры по рутинному уходу за животными проводили в соответствии с Международными руководящими принципами биомедицинских исследований на животных в ФГБУ “НИЦЭМ им Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России, протокол Комитета по био-

медицинской этике № 5 от 19.03.2021, и в ИБХ РАН, протокол Институтской комиссии по контролю за содержанием и использованием животных № 325 от 24.05.2021.

Формуляции  $L_1-L_5$ , пептидные композиции  $P_1-P_5$  и контроль PB-Suc вводили в подушечки задних лап по 50 мкл в каждую 2 раза с интервалом в 21 день. Общее содержание пептидов в дозе – 120–130 мкг. Все препараты, кроме контроля PB-Suc, содержали иммуностимулятор CpG-ODN, 75 мкг. В каждой группе было по семь мышей. Через неделю после второй иммунизации у мышей под изофлурановым наркозом забирали кровь из орбитального синуса в гепаринизированные пробирки, получали плазму, которую хранили замороженной до анализа. Мышей умерщвляли методом цервикальной дислокации, стерильно забивали селезенки.

**МТТ-анализ пролиферации спленоцитов.** Селезенки интактных или иммунных мышей гомогенизировали в физиологическом растворе, центрифугировали при 1000 об/мин 7 мин, осадок обрабатывали 0.83%-ным хлористым аммонием для лизирования эритроцитов, отмывали в физиологическом растворе дважды центрифугированием и переводили в культуральную среду на основе RPMI-1640 с добавлением 7% фетальной телячьей сыворотки, пенициллина-стрептомицина-глутамин (ПанЭко, Россия). Спленоциты вносили в плоскостонные 96-луночные планшеты в количестве  $10^6$  кл./лунку в 200 мкл среды. В лунки вносили антигены в количестве 20–30 мкг. Планшеты инкубировали 72 ч. В течение последних 3 ч в каждую лунку добавляли по 10 мкл МТТ (5 мг/мл). После инкубации культуральную среду удаляли и в каждую лунку добавляли 100 мкл ДМСО. Планшеты инкубировали при встряхивании в течение 15 мин для растворения формазана. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Titertek (Великобритания) при 540 нм. Результаты анализировали с помощью пакета Excel (Microsoft). Данные приведены в виде оптической плотности (*OD*).

**Анализ спонтанного ответа на пептиды.** Для оценки распознавания отобранных пептидов спленоцитами мышей ставили 24 или 48 реплик спленоцитов, полученных от одной мыши, с антигенами (смеси пептидов  $P_1, P_2, P_3, P_4, P_5$ ) в концентрации 160 мкг/мл и без антигенов (контроль), как описано выше.

**Анализ антиген-специфического ответа после иммунизации мышей препаратами  $P_1-P_4$  и  $L_1-L_4$  (эксперимент I).** Определение концентрации IFN- $\gamma$ , продуцируемого спленоцитами в ответ на стимуляцию пептидными композициями  $P_1-P_4$ , проводили с использованием IGRA-теста (interferon-gamma release assay) в соответствии с описанной

методикой [37]. Спленоциты засеивали в плотности  $10^7$  кл./мл в 100 мкл ростовой культуральной среды RPMI-1640 с добавлением 2 mM L-глутамин, 10% фетальной телячьей сыворотки, 1x антибиотика-антимикотика, 0.05 mM 2-меркаптоэтанола (ПанЭко, Россия). Клетки инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, влажность 100% в течение 1.5–2 ч. В лунки вносили антигены  $P_1, P_2, P_3, P_4$  в концентрации 10 мкг/мл, положительный контроль конканавалин А (10 мкг/мл), отрицательный контроль (PB-Suc). Каждую опытную группу стимулировали соответствующей композицией пептидов, группы контроль PB-Suc и  $L_K$  стимулировали отдельно каждой композицией пептидов. Каждую группу также стимулировали положительным и отрицательным контролями. Стимуляцию проводили в двух повторностях.

Культуральные планшеты инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе 20 ч, отбирали культуральную среду и определяли в ней концентрацию IFN- $\gamma$  (пг/мл) с использованием коммерческого набора IFN gamma Mouse ELISA Kit (Thermo Fisher, США) согласно инструкции производителя.

**Анализ антиген-специфического ответа на пептиды (эксперимент II).** Для оценки ответа на пептиды пролиферацией и продукцией цитокинов спленоциты иммунизированных мышей каждой группы ( $n = 7$ ) стимулировали пептидами, входящими в состав соответствующей формуляции, в дозе 25–45 мкг. Эксперименты ставили в трех повторностях на каждый пептид. Через 24 ч из лунок забирали по 50 мкл, переносили их в новые планшеты, планшеты хранили при –60°C до анализа. В качестве контроля использовали спленоциты интактных мышей, мышей, иммунизированных буфером PBSuc или контрольными липосомами  $L_K$ . Анализ пролиферации проводили через 72 ч, как описано выше.

**Комплексный анализ цитокинов (эксперимент II).** Стандартную панель магнитных бус для анализа цитокинов мыши: IFN- $\gamma$ , IL-2, 4, 6, 9, 10, 13, 17, 22 и TNF- $\alpha$  (Biolegend, США) – использовали для анализа белков в плазме крови и надосадках спленоцитов по протоколу производителя с использованием проточного цитометра MACSQuant Tygo Sorter (Miltenei, Германия).

**Статистический анализ.** Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Excel и *t*-критерия Стьюдента. Значения сравнения при  $p < 0.05$  считали статистически значимыми.

**Проверка протективной эффективности формуляции  $L_1$ .** В работе использовали самцов гуманизированных мышей C57BL/6-TgTn(CAG-humanACE2-IRES-Luciferase-WPRE-polyA) в воз-

расте 14–16 недель. Животных содержали в стандартных условиях Питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (Уникальная научная установка “Био-модель” ИБХ РАН), имеющего международную аккредитацию AAALACi. Все эксперименты и манипуляции были одобрены Институтской комиссией по уходу и использованию животных (№ 757/22 от 17.02.2022). Всех животных обязательно проверяли на наличие целевого гена *hACE2*, экспрессию которого анализировали методом ОТ-ПЦР. Иммунизацию животных выполняли двукратно (в 1-й и 21-й дни), вводя в подушечки задних лап буфер PB-Suc ( $n = 3$ ), контрольные липосомы  $L_K$  ( $n = 4$ ) и препарат  $L_1$  с добавлением 75 мкг CpG-ODN ( $n = 6$ ), 100 мкл ( $2 \times 50$ ). По данным динамического светорассеяния, размер липосом  $L_K$  составил  $207.9 \pm 5.7$  нм (PDI  $0.096 \pm \pm 0.042$ ), липосом  $L_1$  –  $207.5 \pm 1.8$  нм (PDI  $0.093 \pm \pm 0.021$ ).

**Заражение мышей вирусом SARS-CoV-2.** Через 36 дней после первой иммунизации всех мышей C57BL/6-TgTn(CAG-humanACE2-IRES-Luciferase-WPRE-polyA) передавали в специализированную лабораторию уровня ABSL-3 (Сергиев Посад), где заражали уханьским штаммом SARS-CoV-2. Инфицирование проводили с помощью интраназального введения вируса SARS-CoV-2 в дозе 3 lg БОЕ в объеме 20 мкл физиологического раствора [38]. У погибших в течение срока наблюдения мышей экстирпировали сердечно-легочный комплекс и после двухнедельной инактивации в 10%-ном растворе формалина отправляли на гистологическое исследование.

**Гистология.** Фиксированные в 10%-ном растворе нейтрального формалина легкие промывали в проточной воде, дегидратировали в этиловых спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм, окрашенные гематоксилином и эозином, изучали с помощью микроскопа AxioScore.A1 (Carl Zeiss, Германия). Микрофотографии гистологических препаратов получали с помощью камеры высокого разрешения AxioCam 305 color (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения ZEN 2.6 lite (Carl Zeiss, Германия). Оценка выраженности тех или иных патоморфологических признаков проводили по пятибалльной шкале, где 0 – отсутствие признака (в пределах нормы), 1 – минимальная степень выраженности, 2 – слабая, 3 – средняя (умеренная), 4 – выраженная, 5 – тяжелая [39].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что подкожная вакцинация липосомами из природных липидов улучшает легоч-

ную функцию, по-видимому, благодаря активации врожденного иммунитета, но при летальной дозе вируса не защищает полностью. Липосомы, несущие набор Т-клеточных эпитопов вируса SARS-CoV-2, могут послужить основой для создания вакцины как минимум для профилактики хронического течения и средней тяжести инфекционного заболевания. При выборе эпитопов цитотоксических и хелперных Т-лимфоцитов для составления пептидных композиций следует брать за основу результаты клинических анализов выздоравливающих пациентов и уже во вторую очередь учитывать данные иммуноинформатического анализа. Иммунодоминантные эпитопы, вычисленные *in silico*, зачастую занимают первые позиции просто в силу своей высокой гидрофобности, и презентация их в комплексах МНСI или МНСII может быть затруднена. Кроме того, гидрофобные пептиды должны быть включены в липидный бислой, что создает определенные трудности при формировании липосом, а также может привести к разрушению последних в ходе лиофилизации из-за нарушения жидкокристаллической структуры мембраны. Оптимизация методики получения липосом с Т-клеточными эпитопами, пригодных для длительного хранения, будет предметом наших дальнейших исследований.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-04-60478).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

Проведение данного исследования на лабораторных животных было одобрено Комитетом по биомедицинской этике при ФГБУ “НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России и Институтской комиссией по контролю за содержанием и использованием животных ИБХ РАН.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Delany I., Rappuoli R., De Gregorio E. // *EMBO Mol. Med.* 2014. V. 6 (6). P. 708–720.
2. De Temmerman M.-L., Rejman J., Demeester J., Irvine D.J., Gander B., De Smedt S.C. // *Drug Discov. Today.* 2011. V. 16 (13–14). P. 569–582.

3. Reed S., Orr M., Fox C. // *Nat. Med.* 2013. V. 19. P. 1597–1608.
4. Kawai T., Akira S. // *Nat. Immunol.* 2010. V. 11. P. 373–384.
5. Allison A., Gregoriadis G. // *Nature.* 1974. V. 252 (5480). P. 252.
6. Schwendener R.A. // *Ther. Adv. Vaccines.* 2014. V. 2 (6). P. 159–182.
7. Perrie Y., Crofts F., Devitt A., Griffiths H.R., Kastner E., Nadella V. // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2016. V. 99 (Pt A). P. 85–96.
8. Nisini R., Poerio N., Mariotti S., De Santis F., Fraziano M. // *Front. Immunol.* 2018. V. 9. P. 155.
9. Bernasconi V., Norling K., Bally M., Höök F., Lycke N.Y. // *J. Immunol. Res.* 2016. V. 2016. P. 5482087.
10. Третьякова Д.С., Водовозова Е.Л. // *Биол. мембраны.* 2022. Т. 39. С. 85–106. [Tretiakova D.S., Vodovozova E.L. // *Biochem. (Mosc.) Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* 2022. V. 16 (1). P. 1–20.]
11. Gayed P.M. // *Yale J. Biol. Med.* 2011. V. 84 (2). P. 131–138.
12. Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S. // *Nature.* 2000. V. 408. P. 740–745.
13. Lee Y., Lee Y.S., Cho S.Y., Kwon H.J. // *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 2015. V. 99. P. 75–97.
14. Purcell A.W., McCluskey J., Rossjohn J. // *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2007. V. 6 (5). P. 404–414.
15. Ohno S., Kohyama S., Taneichi M., Moriya O., Hayashi H., Oda H., Mori M., Kobayashi A., Akatsuka T., Uchida T., Matsui M. // *Vaccine.* 2009. V. 27. P. 3912–3920.
16. Kohyama S., Ohno S., Suda T., Taneichi M., Yokoyama S., Mori M., Kobayashi A., Hayashi H., Uchida T., Matsui M. // *Antiviral Res.* 2009. V. 84. P. 168–177.
17. Heuts J., Varypataki E.M., van der Maaden K., Romeijn S., Drijfhout J.W., van Scheltinga A.T., Ossendorp F., Jiskoot W. // *Pharm. Res.* 2018. V. 35. P. 207.
18. Dhakal S., Cheng X., Salcido J., Renu S., Bondra K., Lakshmanappa Y.S., Misch C., Ghimire S., Feliciano-Ruiz N., Hogshead B., Krakowka S., Carson K., McDonough J., Lee C.W., Renukaradhya G.J. // *Int. J. Nanomedicine.* 2018. V. 13. P. 6699–6715.
19. Mishra S. // *R. Soc. Open Sci.* 2020. V. 7. P. 201141.
20. Fast E., Altman R.B., Chen B. // *Potential T-cell and B-cell Epitopes of 2019-nCoV.* bioRxiv preprint. This version posted March 18, 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.02.19.955484>
21. Kalita P., Padhi A.K., Zhang K.Y.J., Tripathi T. // *Microb. Pathogenesis.* 2020. V. 145. P. 104236.
22. Le Bert N., Tan A.T., Kunasegaran K., Tham C.Y.L., Hafezi M., Chia A., Chng M.H.Y., Lin M., Tan N., Linstner M., Chia W.N., Chen M.I.-C., Wang L.-F., Ooi E.E., Kalimuddin S., Tambyah P.A., Low J.G.-H., Tan Y.-J., Bertoletti A. // *Nature.* 2020. V. 584. P. 457–462. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2550-z>
23. Ferretti A.P., Tomasz Kula T., Wang Y., Nguyen D.M.V., Weinheime A., Dunlap G.S., Xu Q., Nabili N., Perullo C.R., Cristofaro A.W., Whitton H.J., Virbasius A., Olivier K.J., Jr., Buckner L.R., Alistar A.T., Whitman E.D., Bertino S.A., Chattopadhyay S., MacBeath G. // *Immunity.* 2020. V. 53. P. 1095–1107.e3. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.10.006>
24. Snyder T.M., Gittelman R.M., Klinger M. // *Magnitude and Dynamics of the T-Cell Response to SARS-CoV-2 Infection at Both Individual and Population Levels.* medRxiv preprint. This version posted August 4, 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.07.31.20165647>
25. Nelde A., Bilich T., Heitmann J.S., Maringer Y., Salih H.R., Roerden M., Lübke M., Bauer J., Rieth J., Wacker M., Peter A., Hörber S., Traenkle B., Kaiser P.D., Rothbauer U., Becker M., Junker D., Krause G., Strenkert M., Schneiderhan-Marra N., Templin M.F., Joos T.O., Kowalewski D.J., Stos-Zweifel V., Fehr M., Rabsteyn A., Mirakaj V., Karbach J., Jäger E., Graf M., Gruber L.-C., Rachfalski D., Preuß B., Hagelstein I., Märklin M., Bakchoul T., Gouttefangeas C., Kohlbacher O., Klein R., Stevanović S., Rammensee H.-G., Walz J.S. // *Nat. Immunol.* 2021. V. 22. P. 74–85. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00808-x>
26. Quadeer A.A., Ahmed S.F., McKay M.R. // *Cell Rep. Med.* 2021. V. 2. P. 100312. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100312>
27. Mouritsen O.G., Jorgenson K. // *Chem. Phys. Lipids.* 1994. V. 73. P. 3–25.
28. Markwell M., Haas S., Bieber L., Tolbert N.E. // *Anal. Biochem.* 1978. V. 210. P. 206–210.
29. Chen W., Huang L. // *Mol. Pharm.* 2008. V. 5. P. 464–471.
30. Mansourian M., Badiee A., Jalali S.A., Shariat S., Yazdani M., Amin M., Jaafari M.R. // *Immunol. Lett.* 2014. V. 162. P. 87–93.
31. Schmidt S.T., Foged C., Korsholm K.S., Rades T., Christensen D. // *Pharmaceutics.* 2016. V. 8. P. 7.
32. Ludewig B., Barchiesi F., Pericin M., Zinkernagel R.M., Hengartner H., Schwendener R.A. // *Vaccine.* 2001. V. 19 (1). P. 23–32.
33. Engler O.B., Schwendener R.A., Dai W.J., Wolk B., Pichler W., Moradpour D., Brunner T., Cerny A. // *Vaccine.* 2004. V. 23 (1). P. 58–68.
34. Dalwadi G., Benson H.A., Chen Y. // *Pharm. Res.* 2005. V. 22 (12). P. 2152–2162.
35. Dedoni S., Avdoshina V., Camoglio C., Siddi C., Fratta W., Scherma M., Fadda P. // *Molecules.* 2022. V. 27 (13). P. 4142.
36. Kryukova E.V., Egorova N.S., Kudryavtsev D.S., Lebedev D.S., Spirova E.N., Zhmak M.N., Garifulina A.I., Kasheverov I.E., Utkin Y.N., Tsetlin V.I. // *Front. Pharmacol.* 2019. V. 10. P. 748.
37. Tkachuk A.P., Gushchin V.A., Potapov V.D., Demidenko A.V., Lunin V.G., Gintsburg A.L. // *PLoS One.* 2017. V. 12 (4). P. e0176784.
38. Chernov A.S., Minakov A.A., Kazakov V.A., Rodionov M.V., Rybalkin I.N., Vlasik T.N., Yashin D.V., Saschenko L.P., Kudrieva A.A., Belogurov A.A., Smirnov I.V., Loginova S.Y., Schukina V.N., Savenko S.V., Borisevich S.V., Zykov K.A., Gabibov A.G., Telegin G.B. // *Inflamm. Res.* 2022. V. 71 (5–6). P. 627–639.
39. Mann P.C., Vahle J., Keenan C.M., Baker J.F., Bradley A.E., Goodman D.G., Harada T., Herbert R., Kaufmann W., Kellner R., Nolte T., Rittinghausen S., Tanaka T. // *Toxicol. Pathol.* 2012. V. 40 (Suppl. 4). P. 7S–13S.

## Proof-of-Concept Study of Liposomes with a Set of SARS-CoV-2 Viral T-Cell Epitopes as a Vaccine

D. S. Tretiakova\*, A. S. Alekseeva\*, N. R. Onishchenko\*, I. A. Boldyrev\*, N. S. Egorova\*, D. V. Vasina\*\*, V. A. Gushchin\*\*, A. S. Chernov\*\*\*, G. B. Telegin\*\*\*, V. A. Kazakov\*\*\*, K. S. Plokhikh\*\*\*\*, M. V. Konovalova\*, E. V. Svirshchevskaya\*, and E. L. Vodovozova\*.#

#Phone: (495) 330-66-10; e-mail: elvod@lipids.ibch.ru

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

\*\*Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, ul. Gamaleya 18, Moscow, 123098 Russia

\*\*\*Pushchino Branch of Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 8, Pushchino, 142290 Russia

\*\*\*\*National Research Center “Kurchatov Institute”, pl. Kurchatova 1, Moscow, 123182 Russia

Potential nonameric epitopes of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes were selected from the composition of structural, accessory, and non-structural proteins of SARS-CoV-2 virus (13 peptides) and a 15-mer epitope of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, from the S-protein, based on the analysis of publications on genome-wide immunoinformatic analysis of T-cell epitopes of the virus (Wuhan strain), as well as a number of clinical studies of immunodominant epitopes among patients recovering from COVID-19 disease. The peptides were synthesized and five compositions of 6–7 peptides were included in liposomes from egg phosphatidylcholine and cholesterol (~200 nm size) obtained by extrusion. After double subcutaneous immunization of conventional mice, activation of cellular immunity was assessed by the level of cytokine synthesis by splenocytes in vitro in response to stimulation with relevant peptide compositions. Liposomal formulation exhibiting the best result in terms of the formation of specific cellular immunity in response to vaccination was selected for further experiments. Evaluation of the protective efficacy of this formulation in an infectious mouse model showed a positive trend in the frequency of occurrence of hyaline-like membranes in the lumen of the alveoli, as well as a somewhat lower severity of microcirculatory disorders. The latter circumstance can potentially help reduce the severity of the disease and prevent its adverse outcomes. A method to produce liposome preparations with peptide compositions for long-term storage is under development.

*Keywords: T-cells, epitopes, SARS-CoV-2, vaccines, peptides, liposomes, cytokines*





УДК 576.5

## ПОЛИМЕРЫ 2,5-ДИГИДРОКСИБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ ИНДУЦИРУЮТ ОБРАЗОВАНИЕ СФЕРОИДОВ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2023 г. Г. К. Рысцов\*, #, А. В. Лисов\*, М. Ю. Земскова\*, #

\*ФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований” РАН,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,  
Россия, 142290 Пушкино, просп. Науки, 5

Поступила в редакцию 20.04.2022 г.

После доработки 20.05.2022 г.

Принята к публикации 31.05.2022 г.

Прикрепленные к подложке клетки, выращенные в двумерной (2D) или суспензионной культуре, не могут точно воспроизвести существующие в тканях и органах межклеточные взаимодействия. Сфероиды, являясь трехмерными (3D) образованиями, более точно воспроизводят структуру органов или новообразований и демонстрируют повышенную по сравнению с 2D-культурами выживаемость, соответствующую морфологию и гипоксическое ядро, которое наблюдается в нативных опухолях *in vivo*. Сфероиды опухолевых клеток также являются моделями процесса метастазирования, поэтому в настоящее время сфероиды широко используют для тестирования новых противоопухолевых препаратов. Однако получение и применение 3D-культур может быть сопряжено с рядом трудностей, таких как потребность в дорогостоящих реагентах и оборудовании, низкая скорость формирования сфероидов необходимого размера и возникновение долгосрочных изменений в клеточном метаболизме, которые зависят от методик, используемых для получения сфероидов. Нами было обнаружено, что инкубирование опухолевых и нормальных клеток в присутствии нетоксичных для клеток полимеров 2,5-дигидроксибензойной кислоты (поли-2,5-ДГБК) способно индуцировать формирование 3D-структур. На основании обнаруженного эффекта был разработан новый способ быстрого получения 3D-культур, не требующий использования дополнительного оборудования, дорогостоящих реактивов и не оказывающий долговременного влияния на клеточный гомеостаз. Сфероиды, полученные по разработанной методике, представляют собой модели 3D-структур и могут быть использованы для биологических исследований межклеточных взаимодействий и скрининга фармацевтических препаратов.

*Ключевые слова:* 3D-культуры, сфероиды, фармакологический скрининг, культуры клеток, лигнино-подобные полимеры, полимеры 2,5-дигидроксибензойной кислоты

DOI: 10.31857/S0132342322060197, EDN: GEUPDF

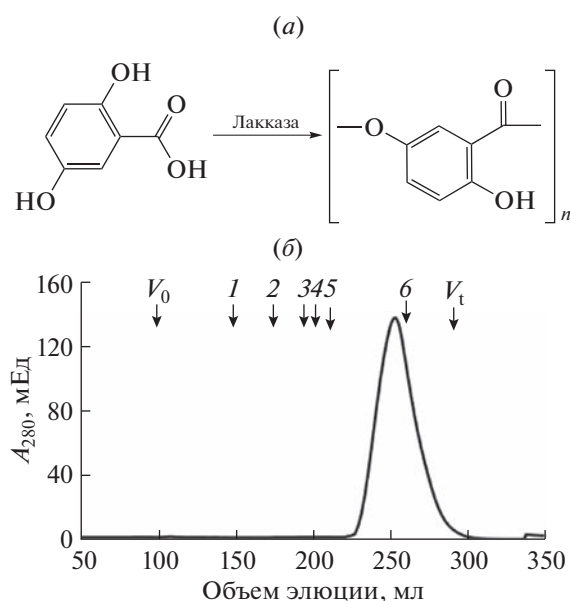
### ВВЕДЕНИЕ

Культуры клеток млекопитающих используют для скрининга лекарственных средств, исследований новообразований, тканевой инженерии, моделирования процессов метастазирования, анализа функций генов и анализа межклеточных взаимодействий [1–4]. За время использования клеточных культур в лабораторной практике было обнаружено, что клетки, выращенные как трехмерные структуры (3D, сфероиды), обеспе-

чивают более достоверные данные для изучения клеточного гомеостаза и клинических испытаний, чем клетки, культивируемые в монослое. Рост клеток в 3D-культуре обеспечивает возможность клеток взаимодействовать как между собой, так и с внеклеточным матриксом. Эти взаимодействия более точно имитируют среду *in vivo* и позволяют получить более точные данные, приближенные к условиям организма, что особо значимо для проведения тестов для скрининга новых лекарств [5]. Сфероиды используют как модель новообразований для изучения механизмов резистентности к лекарственным средствам, которая может быть обусловлена межклеточными взаимодействиями, устойчивостью к индуцированной клеточной гибели (апоптозу), увеличению доли

Сокращения: RTKs – рецепторные тирозинкиназы (receptor tyrosine kinases); ММСК – мультипотентные мезенхимальные клетки стромы костного мозга; поли-2,5-ДГБК – полимеры 2,5-дигидроксибензойной кислоты.

# Авторы для связи: (тел.: +7 (999) 963-15-47; +7 (929) 913-27-56; эл. почта: gleb.8.ristsoff@gmail.com, mzemskova@ibpm.pushchino.ru).



**Рис. 1.** (а) – Схема синтеза полимеров 2,5-ДГБК под воздействием лакказы, выделенной из гриба *Trametes versicolor*. Слева представлена структурная формула мономера – 2,5-ДГБК, справа – фрагмент полимерной макромолекулы, получаемой в результате окисления мономеров; (б) – результат гель-фильтрации поли-2,5-ДГБК на колонке с носителем Superdex 200.  $V_0$  – “пустой” объем колонки,  $V_t$  – полный объем колонки. Маркеры молекулярной массы: 1 – каталаза (230 кДа), 2 – амилаза (200 кДа), 3 – алкогольдегидрогеназа (150 кДа), 4 – гексокиназа (100 кДа), 5 – бычий сывороточный альбумин (67 кДа), 6 – рибонуклеаза (14 кДа).

покоящихся клеток, модуляцией экспрессии белков (включая топоизомеразы и репаративные ферменты), снижением проницаемости для препаратов и наличием гипоксического и некротического центров [6]. Таким образом клеточные ответы на воздействие фармакологических препаратов значительно различаются для одного и того же типа клеток, выращенных в 2D- или 3D-культурах. Очевидно, что использование сфероидов в моделировании роста опухолей для изучения сигнальных путей и межклеточных взаимодействий позволяет оптимизировать лечение и обеспечивает понимание механизмов развития устойчивости к лекарственным препаратам [7–10]. В настоящее время сфероиды интенсивно используют в платформах для скрининга новых медикаментов [11–13]. Сфероиды – альтернатива моделям лабораторных животных в исследованиях рака [14], а также возможный материал для использования в тканевой инженерии для реконструкции органов и тканей [15, 16].

Существует несколько подходов к выращиванию сфероидов, таких как метод предотвращения прикрепления [17–19], метод “висячей капли”

[20–23], процедуры, основанные на перемешивании суспензии клеток [24–26], использовании матрикса [27–32] или искусственно сконструированных каркасов [33, 34]. Однако в настоящее время многие методики создания 3D-культур клеток либо дорогие и трудоемкие [19, 23], либо способны влиять на жизнедеятельность используемых клеток из-за применения биологически активных агентов [31–34].

Исследуя ферментативное окисление фенольных мономеров гентизиновой кислоты (2,5-ДГБК) и биологических свойств полученных в результате этой реакции полимеров (поли-2,5-ДГБК), мы определяли цитотоксичность различных концентраций полимеров (0–100 мкг/мл) для различных типов клеток. Было обнаружено, что исследуемые вещества не обладают токсическими свойствами. На основании этого было решено провести серию опытов с использованием повышенной концентрации поли-2,5-ДГБК – 200 мкг/мл. Было обнаружено, что обработка культивируемых клеток человека поли-2,5-ДГБК в концентрации 200 мкг/мл приводит к переходу клеточной культуры в 3D-форму. Следует отметить, что полученные нами полимеры – это продукты поликонденсации 2,5-ДГБК (рис. 1а), которые структурно схожи с веществами из группы лигнинов, однако, в отличие от природных лигнинов, имеют постоянный состав, определяемый условиями синтеза [35].

На основании обнаруженных свойств полимеров и учитывая вышеперечисленные трудности применения различных технологий формирования 3D-культур, была поставлена цель разработать методику быстрого получения сфероидов из опухолевых и/или нормальных клеток млекопитающих, которые могут сохранять свойства роста в 3D-культурах в течение длительного времени.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

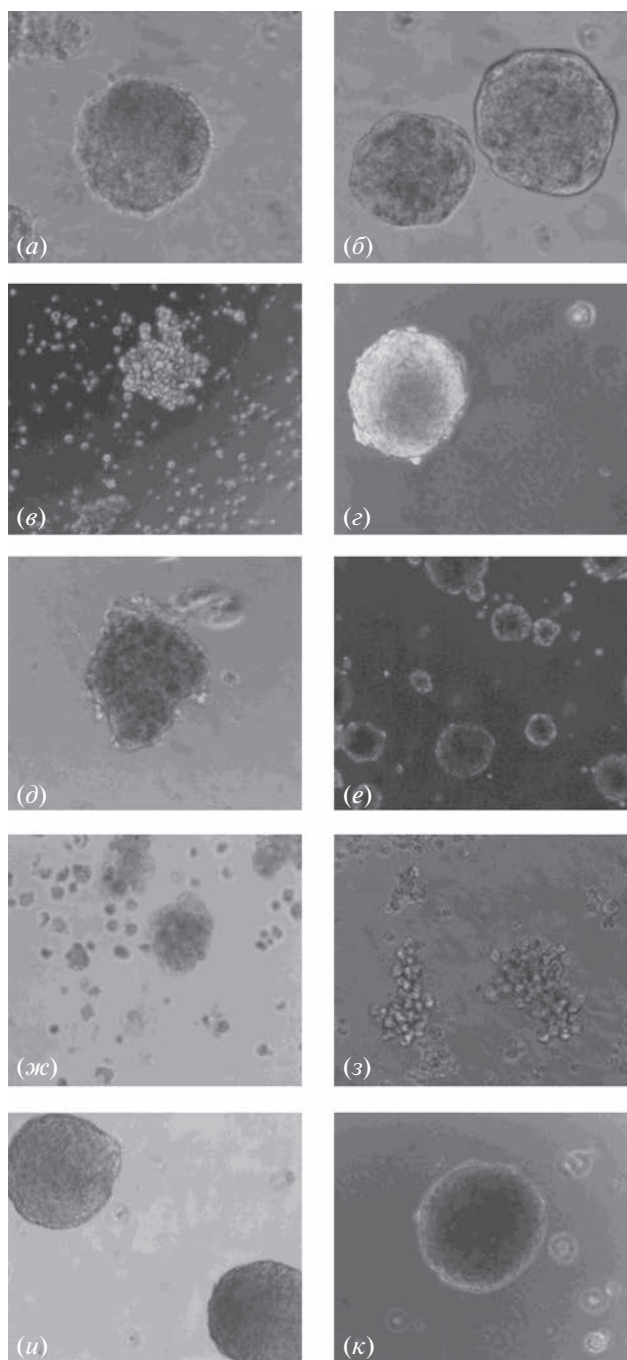
**Синтез поли-2,5-ДГБК.** Как нами было обнаружено ранее, окисление 2,5-ДГБК под воздействием лакказы приводит к образованию водонерастворимого осадка, однако при этом можно было синтезировать полимеры, растворимые в воде, посредством окислительной сополимеризации 2,5-ДГБК с желатином [35]. При окислении 20 мМ 2,5-ДГБК под воздействием лакказы в концентрации 3–7 ед./мл происходило образование водонерастворимого осадка серо-зеленоватого цвета. Однако при использовании лакказы в количестве от 10 ед./мл реакционная смесь приобретала темно-коричневый окрас, и образовывалось небольшое количество черного осадка. После удаления осадка центрифугированием и



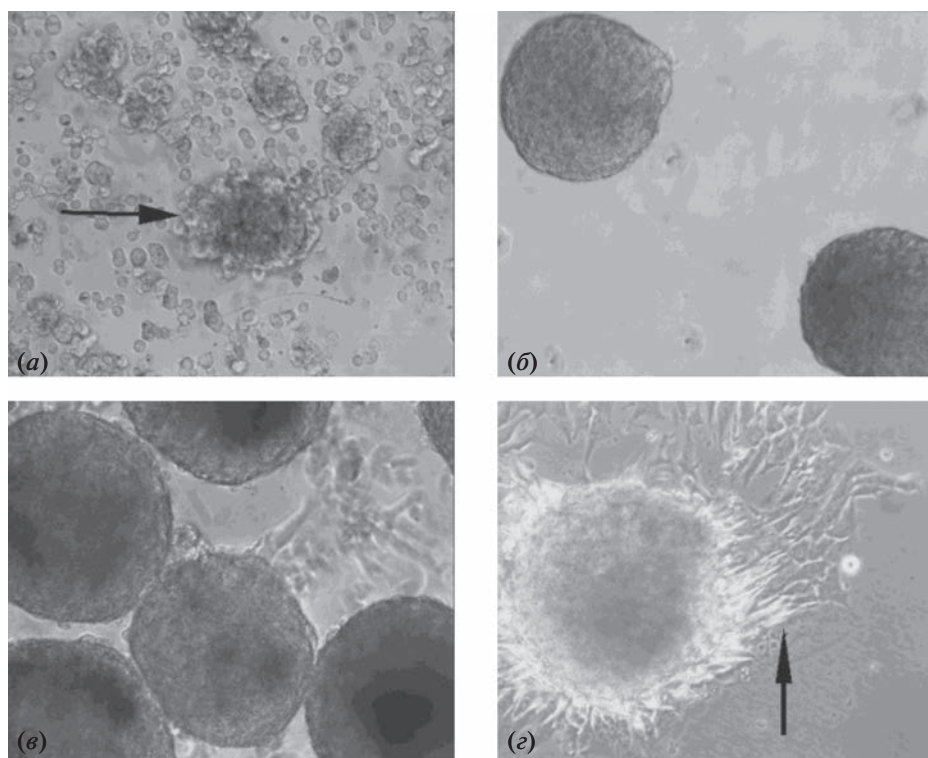
низкомолекулярных компонентов реакционной смеси с помощью диализа было проведено исследование молекулярно-массового распределения образца методом гель-фильтрации на колонке с носителем Superdex 200. Элюция препарата с колонки происходила одним пиком, что указывает на молекулярную гомогенность препарата (рис. 1б). Молекулярная масса образца составляла 15–20 кДа. Затем диализованный препарат высушивали под вакуумом и использовали в дальнейшей работе. Возможно, что образование водорастворимых поли-2,5-ДГБК связано с активностью лакказы, т.е. под воздействием большого количества фермента образующиеся полимеры 2,5-ДГБК подвергаются вторичному окислению и разлагаются до более низкомолекулярных фрагментов.

**Полимеры 2,5-ДГБК индуцируют формирование сфероидов клеток человека.** В результате данного исследования были получены сфероиды из нескольких типов клеток, включающих как опухолевые, так и клетки первичных культур человека. Также мы изучили возможность формирования смешанных сфероидов, включающих в себя эпителиальные клетки и фибробласты стромы предстательной железы.

Было показано, что все клеточные линии, используемые в данном исследовании, как иммортализованные опухолевые культуры, так и первичные клетки мезенхимы (ММСК) и фибробласты стромы предстательной железы, способны формировать 3D-структуры в присутствии поли-2,5-ДГБК (рис. 2). При этом размер, форма или скорость роста сфероидов различаются для каждого типа клеток. Например, клетки линий PC3 (рис. 2в) и MDA-MB-453 (рис. 2з) формируют слабокомпактизированные сфероиды, называемые “виноградная гроздь” [36]. Для остальных клеточных линий показано, что клетки под воздействием поли-2,5-ДГБК первоначально организованы в рыхлые агрегаты (рис. 3а), которые при дальнейшем культивировании в присутствии полимера трансформируются в образования из плотно соединенных клеток (рис. 2а, 2б, 2г–ж, 2и, 2к, рис. 3б), как это характерно для сфероидов [37, 38]. Следует отметить, что морфология сфероидов с различной степенью компактизации, наблюдаемая для разных клеточных линий, не связана со свойствами поли-2,5-ДГБК. Ранее при применении других подходов формирования 3D-структур также отмечалась различная морфология сфероидов, т.е. организация клеток в составе сфероида по типу “виноградной грозди” для линий PC3 [39] и MDA-MB-453 [40] и образование компактных сфероидов клетками линий LNCaP [41],



**Рис. 2.** Сфероиды, сформированные в присутствии 200 мкг/мл поли-2,5-ДГБК, из различных клеточных линий, полученные с использованием варианта 1 методики (см. “Эксперим. часть”). (а) – LNCaP (клетки рака простаты); (б) – DU145 (клетки рака простаты); (в) – PC3 (клетки рака простаты); (г) – T24 (клетки рака мочевого пузыря); (д) – MDA-MB-231 (клетки рака груди); (е) – MCF7 (клетки рака груди); (ж) – BT474 (клетки рака груди); (з) – MDA-MB-453 (клетки рака груди); (и) – клетки первичной культуры фибробластов человека, полученных из стромы предстательной железы; (к) – ММСК (стволовые клетки человека). Микрофотографии сделаны с использованием 20× увеличения.



**Рис. 3.** Сфероиды, сформированные из первичной культуры фибробластов человека, полученных из стромы предстательной железы, на разных этапах роста. Для формирования сфероидов использовали вариант 1 методики (см. “Эксперим. часть”). (а) – Клетки фибробластов человека через 24 ч после добавления поли-2,5-ДГБК (200 мкг/мл). Стрелкой отмечены рыхлые 3D-структуры, еще не прошедшие стадию компактизации; (б) – сфероиды фибробластов человека, растущие в присутствии 200 мкг/мл поли-2,5-ДГБК, через 72 ч после добавления полимеров в суспензию клеток; (в) – сфероиды фибробластов человека, инкубированные в течение 340 ч в неадгезивных флаконах, после удаления поли-2,5-ДГБК; (г) – сфероид фибробластов человека через 24 ч после удаления поли-2,5-ДГБК и переноса в культуральный флакон с адгезивным покрытием. Сфероид при культивировании на адгезивном покрытии прикрепляется к подложке, и клетки начинают мигрировать из 3D-структуры. Стрелкой отмечены мигрирующие клетки. Микрофотографии сделаны с использованием 20× увеличения.

DU145 [41], T24 [42], MDA-MB-231 [43], MCF7 [44] и BT474 [45].

Показано, что полученные с помощью поли-2,5-ДГБК сфероиды сохраняют характерную 3D-структуру и продолжают увеличиваться в размерах как в присутствии поли-2,5-ДГБК при культивировании в стандартной культуральной посуде (рис. 3б), так и после удаления полимеров и переноса сфероидов во флаконы с неадгезивным покрытием (рис. 3в). Таким образом, можно сделать вывод, что наличие в ростовой среде поли-2,5-ДГБК не только инициирует межклеточные взаимодействия, необходимые для роста клеток в 3D-культуре, но также предотвращает прикрепление сформированных сфероидов к поверхности культуральной посуды. Поскольку добавление новых клеток в процессе культивирования сфероидов не производили, можно сделать вывод о том, что увеличение размеров обусловлено делением клеток в составе сфероида.

Сформированные сфероиды можно удерживать в неприкрепленном состоянии как минимум до 340 ч посредством их культивирования либо в присутствии поли-2,5-ДГБК, либо в отсутствие полимеров, но при этом необходимо использовать культуральную посуду с неадгезивной поверхностью.

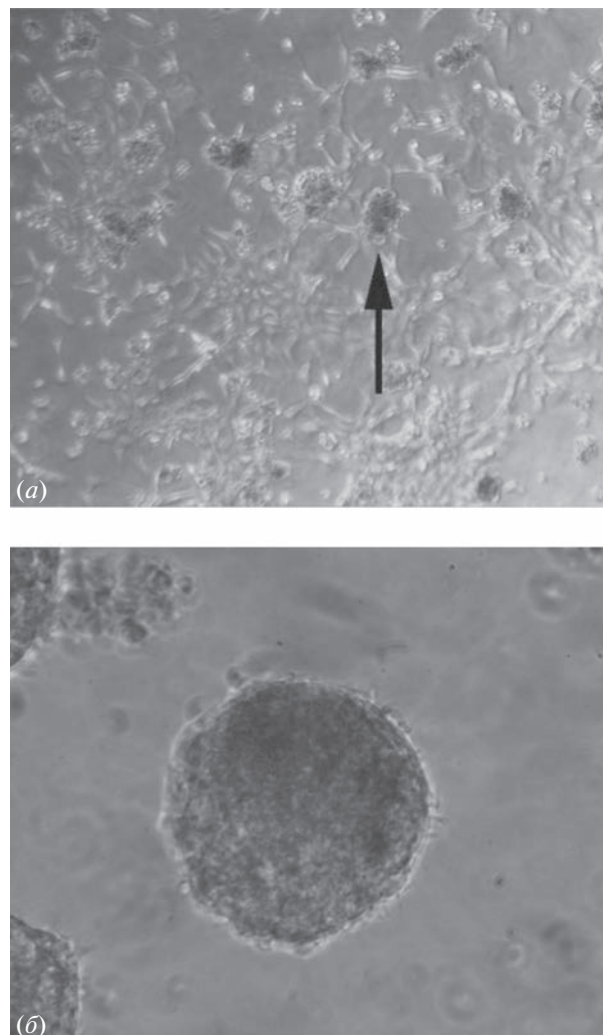
Помимо наблюдений за увеличением размера сфероидов, что косвенно указывает на пролиферацию клеток в присутствии поли-2,5-ДГБК, была исследована способность сфероид-образующих клеток к миграции. Для этого сфероиды после удаления полимеров были помещены в стандартные культуральные флаконы с адгезивной поверхностью. Через 24 ч наблюдали прикрепление сфероидов к культуральной подложке и миграция клеток из состава сфероида (рис. 3г). В ходе визуального наблюдения за расплыванием сфероида было отмечено, что все мигрирующие из сфероида клетки прикреплены к подложке (рис. 3г). Этот факт

косвенно свидетельствует об отсутствии клеточной гибели, поскольку, как характерно для всех использованных в данной работе клеточных культур, в случае их гибели происходит открепление клеток от культурального пластика и накопление в культуре “плавающих” мертвых клеток.

Несмотря на то, что описываемые нами процедуры после удаления поли-2,5-ДГБК включают использование культуральных емкостей с неадгезивной поверхностью, стоит отметить, что применение разработанной нами методики позволяет получить клеточные 3D-структуры и в случаях, когда клетки способны произвести прикрепление к неадгезивной поверхности. Например, на рис. 4а можно наблюдать, что только часть клеток линии LNCaP, посеянных во флаконы с неадгезивным покрытием, приступила к формированию сфероидов, в то время как большая часть популяции смогла произвести прикрепление ко дну флакона и начать рост в виде 2D-культуры. Также следует отметить, что в этих условиях сфероиды клеток LNCaP не образуют плотных 3D-структур. Однако за то же время обработка суспензии клеток поли-2,5-ДГБК индуцирует образование компактизированных сфероидов (рис. 4б), что указывает на преимущество разработанного нами метода перед ранее описанным с использованием неадгезивных покрытий.

В разработанной нами методике минимальная концентрация поли-2,5-ДГБК, необходимая для формирования сфероидов, составляет 200 мкг/мл. Однако клетки линии DU145 способны формировать сфероиды (по методике, описанной в варианте 1, см. “Эксперим. часть”) при концентрации поли-2,5-ДГБК 140 мкг/мл. Следует отметить, что данное исследование посвящено принципиальной возможности использования поли-2,5-ДГБК для индукции образования и дальнейшего роста сфероидов, однако концентрации соединения могут варьироваться в зависимости от типа клеток.

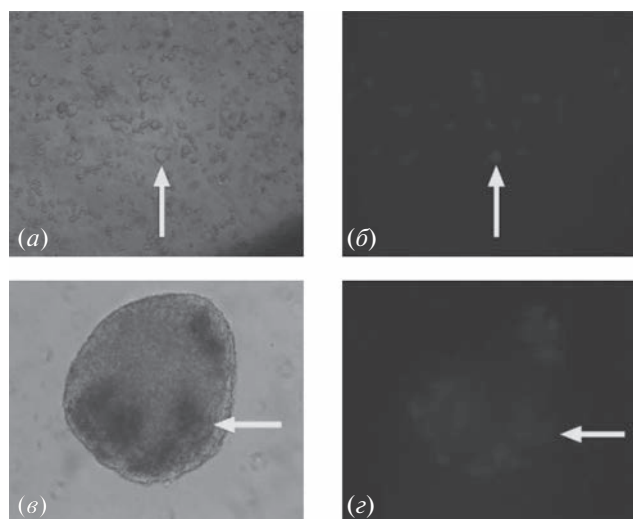
**Использование полимеров 2,5-ДГБК для формирования 3D-структур из различных типов клеток.** Для моделирования клеточных взаимодействий в составе опухолей или тканей используют так называемые “гетерологичные сфероиды”, сформированные различными типами клеток [46]. Для определения эффективности поли-2,5-ДГБК в формировании гетерологичных сфероидов первичные фибробласты стромы предстательной железы были окрашены прижизненным флуоресцентным красителем Vibrant Cell Tracer (Thermo Fisher Scientific, США) и смешаны с культурой эпителиальных опухолевых клеток простаты LNCaP (рис. 5а, 5б). Добавление к смешанным культурам поли-2,5-ДГБК привело к



**Рис. 4.** Клетки LNCaP (клетки рака простаты), инкубированные в течение 96 ч в условиях, предотвращающих адгезию клеток. (а) – Клетки LNCaP, инкубированные в течение 96 ч в неадгезивных флаконах без добавления поли-2,5-ДГБК. Стрелкой отмечены некомпактизированные 3D-структуры. Микрофотография сделана с использованием 10× увеличения; (б) – сфероиды через 96 ч, сформированные с добавлением поли-2,5-ДГБК (200 мкг/мл) к суспензии клеток. Микрофотография сделана с использованием 20× увеличения.

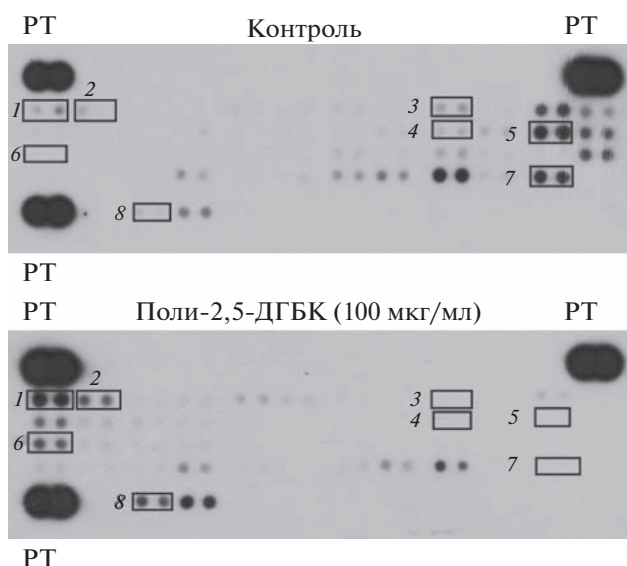
формированию сфероидов (рис. 5в). При этом сформированные сфероиды содержали оба типа клеток: неокрашенные эпителиальные клетки LNCaP и испускающие зеленый свет фибробласты (рис. 5в, 5г, фибробласты отмечены стрелками). Различные типы клеток в составе сфероидов расположены не хаотично, а сгруппированы в четко различимые области. Разделение клеток в сфероиде можно наблюдать как на фазовом контрасте (рис. 5в), где области скопления фибробластов более темные по сравнению с клетками





**Рис. 5.** Сфероиды, сформированные из смеси первичной культуры фибробластов человека, полученных из стромы предстательной железы, и клеток LNCaP, на разных этапах роста. Для формирования сфероидов использовали вариант 1 методики (см. “Эксперим. часть”). (а) – Смешанная суспензия клеток первичной культуры фибробластов человека, полученных из стромы предстательной железы, и клеток LNCaP с добавлением поли-2,5-ДГБК (200 мкг/мл). Клетки фибробластов (отмечены стрелкой) более крупные; (б) – флуоресценция клеток фибробластов (отмечены стрелкой) в смешанной клеточной суспензии, представленной на микрофотографии (а); (в) – сфероид, сформированный из фибробластов стромы и клеток LNCaP, после 340 ч культивирования во флаконах с неадгезивным покрытием в отсутствие поли-2,5-ДГБК; (д) – флуоресценция клеток фибробластов (отмечены стрелкой) в составе гетерологичного сфероида. Центр сфероида испускает зеленое свечение, т.к. состоит из окрашенных клеток первичной культуры фибробластов. Микрофотографии сделаны с использованием 20× увеличения.

LNCaP, так и при наблюдении флуоресценции – более темные области сфероидов, наблюдаемые в фазовом контрасте, обладают зеленой флуоресценцией (рис. 5д). Показано, что первоначально равномерное распределение клеток стромы (более крупные и окрашенные зеленым флуоресцентным красителем) и неокрашенных клеток LNCaP в смешанной культуре, через 48 ч культивирования в присутствии поли-2,5-ДГБК сменяется разделением клеток на флуоресцентную сердцевину и неокрашенную оболочку (рис. 5д), что может свидетельствовать о произошедшей перегруппировке клеток по их типу в составе сфероида. Учитывая, что флуоресценция обеспечивается фибробластами, можно предположить, что наблюдаемые окрашенные участки сформированы благодаря миграции и компартиментализации клеток при формировании сфероида, а не в результате образования клеточного массива путем деле-



**Рис. 6.** Поли-2,5-ДГБК модулирует уровни фосфорилирования рецепторных тирозинкиназ в клетках LNCaP. Репрезентативное изображение мембран для фосфопротеомного анализа с антителами, иммобилизованными на мембране и специфичными к определенным клеточным рецепторам, представлены в двух экземплярах. Интенсивность каждого сигнала соответствует уровню фосфорилирования различных рецепторов в клетках LNCaP, инкубированных в присутствии 100 мкг/мл (нижняя панель) или в отсутствие (верхняя панель) поли-2,5-ДГБК. РТ – референсные точки; 1 – EGFR (EGFR) (здесь и далее в скобках указано семейство рецепторов, к которому относится белок); 2 – ErbB2 (EGFR); 3 – InsulinR (InsulinR); 4 – c-Ret (Ret); 5 – ROR2 (ROR); 6 – Tie-2 (Tie); 7 – EphA10 (EphR); 8 – EphB3 (EphR).

ния клеток, т.к. в противном случае наблюдалось бы значительное ослабление интенсивности зеленого свечения. Также следует отметить, что 48 ч, прошедшие с момента начала формирования сфероида под воздействием поли-2,5-ДГБК, – это недостаточный временной промежуток для создания группы клеток наблюдаемого размера вследствие деления исходных фибробластов. Таким образом, показано, что поли-2,5-ДГБК можно использовать для получения сфероидов, состоящих из различных типов клеток, в частности для изучения клеточных взаимодействий между фибробластами стромы и эпителиальными клетками в моделировании опухолей предстательной железы.

**В основе инициируемого поли-2,5-ДГБК формирования сфероидов лежит реорганизация активности тирозинкиназных рецепторов.** С целью определения молекулярных мишеней, воздействие на которые поли-2,5-ДГБК может приводить к формированию 3D-структур, мы исследовали изменение активности тирозинкиназных рецепторов в прикрепленной культуре клеток LNCaP, ин-

кубированных при концентрации поли-2,5-ДГБК, которая еще не приводит к формированию сфероидов, но может индуцировать изменения в сигнальных путях клетки. В качестве объекта исследования была выбрана 2D-культура по той причине, что существование клеток в 3D-культуре само по себе приводит к изменению гомеостаза [47]. Клетки культивировали в присутствии 100 мкг/мл поли-2,5-ДГБК в течение 24 ч, поскольку было установлено, что эти условия еще не вызывают переход прикрепленной культуры в 3D-форму. Результаты фосфопротеомного анализа, представленные на рис. 6, указывают на повышение уровня фосфорилирования следующих рецепторов: EGFR, Tie-2, ErbB2 и EphB3, что косвенно указывает на их активацию. Также можно наблюдать снижение уровня фосфорилирования и, следовательно, ингибирование функциональной активности рецепторов Alk, DDR1, Insulin R, c-Ret, EphA1, DDR2, Ax1, ROR2, EphA10, Dtk, Tie-1 и EphA4.

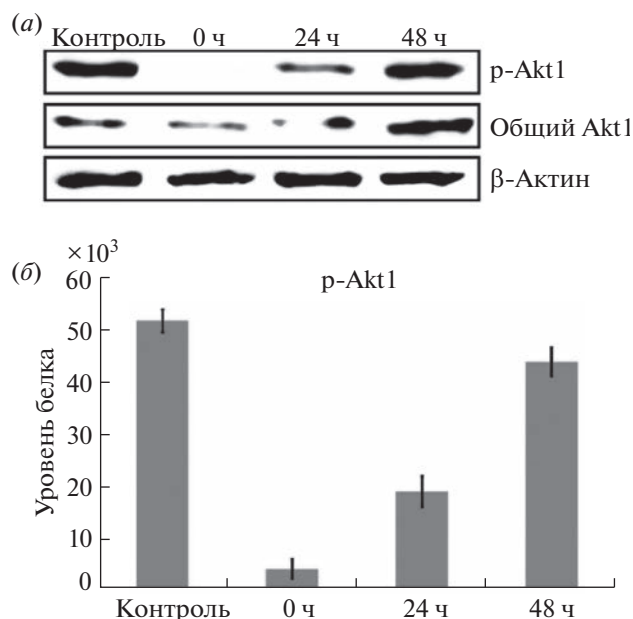
Одни из наиболее примечательных рецепторов, активность которых может регулировать рост клеток в 3D-культуре, – это EGFR и инсулиновый рецептор (Insulin R). Было показано, что активность EGFR необходима для образования непрерывных кольцевых апикальных соединений, содержащих эпителиальный кадгерин (E-кадгерин [48]) что приводит к уплотнению межклеточных контактов. Так, сверхэкспрессия EGFR в клетках MCF7 трансформирует адгезивную клеточную 2D-культуру в 3D-культуру [49]. Активация Tie-2 увеличивает плотность межклеточных взаимодействий при наличии контактов клетки с другими клетками [50, 51]. Высокая активность ErbB2 (HER2) сопряжена со снижением экспрессии фокальных адгезионных белков, таких как паксиллин, фокальная адгезионная киназа и интегрин. Следовательно, стимуляция ErbB2 под воздействием поли-2,5-ДГБК может приводить к ингибированию данных белков и общему снижению способности клетки к прикреплению [52]. Рецептор EphB3 в активной форме ингибирует опосредованную интегрином адгезию клеток и индуцирует реорганизацию актинового цитоскелета и перераспределение E-кадгерина [53], что также приводит к уменьшению способности клеток прикрепляться к подложке.

Эти процессы активации рецепторов под воздействием поли-2,5-ДГБК также коррелируют со снижением фосфорилирования и, следовательно, с ингибированием ряда тирозинкиназных рецепторов (рис. 6), таких как инсулиновый рецептор (Insulin R), рецепторы Ret и EphA10. Показано, что активность инсулинового рецептора необхо-

дима для экспрессии белков фокальной адгезии и паксиллина, которые регулируют способность клеток прикрепляться к культуральной подложке [54]. Ингибирование рецептора Ret снижает адгезию клеток, опосредованную функцией интегринов формировать комплексы, необходимые для узнавания лигандов межклеточного матрикса [55]. Инактивация рецепторов ROR2 и EphA10 сильно ингибирует клеточную адгезию [56, 57]. Поскольку сфероид-образующий эффект может быть обусловлен ослаблением прикрепления клеток к поверхности культуральной посуды (для предотвращения перехода суспензии в форму стандартной 2D-культуры) и усилением межклеточных взаимодействий, мы полагаем, что изменение активности этих клеточных рецепторов под воздействием поли-2,5-ДГБК приводит к изменению как способности роста в 2D-культуре (т.е. прикреплению к подложке), так и к усилению межклеточных контактов.

Известно, что рецепторные тирозинкиназы (RTK) реагируют на биохимические сигналы из окружающей среды, контролирующие поведение клеток в тканях. Координация их активности важна для морфогенеза и гомеостаза в зрелых тканях [58]. Поэтому дисрегуляция активности различных RTK, вызываемая поли-2,5-ДГБК, может приводить к изменениям в работе соответствующих сигнальных каскадов, находящихся под управлением данных рецепторов. Хотя определение конкретного механизма инициации и контроля перестройки клеток в 3D-структуру под воздействием поли-2,5-ДГБК затруднительно, мы предполагаем, что формирование сфероидов происходит в результате комплексного изменения активности вышеописанных рецепторов.

**В ходе формирования сфероида происходит временное ингибирование киназы Akt1.** Как упоминалось ранее, тирозинкиназные рецепторы имеют многочисленные нисходящие эффекторные цепочки. Поэтому возникла необходимость проверить, способна ли обработка поли-2,5-ДГБК, воздействуя на нисходящие эффекторы, приводить к долговременным изменениям клеточного гомеостаза. Известно, что рецепторы данной группы при нахождении в активном состоянии воздействуют на киназу Akt1 за счет нисходящих сигнальных каскадов. Наибольший интерес в данном случае представляют инсулиновый рецептор (Insulin R) и рецептор эфрина типа B3 (EphB3). Инсулиновый рецептор – вышестоящий активатор Akt1, сигнальный путь которого включает IRS (insulin receptor substrate, субстрат рецептора инсулина), PI3-K (class IA phosphatidylinositol 3-kinase, фосфатидилинозитол-3-киназа



**Рис. 7.** Результаты вестерн-блот-анализа лизатов клеток LNCaP, растущих в монослое и не подвергнутых обработке поли-2,5-ДГБК (контроль), и сфероидов, сформированных в присутствии 200 мкг/мл поли-2,5-ДГБК. После формирования сфероидов полимеры удаляли, клетки инкубировали в ростовой среде во флаконах с неадгезивным покрытием в течение 0, 24 и 48 ч. (а) – Изменения в уровнях фосфорилирования киназы Akt1 (p-Akt1) и общего белка Akt1 в контрольных клетках 2D-культуры и сфероидов. Интенсивность каждого сигнала соответствует уровню фосфорилирования (для p-Akt1) или уровню общего белка в контроле и сфероидов. Актин ( $\beta$ -актин) использовали для нормализации концентрации белков в каждой пробе; (б) – денситометрический анализ сигналов, полученных вестерн-блот-анализом лизатов контроля и сфероидов, представлен в виде средней плотности пикселей, отражающей изменения уровня p-Akt1, нормализованного к уровню  $\beta$ -актина. Столбики ошибок представляют  $\pm$  стандартное отклонение от среднего.

класса IA), PIP2 (phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate, фосфатидилинозитол (4,5)-бисфосфат), PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, фосфатидилинозитол 3,4,5-трифосфат) и PDK1 (phosphoinositide-dependent protein kinase-1, фосфоинозитид-зависимая протеинкиназа-1) [59, 60]. ЕрНВ3 – ингибитор Akt1, образующий комплекс с RACK1 (receptor of activated protein C kinase 1, рецептор активированной киназы протеина C 1) и PP2A (protein phosphatase 2, протеинфосфатаза 2), активность которых приводит к дефосфорилированию Akt1 и, следовательно, к подавлению активности киназы [61]. Таким образом, мы предположили, что в сфероидов, полученных посредством обработки клеток LNCaP поли-2,5-ДГБК, ингибирование инсулинового рецептора (вследствие уменьше-

ния его фосфорилирования) и активации ЕрНВ3 (вследствие увеличения его фосфорилирования) может приводить к уменьшению фосфорилирования и активации киназы Akt1. Результаты вестерн-блот-анализа сфероидов клеток LNCaP показали 17-кратное снижение уровней как фосфорилированного Akt1 (Ser473), так и общего количества киназы по сравнению с необработанными клетками (рис. 7). Как было отмечено ранее, рост клеток в 3D-культуре продолжается и после удаления поли-2,5-ДГБК при переносе культур во флаконы с неадгезивным покрытием. Для того чтобы определить, является ли ингибирование Akt1 необходимым условием для существования клеток в форме 3D-культуры или подавление ее экспрессии значительно для инициации формирования сфероидов и носит временный эффект, мы исследовали экспрессию Akt1 в сфероидов после удаления поли-2,5-ДГБК. Данные, представленные на рис. 7, свидетельствуют о том, что после удаления индуктора происходит постепенное восстановление как фосфорилирования Akt1 (Ser473), так и количества общего белка до уровней, наблюдаемых в необработанных полимерами клетках. Следует отметить, что при этом сформированные сфероиды сохраняют свою форму и растут в виде 3D-культур. Следовательно, можно предположить, что ингибирование Akt1 – это результат воздействия поли-2,5-ДГБК на функциональную активность рецепторов инсулина и ЕрНВ3, а не последствие роста клеток в 3D-культуре. Таким образом, показано, что поли-2,5-ДГБК снижает количество Akt1, однако экспрессия киназы восстанавливается до нормального уровня в течение 48 ч после удаления полимеров. Этот факт позволяет предположить, что изменения в фосфорилировании и, следовательно, в активности ряда клеточных рецепторов, наблюдаемые в результате воздействия поли-2,5-ДГБК, являются временными, и функция рецепторов нормализуется после удаления индуктора роста клеток в 3D-культурах.

Наиболее близкой из существующих технологий к созданной нами методике является способ получения сфероидов с использованием производных RGD-пептида (аминокислотная последовательность Arg-Gly-Asp, узнаваемая интегринами). В данной методике производные RGD-пептида (например, циклический пептид Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys (цикло-RGDfK) или циклоRGDfK, модифицированный 4-карбокситил-трифенилфосфонийбромидом (цикло-RGDfK (TRP)) добавляют в суспензию клеток, культивируемых в обычной культуральной посуде, затем в течение нескольких дней образуются сфероиды в результате самоагрегации клеток [62]. К

недостаткам метода относится факт наличия у растворимых низкомолекулярных RGD-содержащих пептидов выраженной способности индуцировать апоптоз [63], что может вносить искажения в результаты тестирования противоопухолевых препаратов с целью определения их цитотоксичности. Кроме того, известно, что лиганды интегринов, такие как RGD-пептид, используются как эффективные противоопухолевые препараты [64–66]. Следовательно, биологическая активность RGD-пептида может существенно искажать результаты тестирования фармакологических препаратов при использовании сфероидов, полученных по данному методу.

В настоящей работе мы показали, что сфероиды, полученные в результате воздействия поли-2,5-ДГБК, восстанавливают экспрессию Akt1 через 48 ч после удаления соединения, и вероятно, что снижение уровня Akt1 в присутствии индуктора связано с ингибированием функции вышестоящих тирозинкиназных рецепторов. Мы можем предположить, что изменения в активности рецепторов, приводящие к формированию сфероидов, происходят только в присутствии полимера и после удаления поли-2,5-ДГБК гомеостаз клеток восстанавливается до нормального уровня. Следовательно, полученные с использованием нашей методики сфероиды можно применять для скрининга биологической активности различных соединений или фармакологических препаратов через 48 ч после удаления поли-2,5-ДГБК.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Синтез поли-2,5-ДГБК.** Синтез полимеров проводили окислением 2,5-ДГБК (Sigma-Aldrich, США) под действием лакказы, выделенной из гриба *Trametes versicolor*, как это описано в работе Lisov et al. [35]. Реакцию проводили в 20 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 5.0. Концентрация 2,5-ДГБК составляла 20 мМ, а лакказы – 10 ед./мл. Реакцию проводили при 30°C и перемешивании (200 об/мин) в течение 15 ч. Через 15 ч реакцию останавливали путем нагревания реакционной смеси на кипящей водяной бане в течение 5 мин. Далее осадок удаляли из реакционной смеси центрифугированием, супернатант диализовали против дистиллированной воды (пропускная способность мембраны – 10 кДа). После диализа препарат высушивали в роторном вакуумном испарителе при 40°C, взвешивали для определения количества вещества и растворяли в фосфатно-солевом буфере (PBS) до концентрации 1 мг/мл. Для работы с культурами клеток раствор поли-2,5-ДГБК стерилизовали посредством фильтрования через

мембрану с диаметром пор 0.22 мкм и использовали для добавления к ростовую среду в указанных концентрациях. Гель-фильтрацию проводили на колонке HiLoad 26/60 Superdex 200 (Sigma-Aldrich, США), подвижная фаза – 20 мМ ацетатный буфер (pH 5.0), содержащий 15 М NaCl, скорость элюции 1 мл/мин.

**Антитела.** В качестве первичных антител для иммуноблоттинга использовали моноклональные антитела мыши (анти-AKT1 (Santa Cruz Biotechnology, США) и анти-β-актин, конъюгированные с пероксидазой (Sigma, Германия)) и антитела кролика (анти-фосфо-AKT1 (S473) (D9E) (Cell Signaling Technology, США)). В качестве вторичных антител для визуализации белка в вестерн-блот-анализе использовали конъюгированные с пероксидазой антитела против иммуноглобулинов мыши (H&L, goat) и кролика (H&L, goat) (Rockland, США).

**Культуры клеток.** Клетки первичной культуры фибробластов человека (выделенной из хирургического материала тканей предстательной железы) и ММСК культивировали в среде DMEM/F12. Клетки линий рака предстательной железы (LNCaP, DU145, PC3) и рака мочевого пузыря (T24) культивировали в среде RPMI 1640. Клетки линий рака молочной железы (MCF7, MDA-MB-231, BT474 и MDA-MB-231) культивировали в среде DMEM. Для культивирования использовали ростовые среды с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), стрептомицина, пенициллина (50 мкг/мл) и L-глутамина (ПанЭко, Россия) Культивирование проводили при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

**Формирование сфероидов.** Способ 1: после достижения клетками 90% монослоя ( $3 \times 10^6$  клеток) ростовую среду удаляли, клетки открепляли от подложки обработкой раствором 0.05%-ного трипсина с ЭДТА (ПанЭко, Россия). Клетки ресуспендировали в соответствующей для каждой клеточной линии ростовой среде, центрифугировали 5 мин при 1200 об/мин. После удаления супернатанта клетки ресуспендировали в 4 мл ростовой среды, переносили в 6-см чашку Петри (Corning, США) и добавляли раствор поли-2,5-ДГБК до конечной концентрации 200 мкг/мл. После этого клетки инкубировали в течение 72 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе MCO-19AIC(UV) (Sanyo, Япония). Среду со сформированными сфероидами переносили в 15-мл пробирку типа Falcon (Corning, США) и отстаивали 15 мин для осаждения сфероидов. Супернатант удаляли, добавляли 10 мл ростовой среды и перемешивали сфероиды плавным покачиванием вручную. Процедуру смены среды по-



вторяли суммарно 3 раза для полного удаления поли-2,5-ДГБК. Затем сфероиды в 6,5 мл ростовой среды переносили во флаконы T25 с неадгезивным покрытием (SPL LIFESCIENCES, Республика Корея) и использовали в дальнейших исследованиях.

Способ 2: по достижению клетками 100% монослоя ростовую среду удаляли, клетки промывали PBS. После удаления PBS на клетки наносили 2 мл раствора поли-2,5-ДГБК с концентрацией 1 мг/мл, после чего инкубировали 5 мин в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C. Далее клетки механически отделяли от поверхности чашки Петри при помощи скребка и несколько раз ресуспендировали посредством 1-мл пипетки-дозатора, не допуская полного разделения клеточных агрегатов на отдельные клетки. К раствору поли-2,5-ДГБК добавляли 8 мл ростовой среды (конечная концентрация поли-2,5-ДГБК после разведения – 250 мкг/мл) и инкубировали 48 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (5% CO<sub>2</sub>) при 37°C. Среду со сформированными сфероидом переносили в пробирку и отстаивали 15 мин для осаждения сфероидов. Процедуру полного удаления поли-2,5-ДГБК проводили, как описано выше. Затем сфероиды ресуспендировали в 6,5 мл ростовой среды и переносили во флаконы T25 с неадгезивным покрытием (SPL LIFESCIENCES, Республика Корея), культивировали до 340 ч.

Способ 3: заранее подготавливали 96-луночные культуральные планшеты для придания им низкоадгезивных свойств (Greiner Bio-One GmbH, Германия): в стерильных условиях в каждую лунку добавляли 200 мкл стерильного минерального масла (MP Biomedicals, Франция) и оставляли на 1 ч. После этого минеральное масло удаляли с максимально возможной полнотой. Далее планшет повторно стерилизовали облучением УФ-светом в течение 1 ч в ламинарном шкафу. Клетки линии LNCaP (рак предстательной железы) прикрепляли от подложки, как это описано выше в способе 1. После подсчета клеток суспензию клеток разбавляли ростовой средой до достижения концентрации 1 клетка в 100 мкл среды и помещали в подготовленные культуральные планшеты (100 мкл на лунку), т.е. большинство лунок 96-луночного планшета содержали 1 клетку. Далее клетки инкубировали в течение 120 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе для прикрепления клеток к подложке и формирования колонии-клона. После инкубации ростовую среду удаляли и в каждую лунку добавляли 100 мкл ростовой среды, содержащей поли-2,5-ДГБК (200 мкг/мл). После замены среды планшет несильно ударяли сбоку несколько раз, в

результате чего колония клеток отделялась от подложки без разделения на отдельные клетки. Далее клетки инкубировали в течение 48 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Затем сфероиды отмывали от поли-2,5-ДГБК, как описано выше, эту процедуру можно проводить как в лунках 96-луночного планшета, содержащих индивидуальные клоны клеток, так и перенести полученные клоны в культуральные планшеты любого формата (24- или 12-луночные) с неадгезивным покрытием для дальнейшего роста сфероидов в условиях эксперимента.

**Формирование гетерологичных сфероидов.** Фибробласты стромы предстательной железы и клетки LNCaP культивировали и трипсинизировали, как это описано в способе 1 получения сфероидов. Суспензию клеток центрифугировали 5 мин при 1200 об/мин, супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в 7,5 мл PBS и далее центрифугировали 5 мин при 1200 об/мин. Процедуру центрифугирования повторяли 2 раза для удаления остатков ростовой среды. Затем фибробласты стромы предстательной железы ресуспендировали в 1 мл PBS, содержащего краситель для прижизненного окрашивания Vibrant Cell Tracer Kit (25 мМ; Thermo Fisher Scientific, США) и инкубировали 15 мин в CO<sub>2</sub>-инкубаторе, после чего центрифугировали 5 мин при 1200 об/мин. Процедуру центрифугирования повторяли 2 раза для удаления остатков красителя с последующим ресуспендированием в ростовой среде и подсчетом клеток. Суспензию окрашенных клеток стромы предстательной железы смешивали с суспензией клеток LNCaP в соотношении 1 : 1 по количеству клеток ( $5 \times 10^6$  кл./мл), полученную суспензию переносили в лунку 24-луночного планшета в среде объемом 500 мкл. В суспензию клеток добавляли поли-2,5-ДГБК до концентрации 200 мкг/мл и инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 72 ч. Среду со сформированными сфероидом переносили в пробирку и оставляли на 15 мин для осаждения сфероидов. Супернатант удаляли, добавляли ростовую среду и перемешивали сфероиды плавным покачиванием. Процедуру смены среды повторяли 3 раза для полного удаления поли-2,5-ДГБК. Затем сфероиды в ростовой среде переносили во флаконы T25 с неадгезивным покрытием (SPL LIFESCIENCES, Республика Корея) для дальнейшего наблюдения. Флуоресценцию окрашенных клеток стромы наблюдали при помощи инвертированного микроскопа Микромед И (ЛОМО, Россия).

**Проверка стабильности и жизнеспособности сфероидов.** Сфероиды, сформированные по вышеописанным методикам, после удаления поли-

2,5-ДГБК инкубировали в течение двух недель в CO<sub>2</sub>-инкубаторе во флаконах T25 с неадгезивным покрытием с заменой среды каждые три дня на свежую. По истечении данного срока сфероиды сохраняли характерную 3D-структуру, активно росли, увеличиваясь в размерах. После 340 ч инкубации во флаконах T25 с неадгезивной поверхностью ростовую среду со сфероидами переносили в 6-см чашку Петри для наблюдения за прикреплением сфероидов к подложке и миграцией клеток из сфероида на поверхность чашки.

**Анализ фосфорилирования рецепторных тирозинкиназ.** Чтобы определить, приводит ли обработка поли-2,5-ДГБК к значительным изменениям клеточного гомеостаза, мы использовали Proteome Profiler Human Phospho-RTK Array Kit (R&D Systems, США) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, клетки LNCaP, посеянные в количестве  $2 \times 10^5$  клеток на 6-см чашку Петри, через 24 ч обрабатывали поли-2,5-ДГБК (100 мкг/мл) или контролем-носителем (среда с добавлением PBS) в течение 24 ч. После обработки клетки промывали 3 раза охлажденным PBS, лизировали с использованием поставляемого буфера для лизиса и определяли концентрацию белков в каждом клеточном лизате (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, США). Клеточные лизаты (300 мкг белка в 1 мл) наносили на мембраны, содержащие иммобилизованные антитела, специфичные к определенным клеточным рецепторам, и инкубировали в течение ночи при 4°C. Затем мембраны инкубировали с антителами против фосфорилированного тирозина, конъюгированными со стрептавидином-HRP для получения хемилюминесцентного сигнала после добавления реагента-субстрата. Уровень активности рецепторных киназ, связавшихся со специфическими антителами, определяли по интенсивности сигнала, отражающего количество фосфорилированного тирозина для каждой киназы, представленной в наборе. Для количественной оценки уровня фосфорилирования была проведена денситометрия интенсивности полученных сигналов с использованием программного обеспечения Studio Image Lite версии 5.2 (LI-COR Biosciences, США).

**Вестерн-блот-анализ.** Полученные, как описано в примере 2, сфероиды переносили во флаконы с неадгезивным покрытием (с заменой культуральной среды на свежую без добавления поли-2,5-ДГБК) и культивировали в течение 48 ч с отбором проб через 0, 24 и 48 ч. В качестве контроля использовали клетки LNCaP, выращенные до стадии монослоя в 2D-культуре в отсутствие поли-2,5-ДГБК. Клетки промывали холодным PBS

и лизировали в 200 мкл буфера для лизиса (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% NP-40, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA), содержащего ингибиторы (Protease Inhibitor Cocktail Set V; Calbiochem, США) и ингибиторы фосфатаз (10 mM  $\beta$ -глицерофосфат, 10 mM ортованадат натрия, 10 mM пиррофосфат натрия и 5 mM флуорит натрия). Концентрацию белка измеряли с использованием набора для анализа белка Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Клеточные лизаты (30 мкг тотального белка) разделяли с помощью электрофореза в 10%-ном ПААГ, затем белки переносили на нитроцеллюлозные мембраны (Bio-Rad Laboratories, США) и инкубировали с первичными антителами (разведение 1 : 1000 в буфере TBST, содержащем 5% BSA). После промывки мембраны инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой (разведение 1 : 5000 в буфере TBST, содержащем 5% обезжиренного молока). Визуализацию белка обеспечивали добавлением пикохемилуминесцентного субстрата (Thermo Fisher Scientific, США) с последующей детекцией хемилюминесцентных сигналов с помощью станции визуализации Fusion Fx (Vilber Lourmat, Франция). Относительные уровни экспрессии белка определяли денситометрией сигналов с использованием программного обеспечения Studio Image Lite (версия 5.2).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан новый метод быстрого получения 3D-культур клеток. Методы формирования сфероидов с применением поли-2,5-ДГБК, предложенные в настоящем исследовании (патент RU 2742689 C1, 2021) [67], имеют много преимуществ в лабораторном использовании и представляют собой простую и недорогую процедуру, которая вызывает минимальное вмешательство в жизнедеятельность клеток для их организации в 3D-структуру. Таким образом, новый метод 3D-культивирования может быть применен для исследований солидных опухолей человека или других экспериментальных целей.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Egeblad M., Nakazone E.S., Werb Z.* // *Dev. Cell.* 2010. V. 18. P. 884–901.  
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.012>
2. *Mulholland T., McAllister M., Patek S., Flint D., Underwood M., Sim A., Edwards J., Zagnoni M.* // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 14672.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-33055-0>
3. *Lin R.Z., Chang H.Y.* // *Biotechnol. J.* 2008. V. 3. P. 1172–1184.  
<https://doi.org/10.1002/biot.200700228>
4. *Harrison R.G., Greenman M.J., Mall P., Jackson C.M.* // *Anat. Rec.* 1907. V. 1. P. 116–128.  
<https://doi.org/10.1002/ar.1092340113>
5. *Breslin S., O'Driscoll L.* // *Drug Dis. Today.* 2013. V. 18. P. 240–249.  
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.10.003>
6. *Desoize B., Jardillier J.* // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2000. V. 36. P. 193–207.
7. *Dardousis K., Voolstra C., Roengvoraphoj M., Sekandarzad A., Mesghenna S., Winkler J., Ko Y., Hescheler J., Sachinidis A.* // *Mol. Ther.* 2007. V. 15. P. 94–102.  
<https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300003>
8. *Ghosh S., Joshi M.B., Ivanov D., Feder-Mengus C., Spagnoli G.C., Martin I., Erne P., Resink T.J.* // *FEBS Lett.* 2007. V. 581. P. 4523–4528.  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.08.038>
9. *Feder-Mengus C., Ghosh S., Weber W.P., Wyler S., Zajac P., Terracciano L., Oertli D., Heberer M., Martin I., Spagnoli G., Reschner A.* // *Br. J. Cancer.* 2007. V. 96. P. 1072–1082.  
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603664>
10. *Durand R.E.* // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1990. V. 26. P. 198–204.  
<https://doi.org/10.1007/bf02897199>
11. *Bartholoma P., Reiningner-Mack I.A., Zhang Z., Thielecke H., Robitzki A.* // *J. Biomol. Screen.* 2005. V. 10. P. 705–714.  
<https://doi.org/10.1177/1087057105277841>
12. *Friedrich J., Seidel C., Ebner R., Kunz-Schughart L.A.* // *Nature Protoc.* 2009. V. 4. P. 309–324.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.226>
13. *Kunz-Schughart L.A., Freyer J.P., Hofstaedter F., Ebner R.* // *J. Biomol. Screen.* 2004. V. 9. P. 273–285.  
<https://doi.org/10.1177/1087057104265040>
14. *Dubessy C., Merlin J.M., Marchal C., Guillemin F.* // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2000. V. 36. P. 179–192.  
[https://doi.org/10.1016/s1040-8428\(00\)00085-8](https://doi.org/10.1016/s1040-8428(00)00085-8)
15. *Lin R.Z., Chu W.C., Chiang C.C., Lai C.H., Chang H.Y.* // *Tissue Eng. Part. C Methods.* 2008. V. 14. P. 197–205.  
<https://doi.org/10.1089/ten.tec.2008.0061>
16. *Steer D.L., Nigam S.K.* // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2004. V. 1. P. 1–7.
17. *Ivascu A., Kubbies M.* // *J. Biomol. Screen.* 2006. V. 11. P. 922–932.  
<https://doi.org/10.1177/1087057106292763>
18. *Friedrich J., Seidel C., Ebner R., Kunz-Schughart L.A.* // *Nat. Protoc.* 2009. V. 4. P. 309–324.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.226>
19. *Klinder A., Markhoff J., Jonitz-Heincke A., Sterna P., Salamon A., Bader R.* // *Exp. Ther. Med.* 2019. V. 17. P. 2004–2012.  
<https://doi.org/10.3892/etm.2019.7204>
20. *Keller G.M.* // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995. V. 7. P. 862–869.  
[https://doi.org/10.1016/0955-0674\(95\)80071-9](https://doi.org/10.1016/0955-0674(95)80071-9)
21. *Kelm J.M., Timmins N.E., Brown C.J., Fussenegger M., Nielsen L.K.* // *Biotechnol. Bioeng.* 2003. V. 83. P. 173–180.  
<https://doi.org/10.1002/bit.10655>
22. *Kurosawa H.* // *J. Biosci. Bioeng.* 2007. V. 3. P. 389–398.  
<https://doi.org/10.1263/jbb.103.389>
23. *Timmins N.E., Nielsen L.K.* // *Methods Mol. Med.* 2007. V. 140. P. 141–151.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-59745-443-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-443-8_8)
24. *Kim J.B.* // *Semin. Cancer Biol.* 2005. V. 5. P. 365–377.  
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.05.002>
25. *Barrila J., Radtke A.L., Crabbé A., Sarker S.F., Herbst-Kralovetz M.M., Ott C.M., Nickerson C.A.* // *Nat. Rev. Microbiol.* 2010. V. 8. P. 791–801.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2423>
26. *Lin R.Z., Chang H.Y.* // *Biotechnol. J.* 2008. V. 3. P. 1172–1184.  
<https://doi.org/10.1002/biot.200700228>
27. *Lü W.D., Zhang L., Wu C.L., Liu Z.G., Lei G.Y., Liu J., Gao W., Hu Y.R.* // *PLoS One.* 2014. V. 9. P. e103672.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103672>
28. *Hughes C.S., Postovit L.M., Lajoie G.A.* // *Proteomics.* 2010. V. 10. P. 1886–1890.  
<https://doi.org/10.1002/pmic.200900758>
29. *Porzionato A., Stocco E., Barbon S., Grandi F., Macchi V., De Caro R.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. P. 4117.  
<https://doi.org/10.3390/ijms19124117>
30. *Nath S., Devi G.R.* // *Pharmacol. Ther.* 2016. V. 163. P. 94–108.  
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.013>
31. *Sodunke T.R., Turner K.K., Caldwell S.A., McBride K.W., Reginato M.J., Noh H.M.* // *Biomaterials.* 2007. V. 28. P. 4006–4016.
32. *Zaki M.Y.W., Shetty S., Wilkinson A.L., Patten D.A., Oakley F., Reeves H.* // *J. Vis. Exp.* 2021. V. 175. P. e62868.  
<https://doi.org/10.3791/62868>
33. *Sourla A., Doillon C., Koutsilieris M.* // *Anticancer Res.* 1996. V. 16. P. 2773–2780.
34. *Jiang T., Munguia-Lopez J.G., Flores-Torres S., Grant J., Vijayakumar S., De Leon-Rodriguez A., Kinsella M.J.* // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 4575.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-04691-9>
35. *Lisov A., Vrublevskaya V., Lisova Z., Leontievsky A., Morenkov O.* // *Viruses.* 2015. V. 7. P. 5343–5360.  
<https://doi.org/10.3390/v7102878>

36. Edmondson R., Broglie J.J., Adcock A.F., Yang L. // *Assay Drug Dev. Technol.* 2014. V. 12. P. 207–218. <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>
37. Lin R.Z., Chang H.Y. // *Biotechnol. J.* 2008. V. 3. P. 1172–1184. <https://doi.org/10.1002/biot.200700228>
38. Benien P., Swami A. // *Future Oncol.* 2014. V. 10. P. 1311–1327. <https://doi.org/10.2217/fon.13.274>
39. Archibald M., Pritchard T., Nehoff H., Rosengren R.J., Greish K., Taurin S. // *Int. J. Nanomed.* 2016. V. 11. P. 179–200. <https://doi.org/10.2147/IJN.S97286>
40. Roberts G.C., Morris P.G., Moss M.A., Maltby S.L., Palmer C.A., Nash C.E., Smart E., Holliday D.L., Speirs V. // *PLoS One.* 2016. V. 11. e0157004. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157004>
41. Takir G.G., Debelec-Butuner B., Korkmaz K.S. // *Proceedings.* 2018. V. 2. P. 1555. <https://doi.org/10.3390/proceedings2251555>
42. Kim C.J., Terado T., Tambe Y., Mukaisho K., Sugihara H., Kawauchi A., Inoue H. // *Int. J. Oncol.* 2018. V. 52. P. 231–240. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4194>
43. Zhao L., Xiu J., Liu Y., Zhang T., Pan W., Zheng X., Zhang X. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 19717. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56241-0>
44. Froehlich K., Haeger J.D., Heger J., Pastuschek J., Photini S.M., Yan Y., Lupp A., Pfarrer C., Mrowka R., Schleußner E., Markert U.R., Schmidt A. // *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 2016. V. 21. P. 89–98. <https://doi.org/10.1007/s10911-016-9359-2>
45. Rodríguez C.E., Reidel S.I., Bal de Kier Joffé E.D., Jasnis M.A., Fiszman G.L. // *PLoS One.* 2015. V. 10. P. e0137920. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137920>
46. Djordjevic B., Lange C.S. // *Acta Oncol.* 2006. V. 45. P. 412–420. <https://doi.org/10.1080/02841860500520743>
47. Kim H., Phung Y., Ho M. // *PLoS One.* 2012. V. 7. e39556. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039556>
48. Betson M., Lozano E., Zhang J., Braga V.M. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 36962–36969. <https://doi.org/10.1074/jbc.m207358200>
49. Troitskaya O., Novak D., Nushtaeva A., Savinkova M., Varlamov M., Ermakov M., Richter V., Koval O. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 12937. <https://doi.org/10.3390/ijms222312937>
50. Kitajima D., Kasamatsu A., Nakashima D., Miyamoto I., Kimura Y., Endo-Sakamoto Y., Shiiba M., Tanzawa H., Uzawa K. // *Oncology Lett.* 2018. V. 15. P. 7237–7242. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8212>
51. Fukuhara S., Sako K., Noda K., Nagao K., Miura K., Mochizuki N. // *Exp. Mol. Med.* 2009. V. 41. P. 133–139. <https://doi.org/10.3858/emmm.2009.41.3.016>
52. Weinberg F., Han M.K.L., Dahmke I.N., Del Campo A., de Jonge N. // *PLoS One.* 2020. V. 15. P. e0234430. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234430>
53. Singh A., Winterbottom E., Daar I.O. // *Front. Biosci. (Landmark Ed).* 2012. V. 17. P. 473–497. <https://doi.org/10.2741/3939>
54. Godoy-Parejo C., Deng C., Liu W., Chen G. // *Stem. Cells.* 2019. V. 37. P. 1030–1041. <https://doi.org/10.1002/stem.3026>
55. Cockburn J.G., Richardson D.S., Gujral T.S., Mulligan L.M. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010. V. 95. P. 342–346. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-0771>
56. Henry C., Hacker N., Ford C. // *Oncotarget.* 2017. V. 8. P. 112727–112738. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22559>
57. Shin W.S., Park M.K., Lee Y.H., Kim K.W., Lee H., Lee S.T. // *Cancer Sci.* 2020. V. 111. P. 3292–3302. <https://doi.org/10.1111/cas.14568>
58. Chiasson-MacKenzie C., McClatchey A.I. // *Cold Spring. Harb. Perspect. Biol.* 2018. V. 10. P. a029215. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029215>
59. Kim Y.B., Nikoulina S.E., Ciaraldi T.P., Henry R.R., Kahn B.B. // *J. Clin. Invest.* 1999. V. 104. P. 733–741. <https://doi.org/10.1172/JCI6928>
60. Mackenzie R., Elliott B. // *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 2014. V. 7. P. 55–64. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S48260>
61. Li G., Ji X.D., Gao H., Zhao J.S., Xu J.F., Sun Z.J., Deng Y.Z., Shi S., Feng Y.X., Zhu Y.Q., Wang T., Li J.J., Xie D. // *Nat. Commun.* 2012. V. 3. P. 667. <https://doi.org/10.1038/ncomms1675>
62. Akasov R., Gileva A., Zaytseva-Zotova D., Burov S., Chevalot I., Guedon E., Markvicheva E. // *Biotechnol. Lett.* 2017. V. 39. P. 45–53.
63. Buckley C.D., Pilling D., Henriquez N.V., Parsonage G., Threlfall K., Scheel-Toellner D., Simmons D.L., Akbar A.N., Lord J.M., Salmon M. // *Nature.* 1999. V. 397. P. 534–539. <https://doi.org/10.1038/17409>
64. Kang I.C., Kim D.S., Jang Y., Chung K.H. // *Biochem. Bioph. Res. Comm.* 2000. V. 275. P. 169–173. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3130>
65. Ritchie C.K., Giordano A., Khalili K. // *J. Cell Physiol.* 2000. V. 184. P. 214–221. [https://doi.org/10.1002/1097-4652\(200008\)184:2%3C214::aid-jcp9%3E3.0.co;2-z](https://doi.org/10.1002/1097-4652(200008)184:2%3C214::aid-jcp9%3E3.0.co;2-z)
66. Anuradh, C., Kanno S., Hirano S. // *Cell Biol. Toxicol.* 2000. V. 16. P. 275–283. <https://doi.org/10.1023/a:1026758429238>
67. Рыццов Г.К., Лусов А.В., Земскова М.Ю. // Патент RU 2742689 C1, 2021.

## Polymers of 2,5-Dihydroxybenzoic Acid Induce Formation of Spheroids in Mammalian Cells

G. K. Rystsov\*, #, A. V. Lisov\*, and M. Yu. Zemskova\*, #

# Phone: +7 (999) 963-15-47; +7 (929) 913-27-56; e-mail: [gleb.8.ristsoff@gmail.com](mailto:gleb.8.ristsoff@gmail.com); [mzemskova@ibpm.pushchino.ru](mailto:mzemskova@ibpm.pushchino.ru)

\*Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", Scriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, prosp. Nauki 5, Pushchino, 142290 Russia

Cells attached to a substrate and grown in two dimensions (2D) or suspended culture cannot accurately replicate intercellular interactions in tissues and organs. Spheroids, being three-dimensional (3D) formations, are more accurately reproduce the structure of organs or neoplasms. Spheroids compared to 2D cultures demonstrate an increased survival, corresponding morphology, and a hypoxic core, which is observed in native tumors in vivo. Tumor cell spheroids also represent models of the metastatic process. Therefore, spheroids are currently widely used for testing new anticancer drugs. However, obtaining and using 3D cultures can be associated with a number of difficulties, such as the need for expensive reagents and equipment, the low rate of formation of spheroids of the required size, and the occurrence of long-term changes in cell metabolism, which depend on the methods used to create spheroids. We have found that incubation of tumor and normal cells in the presence of polymers of 2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHBA) that are nontoxic to cells can induce the formation of 3D structures. Based on this, a new method for the rapid production of 3D cultures is developed and this approach does not require the use of additional equipment, expensive reagents, and does not have a long-term effect on cell homeostasis. The spheroids obtained by this method represent models of three-dimensional structures and can be used for biological studies of intercellular interactions and detection of pharmaceutical products.

*Keywords:* 3D cultures, spheroids, pharmacological screening, cell cultures, lignin-like polymers, 2,5-dihydroxybenzoic acid polymers



## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА 3-МЕТА-ПИРИДИН-1,2,4-ОКСАДИАЗОЛЬНОГО ПРОИЗВОДНОГО ДЕЗОКСИХОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ КАК ПРОТОТИПА ИНГИБИТОРОВ 5- $\alpha$ -РЕДУКТАЗЫ В МОДЕЛЯХ *in silico* И *in vivo*

© 2023 г. Ю. В. Мешкова\*, Д. С. Баев\*, И. В. Сорокина\*, #, И. И. Попадюк\*, О. В. Саломатина\*, Н. А. Жукова\*, Т. Г. Толстикова\*, Н. Ф. Салахутдинов\*

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

Поступила в редакцию 17.06.2022 г.

После доработки 11.07.2022 г.

Принята к публикации 12.08.2022 г.

Ингибиторы 5- $\alpha$ -редуктазы (5-AP) считаются наиболее эффективными препаратами в лечении пролиферативных процессов при аденоме предстательной железы. К ним относятся два синтетических азастероида – финастерид и дутастерид, которые в условиях длительной курсовой терапии вызывают побочные эффекты в виде расстройств половой функции у мужчин. В качестве стартового соединения для получения малотоксичных ингибиторов 5-AP нами предложена дезоксихолева кислота, на основе которой синтезировано целевое соединение, содержащее 3-мета-пиридин-1,2,4-оксадиазольный фрагмент. Методом молекулярного докинга показано, что новый агент, подобно финастериду, способен проникать в сайт связывания 5-AP через образование ковалентных аддуктов с NADP-H. При этом оба лиганда имеют сопоставимые величины энергии связывания с мишенью (–20 и –15 ккал/моль соответственно у финастерида и целевого соединения). В экспериментах на тестостероновой и сульпиридной моделях доброкачественной гиперплазии предстательной железы установлено, что внутрижелудочное введение полученного производного дезоксихолево-й кислоты крысам Wistar в дозе 20 мг/кг и финастерида в дозе 10 мг/кг оказывает сходное простатопротекторное действие путем уменьшения пролиферативных процессов в железистом эпителии и строме простаты крыс. Новый агент менее токсичен, чем финастерид: величина LD<sub>50</sub> у мышей CD-1 составляет >1500 мг/кг против 1060 мг/кг у финастерида. На основании полученных результатов 3-мета-пиридин-1,2,4-оксадиазольное производное дезоксихолево-й кислоты может рассматриваться как перспективный кандидат для доклинических испытаний.

**Ключевые слова:** ингибиторы 5- $\alpha$ -редуктазы, оксадиазольные производные дезоксихолево-й кислоты, токсичность, доброкачественная гиперплазия предстательной железы, крысы

**DOI:** 10.31857/S0132342323010189, **EDN:** GGKQXV

### ВВЕДЕНИЕ

Доброкачественная гиперплазия предстательной железы (ДГПЖ), возникающая на фоне общего старения организма, – наиболее распространенное урологическое заболевание, существенно снижающее работоспособность и качество жизни мужчин после 50–60 лет [1, 2]. Ведущая патогенетическая черта ДГПЖ – стимуляция пролиферативных процессов в железистом эпителии и строме пери-

уретрального отдела простаты, ассоциированная с повышением активности простатической 5- $\alpha$ -редуктазы (5-AP).

5-AP – мембранный белок, один из ключевых ферментов метаболизма стероидов в организме. В предстательной железе экспрессируется одна из изоформ фермента – 5-AP II типа (КФ 1.3.99.5), которая катализирует превращение тестостерона в дигидротестостерон (ДНТ) [3, 4]. Оба андрогена являются лигандами андрогеновых рецепторов, однако аффинность ДНТ к 5-AP в 3–5 раз выше, чем у его предшественника [5]. Активация андрогеновых рецепторов, вызванная повышением продукции ДНТ, приводит к увеличению экспрессии ростовых факторов, индуци-

Сокращения: 5-AP – 5- $\alpha$ -редуктаза; 5-API – ингибиторы 5- $\alpha$ -редуктазы; ДГПЖ – доброкачественная гиперплазия предстательной железы; ДНТ – дигидротестостерон; DCA – дезоксихолева кислота; LD<sub>50</sub> – средняя доза вещества, вызывающая гибель половины особей испытуемой группы.

# Автор для связи: (тел.: +7 (383) 330-36-63; эл. почта: sorokina. irina55@gmail.com).

рующих митотическую активность клеток простаты и развитию ее аденомы [3].

Препаратами выбора для патогенетической терапии ДГПЖ считаются ингибиторы 5- $\alpha$ -редуктазы (5-АРИ). В настоящее время в этой группе имеется два конвенциональных препарата – финастерид и дутастерид – структурные аналоги азастероидного типа. Оба задерживают рост простаты (до 30%) и обладают относительно удовлетворительной переносимостью [6]. Однако в условиях длительных курсов терапии у пациентов возникают признаки половой дисфункции в виде снижения либидо, нарушения эякуляции, а также гинекомастии [7, 8]. Поэтому в мире ведется активный поиск 5-АРИ среди соединений других структурных классов.

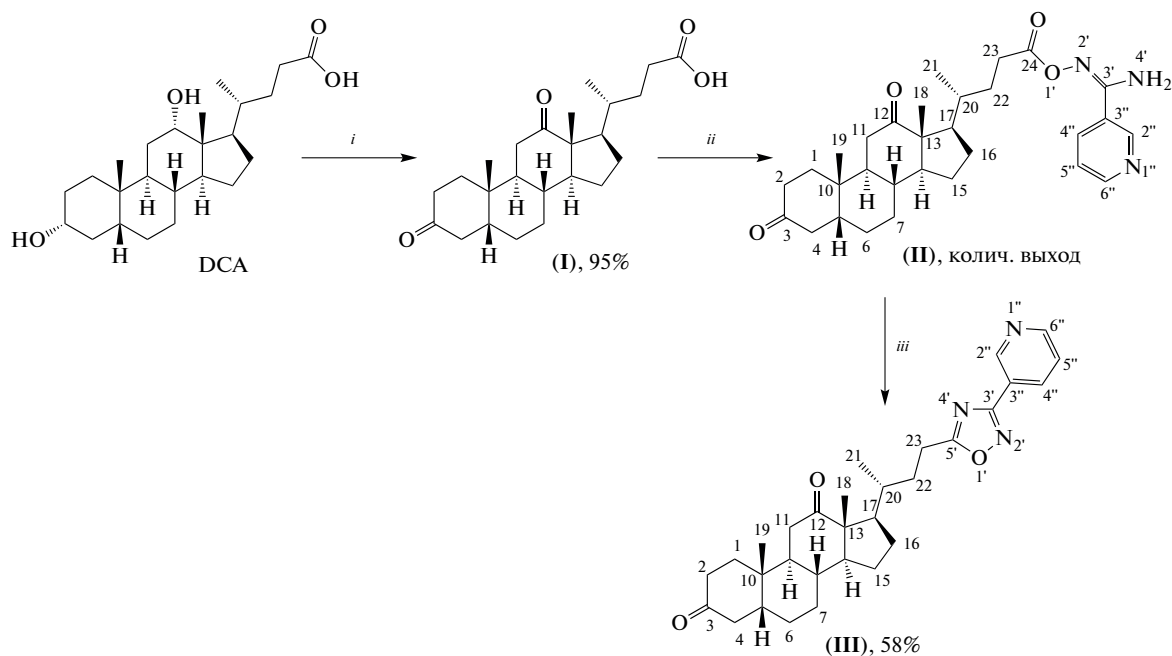
Ранее в Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН в качестве прототипов 5-АРИ были исследованы дезоксихолева кислота (DCA) и ее 1,2,4-оксадиазольные производные [9]. Методом молекулярного докинга показано, что эти соединения не уступают финастериду по величине энергии связывания в активном центре 5-АР. В модели ДГПЖ, индуцированной тестостероном, эти же агенты прояв-

ляют аналогичный финастериду антипролиферативный эффект в предстательной железе крыс.

Цель данной работы – синтез нового 1,2,4-оксадиазольного производного DCA, содержащего в 3-м положении гетероцикла *meta*-пиридиновый фрагмент, молекулярный докинг данного агента в активный центр 5-АР, исследование его простатопротекторных свойств на двух моделях с гормональной индукцией ДГПЖ у крыс (андроген- и пролактин-зависимая ДГПЖ) и определение токсичности.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Синтез 3-(пиридин-3'-ил)-5-(24''-нор-3'',12''-диоксо-5'' $\beta$ -холан-23''ил)-1,2,4-оксадиазола (III).** Целевое соединение (III), полученное трансформацией нативной карбоксильной группы в 1,2,4-оксадиазольное кольцо, было синтезировано в соответствии со схемой 1. Стартовое соединение для синтеза – коммерчески доступная DCA. Первоначально провели окисление гидроксильных групп стероидного остова до карбонильных реагентом Джонса в ацетоне с образованием 3,12-диоксо-5 $\beta$ -холан-24-овой кислоты (I) по литературной методике с выходом 95% [10, 11].

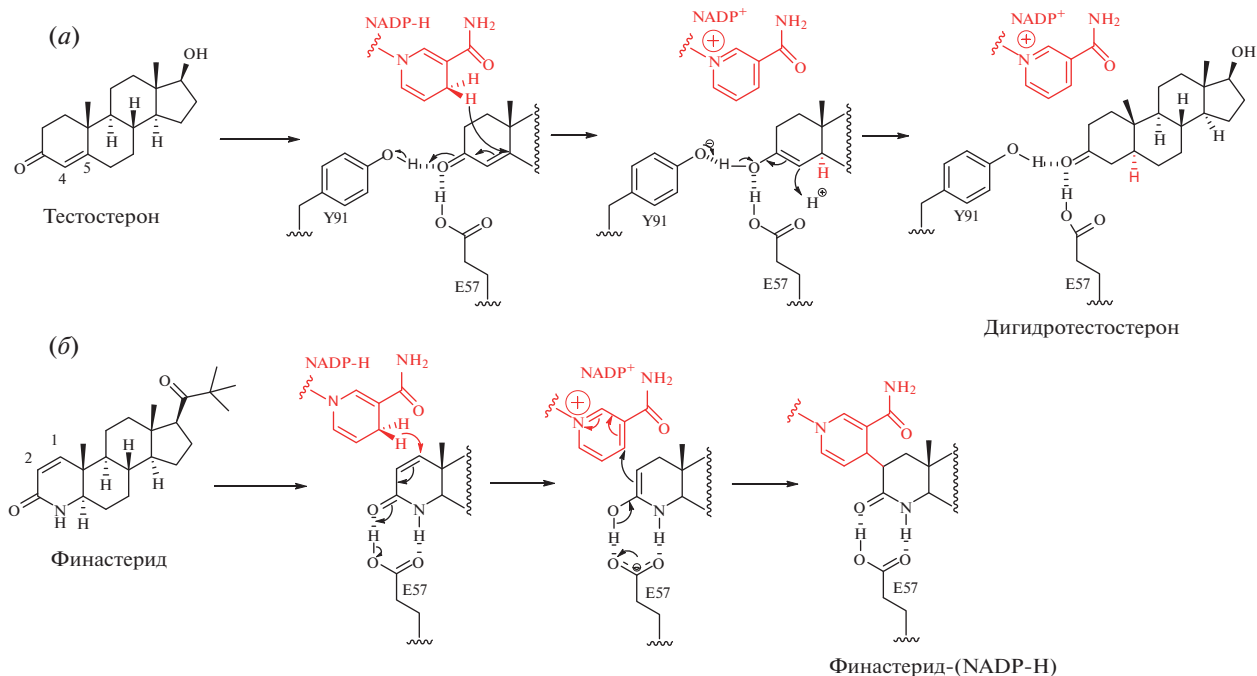


**Схема 1.** Синтез соединения (III): *i* – реагент Джонса, ацетон, 0 $^{\circ}$ C  $\rightarrow$  т. комн.; *ii* – 1) CDI, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; 2) *N'*-гидроксинокотинимидамид, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; *iii* – KOH, DMSO, 60 $^{\circ}$ C.

Формирование 1,2,4-оксадиазольного цикла на базе карбоксильной группы проводили в два этапа: 1) взаимодействием активированной карбоксильной группы с *N'*-гидроксинокотинимидамидом с образованием соединений (II), ак-

тивацию карбоксильной группы проводили *N,N'*-карбонилдиимидазолом (CDI); 2) замыкание 1,2,4-оксадиазольного цикла под действием гидроксида калия в DMSO привело к получению целевого соединения (III). Суммарный выход со-





**Рис. 1.** Механизмы превращения тестостерона в дигидротестостерон (а) и образования ковалентного аддукта NADP-H и финастерида (б) из статьи авторов модели [16].

единения (III) в расчете на исходное соединение составил 55%.

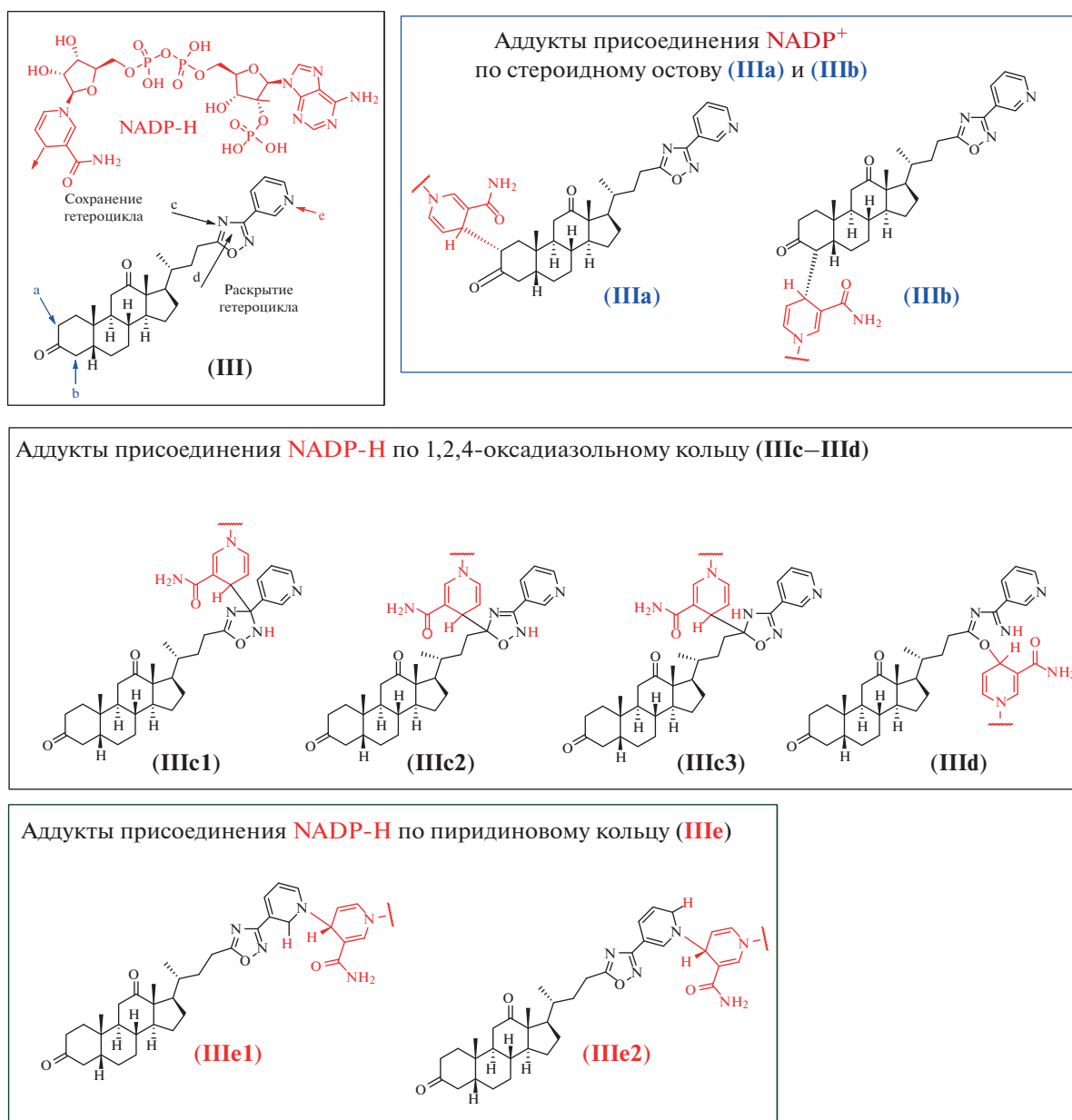
**Молекулярный докинг.** 5-AR катализирует обратимое восстановление 4,5-двойной связи в  $\Delta^{4,5}$ -3-кетостероидах до одинарной [12, 13]. Для протекания реакции необходим донор гидрид-иона в виде кофактора NADP-H (рис. 1а). Рентген-кристаллографические модели взаимодействия 5-AR и финастерида демонстрируют высокую вероятность образования ковалентного аддукта финастерида с NADP-H по положению C-2 в цикле А молекулы финастерида, который необратимо блокирует активный сайт 5-AR, не позволяя протекать катализируемой реакции [14] (рис. 1б).

Возникновение аддуктов с NADP-H теоретически возможно и с другими стероидными молекулами, например, с производным DCA (рис. 2).

Рассматривая соединение (III) с точки зрения возможного взаимодействия с NADP<sup>+</sup> и NADP-H, можно выделить три фрагмента: стероидное ядро, 1,2,4-оксадиазольный цикл и пиридиновый фрагмент. Аддукты по стероидному фрагменту могут образовываться в результате взаимодействия енольной формы карбонильной группы с NADP<sup>+</sup> (аддукты (IIIa) и (IIIb)). 1,2,4-Оксадиазольный фрагмент в результате взаимодействия с NADP-H может образовывать аддукты как с сохранением гетероцикла (аддукты (IIIc1–IIIc3)), так и с разрушением гетероцикла (аддукт IIIд). Причем хотелось бы отметить, что разрушение

гетероциклического фрагмента по типу формирования аддукта (IIIд) наблюдалось при изучении метаболизма 1,2,4-оксадиазолсодержащих производных [15, 16]. Аддукты по пиридиновому кольцу (IIIe1) и (IIIe2) могут быть образованы в результате первоначальной атаки как гидрид-иона (поскольку пиридиновое кольцо электронодефицитное и способно вступать в реакции ароматического нуклеофильного присоединения), так и в результате первичного присоединения NADP<sup>+</sup> к атому азота пиридинового кольца.

В результате выполнения расчетной функции докинга были получены значения оценочной минимальной энергии связывания (табл. 1). Среди возможных аддуктов производного (III) в сайт связывания 5-AR могут проникать соединения с различными сайтами присоединения молекулы NADP-H: аддукты (IIIe1) и (IIIe2) (присоединение молекулы NADP-H происходит по пиридиновому кольцу); аддукт (IIIc1) (присоединение по 1,2,4-оксадиазольному циклу), аддукт (IIIд) (может образовываться в результате метаболического раскрытия гетероцикла), а также аддукт (IIIa) (продукт присоединения NADP<sup>+</sup> по 2-му положению стероидного остова). Самое низкое значение оценочной энергии связывания было получено для аддукта (IIIд). По-видимому, присоединение молекулы NADP-H по связи N–O 1,2,4-оксадиазольного цикла с последующим раскрытием последнего дает конформационные преимущества в сайте связывания 5-AR по



**Рис. 2.** Возможные аддукты производного (III) с  $\text{NADP}^+$  и  $\text{NADP-H}$ . Сайты присоединения  $\text{NADP-H}$  указаны стрелками с номерами, соответствующими шифрам аддуктов. Молекула  $\text{NADP-H}$  в структуре аддуктов приведена в сокращенном виде.

сравнению с различными вариантами присоединения с сохранением цикла. Аддукты по пиридиновому кольцу, вероятно, также способны принимать в сайте связывания 5-АР энергетически выгодные конформации. Интересно, что аддукты производного (III) с более разветвленной структурой, когда молекула  $\text{NADP}$  может быть присоединена к атомам азота 1,2,4-оксадиазольного цикла, не способны проникать в сайт связывания. Конформационные затруднения в сайте связывания также возникают и в случае аддуктов в 4-е (IIIb) и 12-е положения стероидного остова.

Особенности пространственного расположения и нековалентных взаимодействий в сайте связывания 5-АР были рассмотрены для аддуктов с самой высокой теоретической аффинностью. Сайт связывания  $\text{NADP-H}$  и стероидов представляет собой туннелеобразную полость, состоящую из глубокого гидрофильного кармана, связывающего молекулу  $\text{NADP-H}$ , и гидрофобного входного отдела, где располагается стероидная молекула (рис. 3a). Карман связывания  $\text{NADP-H}$  преимущественно образован положительно заряженными аминокислотными остатками, формирующими

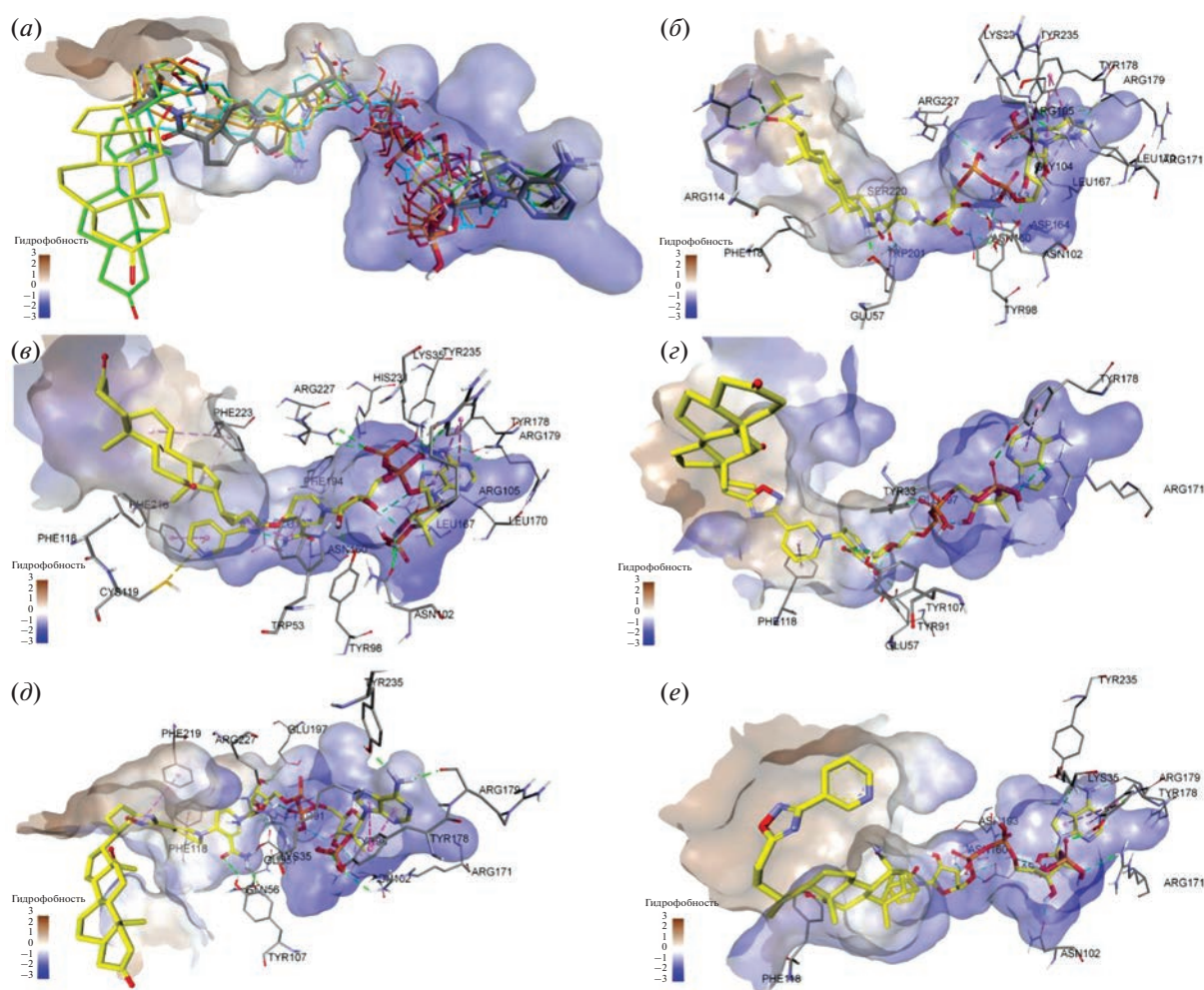
**Таблица 1.** Результаты молекулярного докинга аддуктов производного (III) в сайт связывания 5-AR в сравнении с аддуктом финастерид-(NADP-H)

Лиганд	Финастерид-(NADP-H)	(III <sub>d</sub> )	(III <sub>e1</sub> )	(III <sub>e2</sub> )	(III <sub>a</sub> )	(III <sub>c1</sub> )
Энергия связывания*, ккал/моль	-20.50	-17.93	-15.71	-15.20	-14.67	-13.36

\* Истинной энергией связывания не является, следует рассматривать как оценочное значение (docking score).

большое количество водородных связей и электростатических взаимодействий с полярными группами NADP-H. Стероидные молекулы стабилизированы в сайте связывания за счет гидрофобных взаимодействий стероидного ядра. Полярные группы молекулы финастерида (рис. 3б)

обладают возможностями дополнительных взаимодействий с аминокислотными остатками Glu57 и Arg114, повышая устойчивость ингибирующей конформации аддукта в сайте связывания. Отмечается важность гидрофобного взаимодействия финастерида и аминокислотного остатка



**Рис. 3.** Особенности расположения и нековалентных взаимодействий аддуктов NADP<sup>+</sup>, NADP-H и соединения (III) в сайте связывания 5-AR в сравнении с аддуктом финастерид-(NADP-H): (а) – суперпозиция структур аддуктов в сайте связывания (структуры выделены цветом: серым – дигидрофинастерид, желтым – (III<sub>e1</sub>), зеленым – (III<sub>e2</sub>), оранжевым – (III<sub>a</sub>), голубым – (III<sub>c1</sub>); (б) – финастерид-(NADP-H); (в) – аддукт (III<sub>d</sub>); (г) – аддукт (III<sub>e1</sub>); (д) – аддукт (III<sub>e2</sub>); (е) – аддукт (III<sub>a</sub>). Нековалентные взаимодействия соединений в активном сайте показаны пунктирными линиями: зелеными – водородные связи, фиолетовыми – стэкинг-взаимодействия, розовыми – гидрофобные взаимодействия.

Phe118; показано, что точечная замена этой аминокислоты приводит к невозможности связывания тестостерона и резкому снижению каталитической активности фермента [17].

Суперпозиция структур аддуктов в сайте связывания 5-AP (рис. 3а) показывает, что характерная особенность аддуктов (IIIe1) и (IIIe2) – наличие линкера между стероидным остовом и NADP, состоящего из алифатического участка и гетероциклических структур заместителя (рис. 3г, 3д). Этот линкер занимает пространство стероидного кармана сайта связывания. При этом стероидный остов новых производных располагается за пределами сайта связывания между петлевыми структурами L1 и L4 трансмембранного домена. Наличие линкера не препятствует структуре молекулы NADP занимать предназначенный ей гидрофильный карман. Аддукт (IIIa) обладает высокой структурной схожестью с аддуктом финастерида в силу присоединения молекулы NADP по 2-му положению цикла А стероидного каркаса. При этом каркас DCA располагается в стероидном кармане сайта связывания, а гетероциклический заместитель выходит за пределы сайта связывания, не участвуя в образовании водородных связей (рис. 3е). В результате присоединения молекулы NADP-H через гетероциклический линкер аддукты (IIIe1), (IIIe2) и (IIIд) обладают развернутым на 180° стероидным каркасом относительно аддуктов (IIIa) и финастерид-(NADP-H). Карбонильные группы стероидного остова DCA аддуктов производного (III) не участвуют в образовании водородных связей с аминокислотными остатками сайта связывания 5-AP. Наиболее теоретически аффинный аддукт (IIIд) интересен гибкостью линкерного участка молекулы, возникающей в результате метаболического раскрытия 1,2,4-оксадиазольного цикла (рис. 3в). Возникающая конформационная подвижность этой части молекулы приводит к занятию пиридиновым циклом аддукта глубокого кармана сайта связывания, где могут формироваться взаимодействия с аминокислотными остатками Cys119 и Phe216. Такое пространственное расположение молекулы (IIIд) приводит к расположению каркаса DCA в стероидном кармане сайта связывания 5-AP, что существенно отличает эту молекулу от аддуктов, в которых молекула NADP тоже присоединена к атомам гетероциклического заместителя.

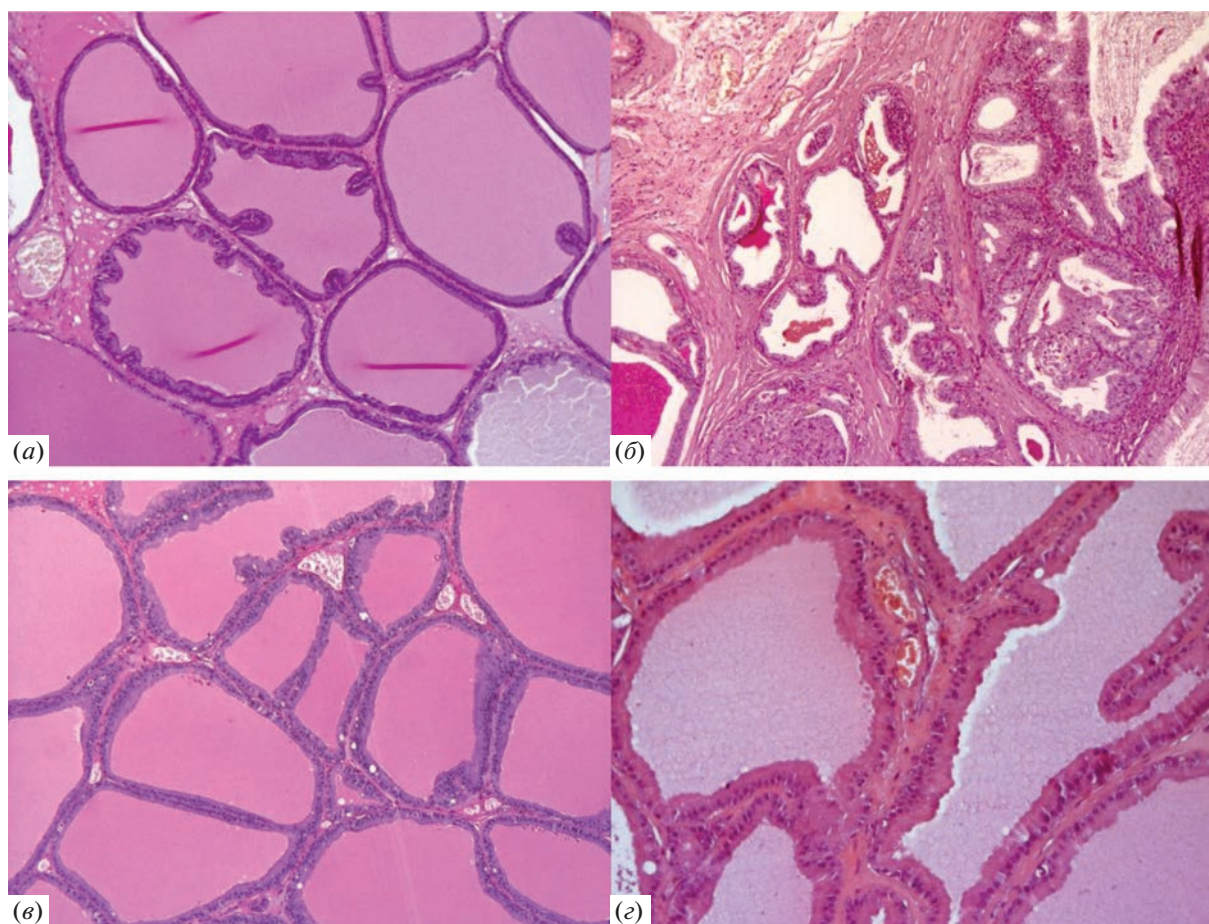
**Простатопротекторная активность.** Исследование простатопротекторной активности соединения (III) проводили в сравнении с финастеридом на двух гормон-зависимых моделях ДГПЖ у крыс линии Wistar, у которых пролиферативный процесс в простате индуцировали ежедневным введением тестостерона пропионата (андроген-опосредованная модель) [18] либо нейрелептика сульпирида (пролактин-опосредованная модель) [19].

Предстательная железа интактных животных имеет типичное строение (рис. 4а): секреторная часть представлена концевыми отделами и выводными протоками многочисленных желез, выстланных преимущественно однослойным кубическим или призматическим эпителием без повышенной митотической активности; воспалительные и дегенеративные изменения в ткани отсутствуют.

В ряде работ на тестостероновой модели ДГПЖ было показано, что высокий уровень циркулирующего тестостерона вызывает увеличение в простате концентрации ДНТ, что указывает на активацию 5-AP [20–22]. В этих условиях развитие активного гиперпластического процесса идет преимущественно в железистом эпителии, где имеется широкое представительство андрогеновых рецепторов, являющихся мишенью андрогенов. В нашем эксперименте 4-недельное введение тестостерона пропионата приводило к активному формированию новых очагов пролиферации в железистом отделе предстательной железы крыс контрольной группы с образованием разветвленных папиллярных структур в просвете ацинусов (рис. 4б). В отличие от интактных животных, существенно изменялось состояние эпителия ацинусов: он определялся как активно пролиферирующий, высокий призматический с гиперхромными ядрами, местами многорядный с большим количеством митозов. В нем также визуализировалась вакуольная дистрофия. Во всех отделах предстательной железы наблюдалось выраженное венозное полнокровие и отек стромы. Прогрессирование пролиферативной активности ацинарных структур сопровождалось нарушением оттока секрета из ацинусов, их кистозным расширением с атрофией эпителия. Просвет желез был заполнен секретом в виде эозинофильной субстанции и слущеными эпителиальными клетками. Таким образом, патологические изменения, выявленные в простате крыс контрольной группы, по тяжести соответствовали III–IV стадии гиперпластического процесса (рис. 4б).

Введение животным финастерида на фоне тестостерона приводило к заметной регрессии гиперпластического процесса, который у всех животных референсной группы соответствовал папиллярной очаговой гиперплазии I–II стадии (рис. 4в). Железистый эпителий в ацинусах определялся как призматический, без выраженных признаков пролиферации и атипии. Визуально уменьшилось количество митозов в эпителиоцитах. Тем не менее на фоне введения финастерида сохранялась вакуольная дистрофия железистого эпителия, а также выраженная гемодинамическая нарушения в виде венозного полнокровия, отека и лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрации стромы. Наблюдались признаки частичного нарушения оттока секрета из ацинусов с очаговым кистозным расширением и атрофией





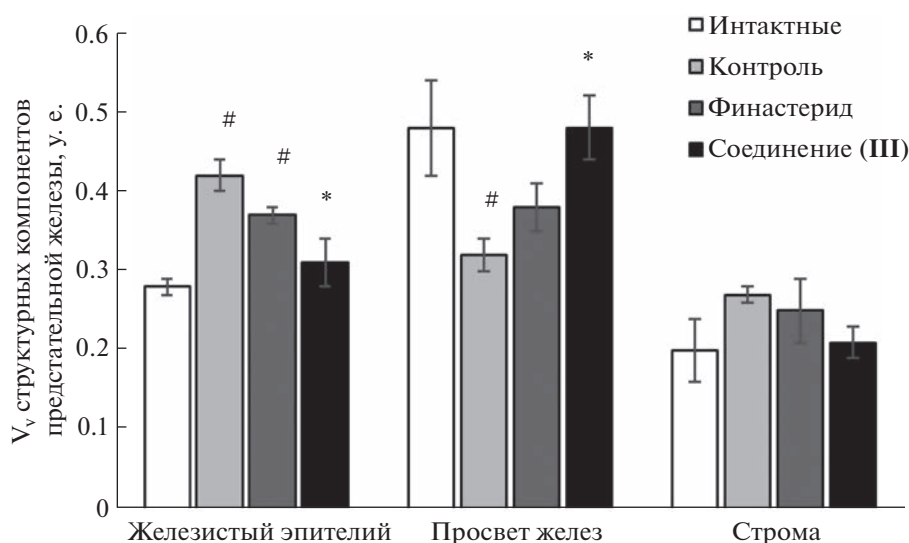
**Рис. 4.** Тестостероновая модель ДГПЖ. Дорсолатеральный отдел предстательной железы крыс линии Wistar. Окрашивание гематоксилин-эозином, увеличение 200 $\times$ . (а) – Интактные животные; (б) – контрольная группа (4-недельное введение тестостерона). Выявленная пролиферация железистого эпителия. Утолщение соединительнотканых прослоек; (в) – референсная группа (4-недельное введение тестостерона и финастерида). Кистозно-расширенные выводные протоки желез и утолщение соединительнотканых прослоек; (г) – опытная группа (4-недельное введение тестостерона и соединения (III)). Железистый эпителий без дистрофических изменений.

эпителия. Просвет желез был заполнен секретом в виде эозинофильной субстанции и слущенными клетками (рис. 4в).

Введение соединения (III) приводило к таким же положительным сдвигам в состоянии предстательной железы, какие отмечены выше у крыс референсной группы. Выявленные сдвиги были связаны с регрессией гиперпластических процессов, особенно в железистой части простаты. Железистый эпителий в ацинусах отмечен как призматический без повышенной митотической активности. При этом в железистом эпителии наблюдалось значительное снижение дистрофических изменений, а также некоторое улучшение гемодинамических процессов в виде слабо выраженного отека стромы и венозного полнокровия. Выводные протоки желез были частично кистозно расширены, с атрофичным эпителием. Просвет желез был заполнен секретом в виде эозинофильной субстанции. Морфологическая картина про-

статы опытных крыс соответствовала папиллярной очаговой гиперплазии I–II стадии (рис. 4г).

Таким образом, в тестостероновой модели ДГПЖ выявлена простатопротекторная активность соединения (III), которая проявлялась в снижении роста железистого эпителия и нормализации просвета желез. Эти наблюдения подтверждаются данными морфометрического анализа железы у этих же животных. Показано, что 4-недельное введение тестостерона достоверно увеличивало объемную плотность железистого эпителия в 1.5 раз и уменьшало просвет желез в 1.5 раза у контрольных животных относительно интактных (рис. 5). Введение соединения (III) на фоне андрогена приводило к существенному снижению объемной плотности эпителия в 1.4 раза относительно контрольной группы, в то время как для финастерида этот эффект был статистически не значимым (рис. 5). Кроме того, под влиянием изучаемого агента (III) просвет желез восстанавливался до показателей



**Рис. 5.** Влияние соединения (III) на показатели объемной плотности компонентов предстательной железы крыс линии Wistar в модели ДГПЖ, индуцированной тестостероном. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  ошибки среднего; <sup>#</sup>  $p < 0.05$  – достоверные различия относительно интактной группы; <sup>\*</sup>  $p < 0.05$  – достоверные различия относительно контрольной группы.

интактной нормы, тогда как при введении референсного препарата данный показатель не имел достоверных различий с контрольной группой (рис. 5). Показатели объемной плотности стромы во всех группах статистически не отличались от интактных животных, что характерно для тестостероновой модели [23].

В модели ДГПЖ, индуцированной сульпиридом, патологические изменения опосредуются гиперпролактинемией – характерным побочным эффектом данного нейролептика [24]. Активизация гипофизарной секреции пролактина вносит свой вклад в патогенез ДГПЖ, который обычно развивается на фоне дисбаланса между андрогенами и пролактином [25]. В предстательной железе, особенно в ее строме, имеется много рецепторов пролактина, которые участвуют в рецепторных отношениях с железистым эпителием, а также в процессах ремоделирования ткани простаты.

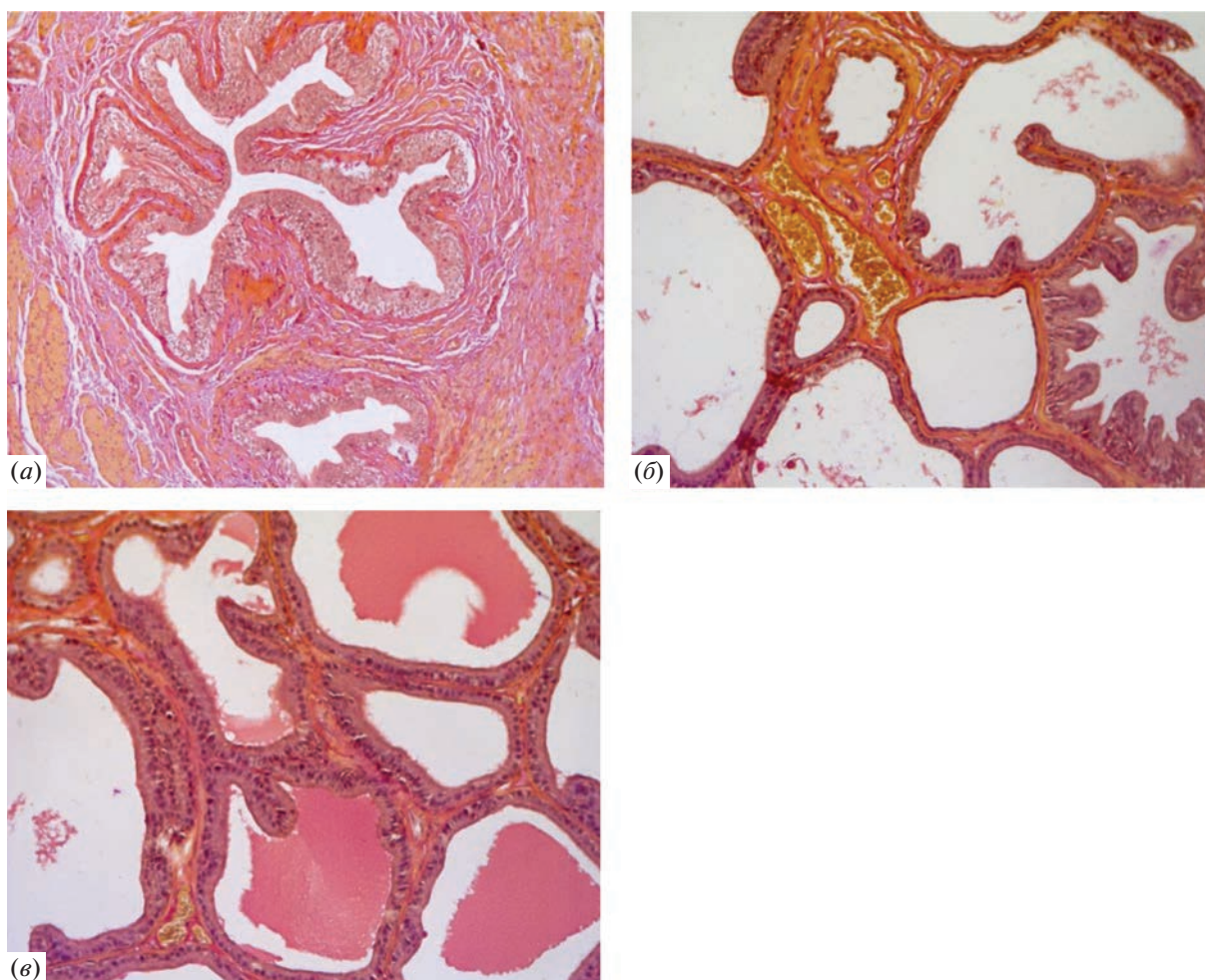
В эксперименте на сульпиридной модели ДГПЖ нами показано, что 8-недельное введение нейролептика вызывало патологические изменения как в железистом, так и в стромальном компартментах простаты. У животных контрольной группы отмечалось развитие очаговой железистой гиперплазии, сходной с описанной выше в тестостероновой модели. К характерным признакам относятся появление новых очагов пролиферации в просвете ацинусов, изменение состояния железистого эпителия, указывающее на его митотическую активность, кистозное расширение простатических желез, заполненных секретом в виде эозинофильной и ШИК-позитивной суб-

станции (мукополисахариды, выявляемые в реакции с Шифф-йодной кислотой). Во всех отделах предстательной железы выявлялись выраженное венозное полнокровие, отек и коллагенизация стромы. Таким образом, выявленные патологические изменения в простате крыс контрольной группы соответствуют II–III стадии гиперпластического процесса (рис. 6а).

В группе животных, получавших сульпирид и препарат сравнения финастерид, отмечалась тенденция к небольшой регрессии гиперпластического процесса по сравнению с контролем, что выражалось в снижении активности пролиферативных процессов как в эпителии, так и в строме простаты. Вместе с тем у всех животных референсной группы зафиксирована умеренная очаговая гиперплазия железистого эпителия, признаки коллагенизации стромы, а также умеренные гемодинамические нарушения в виде полнокровия сосудов и плазматического отека интерстициальной ткани (рис. 6б).

В группе животных, получавших соединение (III) и сульпирид, визуально отмечалось уменьшение патологических изменений в простате, аналогично эффекту финастерида. Это проявлялось в виде менее выраженного пролиферативного процесса в секреторной части простаты по сравнению с крысами контрольной группы. В строме периуретральной зоны сохранялись умеренные гемодинамические нарушения в виде венозного полнокровия и отека, что способствовало затруднению оттока секрета из желез и сопровождалось их кистозным расширением. Стенки





**Рис. 6.** Сульпиридная модель ДГПЖ. Дорсолатеральный отдел предстательной железы крыс линии Wistar. Окрашивание ШИК–гематоксилин–оранжевый G, увеличение 200 $\times$ . (a) – Контрольная группа (8-недельное введение сульпирида). Коллагенизация и отек стромы; (б) – референсная группа (8-недельное введение сульпирида и финастерида). Умеренная гиперплазия железистого эпителия, гемодинамические нарушения в виде полнокровия сосудов и плазматический отек межлочечковой ткани; (в) – опытная группа (8-недельное введение сульпирида и соединения (III)). Отек и коллагенизация стромы.

кровеносных сосудов утолщены, просветы их сужены (рис. 6в).

По данным морфометрического анализа, в результате 8-недельного введения сульпирида объемная плотность стромы простаты у крыс контрольной группы достоверно увеличивалась в 1.4 раза, а просвет желез уменьшался в 1.2 раза относительно интактных животных (рис. 7). Плотность железистого эпителия увеличивалась незначительно (в 1.1 раза).

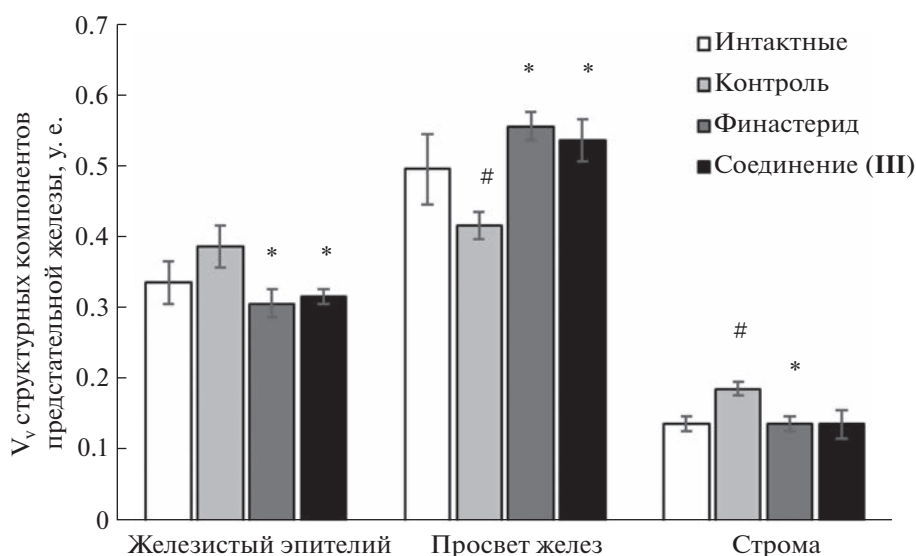
Введение финастерида на фоне сульпирида вызывало у животных достоверное снижение объемной плотности эпителия и стромы простаты относительно контрольной группы (в 1.3 и 1.4 раза соответственно) (рис. 7). Соединение (III) проявляло аналогичный антипролиферативный эффект в эпителии желез, а именно снижение объемной плотности в 1.2 раза относительно

контроля, однако снижение объемной плотности стромы в 1.4 раза против контроля было статистически недостоверным. Показатель просвета желез существенно увеличивался как под влиянием соединения (III), так и финастерида (в 1.3 раза), демонстрируя достоверные различия с контрольной группой (рис. 7).

Таким образом, в сульпиридной модели ДГПЖ введение соединения (III) снижало пролиферативную активность эпителия простаты подобно финастериду. При этом оба агента поддерживали нормальные размеры стромы, характерные для интактных животных.

**Острая токсичность.** Острую токсичность соединения (III) определяли на мышах CD-1 в сравнении с финастеридом и DCA с регистрацией количества летальных исходов в течение 14 сут.





**Рис. 7.** Влияние соединения (III) на показатели объемной плотности компонентов предстательной железы крыс линии Wistar в модели ДГПЖ, индуцированной сульпиридом. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  ошибка среднего; #  $p < 0.05$  – достоверные различия относительно интактной группы; \*  $p < 0.05$  – достоверные различия относительно контрольной группы.

Установлено, что введение агентов в дозе 750 мг/кг не приводило к гибели животных во всех экспериментальных группах. Повышение дозы до 1500 мг/кг вызывало гибель 100% мышей в группе с введением финастеридом и 66% мышей в группе с введением ДСА. Введение соединения (III) в дозе 1500 мг/кг не вызывало гибель животных. Расчетные величины  $LD_{50}$  у финастеридом, ДСА и соединения (III) составили 1060, 1260 и >1500 мг/кг соответственно.

Таким образом, в результате химической модификации ДСА токсичность производного (III) существенно снизилась по сравнению с исходным соединением и финастеридом.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Синтез 3-(пиридин-3'-ил)-5-(24"-нор-3",12"-диоксо-5"- $\beta$ -холан-23"-ил)-1,2,4-оксадиазола (III).** Спектры  $^1H$ - и  $^{13}C$ -ЯМР регистрировали на спектрометрах AV-300 (Bruker, Германия; рабочая частота на ядрах  $^1H$  – 300.13 МГц, на ядрах  $^{13}C$  – 75.47 МГц) и DRX-500 (Bruker, Германия; рабочая частота на ядрах  $^1H$  – 500.13 МГц, на ядрах  $^{13}C$  – 125.76 МГц) с использованием сигнала хлороформа ( $\delta_H$  7.24,  $\delta_C$  76.90 м.д.) в качестве внутреннего стандарта. Химические сдвиги сигналов ( $\delta$ ) приведены в миллионных долях (м.д.), а значения констант взаимодействия ( $J$ ) – в герцах (Гц). Строение полученных соединений устанавливали на основе анализа спектров  $^1H$ - и  $^{13}C$ -ЯМР с привлечением спектров двойного резонанса  $^1H$ - $^1H$ , двумерных спектров гомоядерной корреляции

$^1H$ - $^1H$  ( $^1H$ - $^1H$  COSY) и двумерных спектров гетероядерной корреляции  $^{13}C$ - $^1H$  на прямых (C–H COSY,  $^1J_{C,H}$  160) и дальних константах спин-спинового взаимодействия (COLOC,  $^{2,3}J_{C,H}$  10). В спектрах  $^1H$ -ЯМР указаны химические сдвиги только характеристических сигналов, поскольку остов молекулы в ходе реакции сохраняется. Температуры плавления определяли на приборе FP900 (Mettler Toledo, Швейцария). Точные значения масс молекулярных ионов определяли на масс-спектрометре высокого разрешения с двойной фокусировкой DFS (Double Focusing Sector Mass Spectrometer, DFS High Resolution GC/MS; Thermo Scientific, США). Оптическое вращение измеряли с помощью поляриметра PolAAR 3005 (Optical Activity, Великобритания). ВЭЖХ-анализ проводили на приборе Milichrom A-02 (Эконова, Россия), используя в качестве сорбента ProntoSIL 120-5-C18 AQ (размер частиц 5 мкм, колонка 2.0  $\times$  75 мм). Подвижная фаза: очищенная вода Millipore с 0.1% трифторуксусной кислоты, скорость потока 150 мкл/мин при 35°C с УФ-детектированием на пяти длинах волн (210, 220, 240, 260, 280 нм). Стандартное время процесса 25 мин, линейный градиент метанола 0–100%. Чистота целевого соединения для биологических испытаний составляла  $\geq 99.5\%$  (подтверждена ВЭЖХ-анализом). Ход реакций и чистоту полученных продуктов контролировали методом ТСХ на пластинах Silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Германия) с использованием хлороформа и систем хлороформ–метанол в различных соотношениях. Очистку продуктов реакции проводили колоночной хроматографией на силика-

геле (Merck, 60–200 mesh, Masherey-Nagel GmbH & Co. KG, Германия). Все растворители, используемые в реакциях и хроматографическом разделении, предварительно перегоняли и сушили в соответствии со справочными данными. В работе использовали дезоксихолевую кислоту (ДСА, 99%) (abcg GmbH & Co. KG, Германия); *N,N'*-карбонилдиимидазол (97%) и 3-цианопиридин (98%) (Acros Organics, Бельгия).

3,12-Диоксо-5 $\beta$ -холан-24-овую кислоту (I) получали окислением ДСА реагентом Джонса с выходом 95% по известным методикам [10, 11], сигналам спектров  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР хорошо согласуются с литературными данными [26].

*N'*-Гидроксиникотинимидаид получали из 3-цианопиридина в соответствии с литературной методикой [27] и использовали в синтезе без дополнительной очистки.

***N'*-(3,12-Диоксо-5 $\beta$ -холан-24-илокси)-никотинимидаид (II).** К 3,12-диоксо-5 $\beta$ -холан-24-овой кислоте (I) (4.0 г, 10.3 ммоль) в сухом  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 мл) при перемешивании добавляли порциями в течение 15 мин *N,N'*-карбонилдиимидазол (1.8 г, 11.3 ммоль). Через 2 ч добавляли *N'*-гидроксиникотинимидаид (1.6 г, 11.3 ммоль) и оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 12 ч. Ход реакции контролировали ТСХ. Реакционную смесь промывали водой, затем насыщенным раствором NaCl, сушили  $\text{MgSO}_4$ . Растворитель удаляли, масса сырого продукта (II) составила 5.2 г (количественный выход). Имидаид (II) использовали в последующей реакции без дополнительной очистки. Аналитически чистый образец соединения (II) очищали колоночной хроматографией ( $\text{SiO}_2$ , элюент  $\text{CHCl}_3$  с градиентом MeOH 0–4.0%) в виде бесцветной аморфной массы. Т. пл. 129.8–130.5°C,  $[\alpha]_D^{23} +63$  (с 0.20,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 500 МГц):  $\delta$  8.84 (м, 1H,  $^4J$  1.7, H-2"), 8.61 (м, 1H,  $^3J$  4.8,  $^4J$  1.5, H-6"), 8.05 (м, 1H,  $^3J$  8.0,  $^4J$  1.8, H-4"), 7.32 (м, 1H,  $^3J$  8.0,  $^3J$  4.8, H-5"), 5.42 (ш.с, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 1.06 (с, 3H,  $\text{CH}_3$ -19), 1.02 (с, 3H,  $\text{CH}_3$ -18), 0.85 (д, 3H,  $^3J_{21,20}$  6.3,  $\text{CH}_3$ -21). Сигналы остальных протонов лежат в области 1.00–2.68 м.д.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 75 МГц):  $\delta$  214.5 (с, C-12), 212.4 (с, C-3), 171.5 (с, C-24), 153.9 (с, C-3'), 151.4 (д, C-6"), 147.3 (д, C-2"), 134.8 (д, C-4"), 127.4 (с, C-3"), 123.4 (д, C-5"), 58.5, 57.5, 46.2, 44.2, 43.5, 41.9, 38.2, 36.7, 36.6, 35.4, 35.3, 35.2, 30.3, 29.8, 27.3, 26.4, 25.3, 24.1, 21.9 (к, C-19), 18.4 (к, C-21), 11.6 (к, C-18).

**3-(Пиридин-3'-ил)-5-(24"-нор-3", 12"-диоксо-5 $\beta$ -холан-23'ил)-1,2,4-оксадиазол (III).** К перемешиваемому раствору имидаида (II) (2.03 г, 4.0 ммоль) в DMSO (20 мл) при 60°C добавляли KOH (0.67 г, 12.0 ммоль). Ход реакции контролировали ТСХ. Реакционную смесь охлаждали до

комнатной температуры, добавляли  $\text{H}_2\text{O}$  (100 мл) и экстрагировали  $\text{AcOEt}$  (3  $\times$  70 мл). Объединенные органические вытяжки промывали  $\text{H}_2\text{O}$ , насыщенным раствором NaCl, сушили  $\text{MgSO}_4$ . Растворитель удаляли, масса реакционной смеси составляла 1.9 г. Очистку продукта (III) проводили колоночной хроматографией ( $\text{SiO}_2$ , элюент  $\text{CHCl}_3$  с градиентом MeOH 0–3.0%). Масса 1,2,4-оксадиазольного производного (III) составляла 1.14 г (выход 58%, в виде бесцветной прозрачной аморфной массы). Т. пл. 171.2–172.6°C,  $[\alpha]_D^{20} +73$  (с 0.20;  $\text{CHCl}_3$ ). HRMS:  $m/z$  вычисл.  $\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{O}_3\text{N}_3^+$  489.2986; найдено 489.2985.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 500 МГц):  $\delta$  9.26 (м, 1H,  $^4J$  1.7,  $^5J$  0.7, H-2"), 8.69 (м, 1H,  $^3J$  4.9,  $^4J$  1.6, H-6"), 8.30 (м, 1H,  $^3J$  8.0,  $^4J$  1.8, H-4"), 7.38 (м, 1H,  $^3J$  8.0,  $^3J$  4.8, H-5"), 3.0 (ддд, 1H,  $^2J$  15.8,  $J_{23,22}$  9.8,  $J_{23,22'}$  5.3, H-23), 2.89 (ддд, 1H,  $^2J$  15.8,  $J_{23,22'}$  9.2,  $J_{23,22}$  6.8, H-23'), 2.58 (дд, 1H,  $^2J = J_{11a,9a} = 12.5$ , H-11a), 2.54 (дд, 1H,  $^2J$  15.0,  $J_{4a,5a}$  13.3, H-4a), 2.30 (ддд, 1H,  $^2J = J_{2a,1a} = 14.7$ ,  $J_{2a,1e}$  5.2, H-2a), 1.08 (с, 3H,  $\text{CH}_3$ -19), 1.03 (с, 3H,  $\text{CH}_3$ -18), 0.84 (д, 3H,  $^3J_{21,20}$  6.3,  $\text{CH}_3$ -21). Сигналы остальных протонов лежат в области 1.00–2.68 м.д.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 125 МГц):  $\delta$  213.7 (с, C-12), 211.7 (с, C-3), 180.7 (с, C-5'), 166.2 (с, C-3'), 151.8 (д, C-6"), 148.5 (д, C-2"), 134.5 (д, C-4"), 123.4 (д, C-5"), 123.2 (с, C-3), 58.4, 57.4, 46.3, 44.2, 43.5, 42.0, 38.2, 36.7, 36.6, 35.5, 35.5, 35.3, 32.1, 27.4, 26.5, 25.3, 24.1, 23.8, 22.0 (к, C-19), 18.4 (к, C-21), 11.6 (к, C-18).

**Молекулярный докинг.** Молекулярное моделирование осуществляли в среде визуализации Schrodinger Maestro с использованием приложений из пакета Schrodinger Small Molecule Drug Discovery Suite 2017-1 [12]. Трехмерные структуры производных получали эмпирически в приложении LigPrep с использованием силового поля OPLS3 [13]. Принимали во внимание все возможные таутомерные формы соединений, а также все ионизированные формы соединений в диапазоне pH 7.0  $\pm$  2.0. Для расчетов применяли модель 5- $\alpha$ -редуктазы (PDB ID 7BW1 [14], разрешение 2.8 Å). Для моделирования возможного механизма связывания с выбранной мишенью выполняли молекулярный докинг соединений в сайт связывания аддукта финастерида и NADP-H в приложении Glide [28]. Область поиска для расчетной функции докинга выбирали автоматически, исходя из размеров и физико-химических свойств аддукта. Применяли алгоритм повышенной точности докинга XP (extra precision). Докинг проводили в сравнении с аддуктом финастерида и NADP-H. Его трехмерную структуру получали в базе данных PubChem и подготавливали в приложении LigPrep. Нековалентные взаимодействия соединений в сайте связывания визуализировали с помощью Biovia Discovery Studio Visualizer [29].

**Простатопротекторные свойства.** Простатопротекторные свойства соединения (III) изучали в двух гормон-зависимых моделях ДГПЖ. В эксперименте использовали самцов крыс линии Wistar массой 250–350 г (возраст 3.5 мес.), полученных из вивария ФИЦ Института цитологии и генетики СО РАН. Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к воде и стандартному гранулированному корму, с влажностью и температурным контролем, 12-часовым циклом света и темноты.

**Тестостероновая модель ДГПЖ.** Животных разделили на четыре группы, по пять крыс в каждой. Крысам контрольной, референсной и опытных групп ежедневно вводили подкожно тестостерона пропионат (Дальхимфарм, Россия) в дозе 20 мг/кг [18]. Через час после инъекции тестостерона крысам опытных групп вводили внутрижелудочно водно-твиновую суспензию соединения (III) в дозе 20 мг/кг, референсной группе – финастерид (Пенестер, Zentiva, Чехия) в дозе 10 мг/кг, контрольной группе – водно-твиновую суспензию. Для приготовления суспензий в воду добавляли 1% твина-80. Доза финастерида выбрана на основе анализа литературных данных [30], а доза исследуемого соединения – исходя из предварительных экспериментов. Интактных животных не подвергали воздействиям. Длительность эксперимента составила 28 сут. Всех животных выводили из эксперимента декапитацией, далее проводили вскрытие животных и забор биологического материала. Ткань простаты подвергали стандартной гистологической обработке и исследовали светооптическим методом. Изменения объемных показателей структурных компонентов ткани предстательной железы количественно оценивали методом морфометрического анализа.

**Сульпиридная модель ДГПЖ.** Животных разделили на четыре группы, по пять крыс в каждой. Крысам контрольной, референсной и опытной групп ежедневно вводили внутривентриально сульпирид (Санофи, Франция) в дозе 40 мг/кг [19]. Через час после введения сульпирида крысам опытных групп вводили внутрижелудочно водно-твиновую суспензию соединения (III) в дозе 20 мг/кг, референсной группе – финастерид (Пенестер, Zentiva, Чехия) в дозе 10 мг/кг, контрольной группе – водно-твиновую суспензию. Группа интактных животных не подвергалась воздействиям. Длительность эксперимента составила 60 сут. Всех животных выводили из эксперимента, забирали биологический материал и проводили исследования, аналогичные предыдущей модели.

**Морфометрический анализ срезов.** Анализ проводили при 400× увеличении микроскопа с использованием окулярной сетки на 289 точек. Подсчет объемной плотности ( $V_v$ ) эпителия, ин-

терстициальной ткани и просвета желез проводили в 25 полях зрения каждого препарата (пять снимков от одного животного). Объемную плотность каждого структурного компонента определяли по его доле по формуле:  $V_v = x/n$ , где  $x$  – количество точек, приходящихся на определенный структурный компонент;  $n$  – общее количество подсчитанных точек [31].

**Острая токсичность.** Острую токсичность оценивали на мышах-самцах CD-1 массой 20–25 г (возраст 2 мес.), полученных из вивария ФИЦ Института цитологии и генетики СО РАН. Соединения вводили внутрижелудочно через зонд в виде водно-твиновой суспензии в дозах 750 и 1500 мг/кг. В каждой группе было по шесть животных. Наблюдения за животными проводили через 1, 4 и 24 ч в первые сутки, а затем 1 раз в сутки в течение 14 сут с регистрацией количества летальных исходов. Величину среднесмертельной дозы определяли методом пробит-анализа по Литчвилду–Уилкоксона по логарифмической шкале “доза–эффект” [32].

**Статистическая обработка данных.** Использовали пакет программ Statistica 8.0 (Stat Soft. Inc., США). Для представления количественных показателей в таблицах вычисляли среднее значение и стандартную ошибку среднего. Межгрупповое сравнение данных проводили с помощью  $U$ -критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при  $p \leq 0.05$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе представлен синтез нового 1,2,4-оксадиазольного производного дезоксихолево́й кислоты, содержащего в 3-м положении гетероцикла *meta*-пиридиновый фрагмент (III). В эксперименте *in silico* показан механизм образования связи соединения (III) в сайте связывания с 5-АР по аналогии с аддуктом финастерида и NADP. Установлено, что соединение (III) и финастерид имеют сопоставимые величины показателей энергии связывания (–15.20 и –20.50 ккал/моль соответственно). В экспериментах *in vivo* на двух моделях ДГПЖ, индуцированных тестостероном и сульпиридом у крыс Wistar, соединение (III) при внутрижелудочном введении в дозе 20 мг/кг проявляло значимый антипролиферативный эффект в железистом эпителии и строме простаты, который по выраженности не уступал эффекту финастерида в эффективной дозе (10 мг/кг). На мышах CD-1 показано, что производное (III) менее токсично ( $LD_{50} > 1500$  мг/кг), чем финастерид ( $LD_{50} = 1060$  мг/кг).

Таким образом, новое 1,2,4-оксадиазольное производное дезоксихолево́й кислоты можно рассматривать как перспективный агент, простатопротектор.

текторный эффект которого при ДГПЖ с высокой вероятностью связан с ингибированием 5-AR.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

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

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке базовых проектов фундаментальных научных исследований Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН № 1021051402785-4-1.4.1 и 1021051703312-0-1.4.1.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными проводили в строгом соответствии с законодательством России, Приказом Минздрава России № 199н от 01.04.2015 г. и положениями Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 г. о защите животных, используемых в научных целях.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Launer B.M., McVary K.T., Ricke W.A., Lloyd G.L.* // *BJU Int.* 2021. V. 127. P. 722–728. <https://doi.org/10.1111/bju.15286>
2. *Lim K.B.* // *Asian J. Urol.* 2017. V. 4. P. 148–151. <https://doi.org/10.1016/j.ajur.2017.06.004>
3. *Carson C., Rittmaster R.* // *Urology.* 2003. V. 61. P. 2–7. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(03\)00045-1](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(03)00045-1)
4. *Vickman R.E., Franco O.E., Moline D.C., Vander Griend D.J., Thumbikat P., Hayward S.W.* // *Asian J. Urol.* 2020. V. 7. P. 191–202. <https://doi.org/10.1016/j.ajur.2019.10.003>
5. *La Vignera S., Condorelli R.A., Russo G.I., Morgia G., Calogero A.E.* // *Andrology.* 2016. V. 4. P. 404–411. <https://doi.org/10.1111/andr.12186>
6. *Thiruchelvam N.* // *Renal and Urological Surgery III.* 2014. V. 32. P. 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2014.04.006>
7. *Gravas S., Cornu J.N., Drake M.J., Gacci M., Gratzke C., Herrmann T.R.W., Madersbacher S., Mamoulakis C., Tikkinen K.A.O.* // *Eur. Assoc. Urol.* 2018. <https://uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-Guidelines-on-the-Management-of-Non-neurogenic-Male-LUTS-2018-large-text.pdf>
8. *Kim E.H., Brockman J.A., Andriole G.L.* // *Asian J. Urol.* 2018. V. 5. P. 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.ajur.2017.11.005>
9. *Сорокина И.В., Попадюк И.И., Жукова Н.А., Низомов С.А., Мешикова Ю.В., Баев Д.С., Саломатина О.В., Толстикова Т.Г., Салахутдинов Н.Ф.* // Патент RU 2 750 488 C1, 2021.
10. *Huang Y., Cui J., Jia L., Gan C., Song H., Zeng C., Zhou A.* // *Molecules.* 2013. V. 18. P. 7436–7447. <https://doi.org/10.3390/molecules18077436>
11. *Verzele D., Maddar A.* // *J. Org. Chem.* 2007. P. 1793–1797. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200600972>
12. Schrodinger Small Molecule Drug Discovery Suite. 2017. <https://www.schrodinger.com>
13. *Harder E., Damm W., Maple J., Wu C., Reboul M., Xiang J.Y., Wang L., Lupyan D., Dahlgren M.K., Knight J.L., Kaus J., Cerutti D., Krilov G., Jorgensen W., Abel R., Fricner R.* // *J. Chem. Theory Comput.* 2016. V. 12. P. 281–296. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00864>
14. *Xiao Q., Wang L., Supekar S., Shen T., Liu H., Ye F., Huang J., Fan H., Wei Z., Zhang C.* // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. P. 1–10. <https://doi.org/10.1038/S41467-020-19249-Z>
15. *Makino C., Watanabe A., Deguchi T., Shiozawa H., Schreck I., Rozehnal V., Ishizuka T., Watanabe N., Ando O., Murayama N., Yamazaki H.* // *Xenobiotica.* 2019. V. 49. P. 961–969. <https://doi.org/10.1080/00498254.2018.1514545>
16. *Tsalia C.D., Madatian A., Schubert E.M., Xia F., Hardesty W., Deng Y., Seymour J.L., Gorychi P.D.* // *Drug Metab. Dispos.* 2011. V. 39. P. 1620–1632. <https://doi.org/10.1124/dmd.110.036467>
17. *Makridakis N., Akalu A., Reichardt J.K.V.* // *Oncogene.* 2004. V. 23. P. 7399–7405. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207922>
18. *Li J., Tian Y., Guo S., Gu H., Yuan Q., Xie X.* // *PLoS One.* 2018. V. 13. P. 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191469>
19. *Миронов А.Н., Бунятян Н.Д.* // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К., 2012. 944 с.
20. *Altavilla D., Minutoli L., Polito F., Irrera N., Arena S., Magno C., Rinaldi M., Burnett B.P., Squadrito F., Bitto A.* // *Br. J. Pharmacol.* 2012. V. 167. P. 95–108. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01969.x>
21. *Hsu C.Y., Lin Y.S., Weng W.C., Panny L., Chen H.L., Tung M.C., Ou Y.C., Lin C.C., Yang C.H.* // *Life.* 2021. V. 11. P. 743. <https://doi.org/10.3390/life11080743>
22. *Veeresh Babu S.V., Veeresh B., Patil A.A., Warke Y.B.* // *Eur. J. Pharmacol.* 2010. V. 626. P. 262–265. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.09.037>
23. *Сорокина И.В., Жукова Н.А., Мешикова Ю.В., Баев Д.С., Толстикова Т.Г., Бакарев М.А., Лушикова Е.Л.* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2022. Т. 173. С. 656–663. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2022-173-5-656-663>
24. *Van Coppenolle F., Slomianny C., Carpentier F., Le Bourhis X., Achidouch A., Croix D., Legrand G., Dewailly E., Fournier S., Cousse H., Authie D., Raynaud J.-P., Beauvillain J.-C., Dupouy J.-P., Prevarskaya N.* // *Am.*

- J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2001. V. 280. P. 120–129.  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.280.1.e120>
25. Тюзиков И.А., Мартюв А.Г. // Андрология. 2012. № 3. С. 39–47.
26. Han Y.T., Yun H. // Org. Prep. Proc. Int. 2017. V. 49. P. 163–168.  
<https://doi.org/10.1080/00304948.2017.1291005>
27. Shruthi N., Poojary B., Kumar V., Hussain M.M., Rai V.M., Pai V.R., Bhat M., Revannasiddappa B.C. // RSC Adv. 2016. V. 6. P. 8303–8316.  
<https://doi.org/10.1039/C5RA23282A>
28. Friesner R.A., Murphy R.B., Repasky M.P., Frye L.L., Greenwood J.R., Halgren T.A., Sanschagrin P.C., Mainz D.T. // J. Med. Chem. 2006. V. 49. P. 6177–6196.  
<https://doi.org/10.1021/jm051256o>
29. Biovia Discovery Studio Visualizer. 2016.  
<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>
30. Jeon W.-Y., Kim O.S., Seo C.-S., Jin S.E., Kim J.-A., Shin H.-K., Kim Y., Lee Y. // BMC Complement. Altern. Med. 2017. V. 17. P. 384.  
<https://doi.org/10.1186/s12906-017-1877-y>
31. Автандилов Г.Г. // Медицинская морфометрия. М.: Медицина, 1990. 384 с.
32. Саноцкий И.В. // Методы определения токсичности и опасности химических веществ (токсикометрия). Москва: Медицина, 1970. 99 с.

## Experimental Assessment of 3-*meta*-Pyridine-1,2,4-Oxadiazole Deoxycholic Acid Derivative as a Prototype of 5- $\alpha$ -Reductase Inhibitors *in silico* and *in vivo* Models

Yu. V. Meshkova\*, D. S. Baev\*, I. V. Sorokina\*,<sup>#</sup>, I. I. Popadyuk\*, O. V. Salomatina\*, N. A. Zhukova\*, T. G. Tolstikova\*, and N. F. Salakhutdinov\*

<sup>#</sup>Phone: +7 (383) 330-36-63; e-mail: sorokina.irina55@gmail.com

\*Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS, prosp. Lavrentieva 9, Novosibirsk, 630090 Russia

5- $\alpha$ -Reductase (5-AR) inhibitors are considered the most effective drugs in the treatment of proliferative processes in prostate adenoma. These include two synthetic azasteroids – finasteride and dutasteride, which cause side effects in conditions of long-term course therapy which form the disorders of sexual function in men. We propose 3-*meta*-pyridine-1,2,4-oxadiazole derivative of deoxycholic acid as prototype of low-toxic 5-AR inhibitors. It has been shown that the new agent is able to penetrate the 5-AR binding site through the formation of covalent adducts with NADP-H, like finasteride. At the same time, both ligands have comparable with the target binding energy values (–20 and –15 kcal/mol, respectively, for finasteride and target compound). In experiments on testosterone and sulphiride models of BPH, we have found that intragastric administration of DCA derivative at a dose of 20 mg/kg and finasteride at a dose of 10 mg/kg has a similar prostatoprotective effect by reducing proliferative processes in the glandular epithelium and prostate stroma of rats. The new agent is less toxic than finasteride: the LD<sub>50</sub> value in mice is >1500 mg/kg versus 1060 mg/kg in finasteride. Based on the results obtained, the 3-*meta*-pyridine-1,2,4-oxadiazole derivative of deoxycholic acid can be considered as a promising candidate for preclinical testing.

**Keywords:** 5- $\alpha$ -reductase inhibitors, oxadiazole derivatives of deoxycholic acid, toxicity, benign prostatic hyperplasia, rats



## ПОЛУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ ФИЦИНА С КАРБОКСИМЕТИЛХИТОЗАНОМ И *N*-(2-ГИДРОКСИ)ПРОПИЛ-3-ТРИМЕТИЛАММОНИЙХИТОЗАНОМ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ

© 2023 г. Н. В. Малыгина\*, С. С. Ольшаникова\*, М. Г. Холявка\*. \*\*, #, А. В. Сорокин\*, \*\*, М. С. Лавлинская\*, \*\*, В. Г. Артюхов\*, Д. А. Файзуллин\*\*\*, Ю. Ф. Зуев\*\*\*

\* Воронежский государственный университет, Россия, 394018 Воронеж, Университетская пл., 1

\*\* Севастопольский государственный университет, Россия, 299053 Севастополь, ул. Университетская, 33

\*\*\* Казанский институт биохимии и биофизики, Федеральный исследовательский центр "Казанский научный центр" РАН, Россия, 420111 Казань, ул. Лобачевского, 2/31

Поступила в редакцию 27.04.2022 г.

После доработки 30.05.2022 г.

Принята к публикации 01.06.2022 г.

Синтезированы производные хитозана – карбоксиметилхитозан и *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозан с молекулярными массами 200, 350 и 600 кДа. Получены комплексы фицина с хитозаном и его названными производными, зарегистрированы ИК-спектры хитозана, карбоксиметилхитозана и *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозана и их комплексов с фицином. Анализ спектров подтвердил образование конъюгатов между макромолекулами полисахаридов и фицина. Оптимальное соотношение содержания белка (0.7 мг/г носителя) и удельной активности (1590 ед./мг белка) выявлено при образовании комплекса фицина с *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозаном с молекулярной массой 350 кДа. Эффективность комплексообразования фицина (по удельной каталитической активности) с *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозаном (350 кДа) превышает таковую для хитозана (350 кДа) и карбоксиметилхитозана (350 кДа) в 2.4 и 9.8 раз соответственно. Методом молекулярного докинга изучены типы взаимодействий, энергии первого связывания, аминокислотный состав поверхностей фицина, которые в процессе комплексообразования взаимодействуют с носителем. Установлено, что связи и взаимодействия с хитозаном и его производными образуются в том числе с участием аминокислотных остатков, расположенных вблизи активного центра фицина (Cys25 и His162), что объясняет изменение протеолитической активности полученных комплексов. Комплексы фицина с *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозаном растворимы в широком диапазоне pH среды и поэтому могут оказывать более перспективными, чем его комплексы с хитозаном, при разработке медицинских препаратов и биокатализаторов для пищевой, пивоваренной и кожевенной промышленности.

*Ключевые слова:* карбоксиметилхитозан, *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозан, фицин, комплексообразование

DOI: 10.31857/S0132342322060173, EDN: FSCCFU

### ВВЕДЕНИЕ

Фицин (КФ 3.4.22.3) – протеолитический фермент класса гидролаз, обладающий противовоспалительными, ранозаживляющими и противовоспалительными свойствами, которые обуславливают его применение в биотехнологии, медицине и косметологии. Фицин выделяют из латекса растений рода *Ficus*. Молекула фицина содержит две

сульфгидрильные группы, из которых только одна находится в активном центре фермента. Молекулярная масса энзима составляет 23 кДа, pH-оптимум действия 7.0, температурный оптимум 60–65°C [1, 2].

Использование свободных форм ферментов в различных отраслях производства затруднено вследствие того, что они неустойчивы при хранении, а также подвержены действию внешних факторов. Эти проблемы можно преодолеть с помощью комплексообразования белка с полимерным носителем. Кроме того, изучение иммоби-

Сокращения: ГПХ – *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозан; КМХ – карбоксиметилхитозан.

# Автор для связи: (тел.: +7 (473) 220-85-86; эл. почта: holyavka@rambler.ru).

лизованных ферментов и их систем способствует расширению теоретических знаний о путях регулирования структурно-функциональных свойств энзимов [3–6].

Попытки получить иммобилизованные формы фицина неоднократно описаны в литературе. В качестве носителей были использованы глиоксил-агароза [7, 8], поливиниловый спирт [9], композитные материалы [10]. Эффективность иммобилизации фицина на этих носителях, рассчитанная как процент сохранения удельной каталитической активности фермента, составила 60, 74 и 90% соответственно.

Известно, что перспективными носителями для иммобилизации ферментов являются хитозан и его производные. Хитозан – это статистический сополимер, состоящий из остатков D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина, связанных между собой 1,4-β-гликозидными связями. Важнейшие свойства данного полимера – биodeградируемость, гипоаллергенность, антимикробная активность, противовоспалительные и противоопухолевые свойства. Хитозан характеризуется способностью образовывать растворы с высокой вязкостью и обладает высокой хелато- и комплексообразующей способностью, возможностью формировать межмолекулярные водородные связи, а также реакционноспособными группами, обеспечивающими возможность его химических модификаций. В условиях pH-оптимума цистеиновых протеаз хитозан нерастворим в воде, что ограничивает доступность центров его макромолекул для взаимодействий с белком, поэтому представляет интерес рассмотреть в качестве полимеров для комплексообразования с фицином растворимые при pH 7.5 производные хитозана [11–13]. Карбоксиметилхитозан (КМХ) применяется в производстве высокотехнологичной косметики, хелатирующих агентов тяжелых металлов, агентов замедленного высвобождения лекарств, регуляторов роста растений, а также для очистки сточных вод [14]. N-(2-Гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозан (ГПХ) – одно из производных хитозана, полученных путем алкилирования. Этот носитель менее подвержен действию pH среды и хорошо растворим в воде. Он нашел широкое применение во многих отраслях производства, например, в химической, фармацевтической промышленности, а также при получении наночастиц [15].

Предсказание особенностей взаимодействия фицина с молекулами полисахаридов помогает минимизировать эмпирические эксперименты по подбору оптимальной матрицы для комплексообразования. Молекулярный докинг позволяет

предварительно оценить положение лиганда относительно поверхности молекулы фермента [16], а с помощью ИК-спектроскопии можно исследовать в молекулах белков и полисахаридов функциональные группы и другие фрагменты [17, 18]. Сочетание методов ИК-спектроскопии и гибкого молекулярного докинга позволяет выявлять функциональные группы модифицированных полисахаридов, а также аминокислотные остатки на поверхности молекулы фицина с указанием типов взаимодействий, образующих конъюгат энзим–носитель.

Целью данной работы явилось получение комплексов фицина с карбоксиметилхитозаном и N-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозаном и изучение их структурных особенностей.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Синтез производных хитозана.** На первом этапе работы по известным методикам с небольшими модификациями (см. “Эксперим. часть”) из коммерческого хитозана (ЗАО “Биопродвесс”, Россия) были синтезированы производные – карбоксиметилхитозан и N-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозан с молекулярными массами 200, 350 и 600 кДа.

**Получение комплексов фицина с полисахаридами. ИК-спектроскопия.** Были получены комплексы протеолитического фермента фицина (Sigma, США) с полисахаридами: хитозаном и его синтезированными производными – карбоксиметилхитозаном и N-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозаном. Для подтверждения факта комплексообразования между молекулами фицина и полисахаридов были зарегистрированы и проанализированы ИК-спектры полученных образцов.

На рис. 1 представлены ИК-спектры хитозана и его комплекса с фицином. ИК-спектр полисахарида содержит следующие характеристические полосы. Полосы 2921 и 2875 см<sup>-1</sup> относятся к валентным антисимметричным и симметричным колебаниям связей С–Н. Положение их типично для полисахаридов. Остаточные N-ацетильные группы проявляются полосами ~1645 (валентные С=О, амид I) и 1325 (валентные С–N, амид III) см<sup>-1</sup>. Полоса амид II (деформационные N–H), обычно присутствующая при 1550 см<sup>-1</sup>, в данном случае скрыта сильной близко расположенной полосой деформационных N–H первичных аминов на 1589 см<sup>-1</sup>. Деформационные колебания групп CH<sub>2</sub> и CH<sub>3</sub> проявляются при 1423 и 1375 см<sup>-1</sup> соответственно. Узкая полоса на 1150 см<sup>-1</sup> соответ-



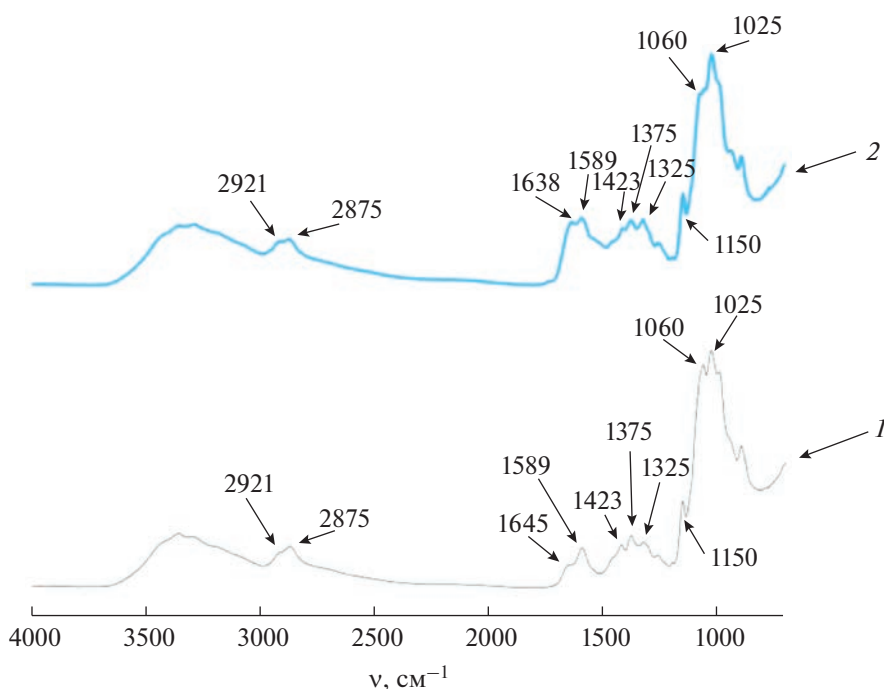


Рис. 1. ИК-спектры хитозана (1) и его комплекса с фицином (2).

ствует поглощению гликозидной связи  $C-O-C$ , а компоненты  $1060$  и  $1025\text{ см}^{-1}$  относятся к валентным колебаниям связи  $C-O$  в структуре пиранозных колец [19, 20]. В ИК-спектре комплекса хитозана с фицином присутствуют описанные выше полосы, однако их относительная интенсивность и положение меняются из-за наложения спектра поглощения белка. Так, видимый максимум полосы амид I смещается к  $1638\text{ см}^{-1}$ , проявляются белковые полосы амид II и амид III. Из-за наложения амидных полос хитозана и белка трудно судить о характере взаимодействия по группам  $N-H$  и  $C=O$ . Однако в области поглощения связей  $C-O$  боковых групп пиранозных колец относительное падение интенсивности компоненты  $1060\text{ см}^{-1}$  в спектре комплекса по сравнению с чистым хитозаном свидетельствует по меньшей мере о том, что взаимодействие с белком затрагивает боковые  $OH$ -группы полисахарида.

На рис. 2 представлены ИК-спектры карбоксиметилхитозана и его комплекса с фицином. По сравнению с немодифицированным хитозаном, в них проявились интенсивные полосы  $1590$ ,  $1410$  и  $1320\text{ см}^{-1}$ , обусловленные колебаниями карбоксильных групп  $\nu_{as}COO^-$ ,  $\nu_{s}COO^-$  и  $\rho\nu_{CH_2}$  соответственно [21]. Дополнительная связь  $C-O-C$  в боковой цепи карбоксиметилхитозана проявляется компонентой  $1120\text{ см}^{-1}$ . Присутствие белка в спектре комплекса обнаруживается по повышен-

ному поглощению при  $1650\text{ см}^{-1}$  на склоне полосы  $1590\text{ см}^{-1}$ . Как и в случае немодифицированного хитозана, комплексообразование полисахарида с белком приводит к падению интенсивности компоненты  $1060\text{ см}^{-1}$  относительно компоненты  $1025\text{ см}^{-1}$ . Указанные изменения подтверждают образование конъюгата между макромолекулами карбоксиметилхитозана и молекулами фицина.

На рис. 3 представлены ИК-спектры  $N$ -(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозана и его комплекса с фицином. ИК-спектр  $N$ -(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозана содержит следующие характеристические признаки, отличающие его от спектра немодифицированного хитозана:  $2926$  и  $1478\text{ см}^{-1}$  – валентное и деформационное колебания  $C-N$  триметиламмонийных групп, отсутствие полосы при  $1590$ – $1600\text{ см}^{-1}$  деформационного колебания первичных аминогрупп вследствие замены на вторичные амины, увеличенная интенсивность полосы валентных  $OH$ -колебаний за счет дополнительной гидроксильной группы [22, 23]. Форма полосы колебаний групп в составе пиранозных остатков в сравнении с хитозаном изменений не претерпела. При этом, как и в предыдущих двух случаях, комплексообразование с белком приводит к падению интенсивности компоненты  $1060$  относительно  $1025\text{ см}^{-1}$ .

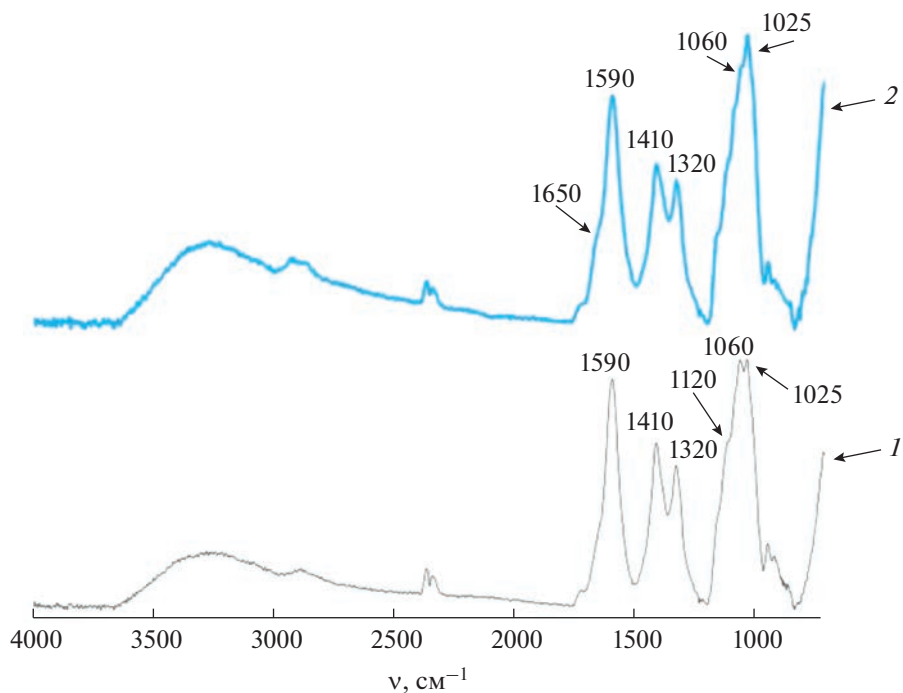


Рис. 2. ИК-спектры карбоксиметилхитозана (1) и его комплекса с фицином (2).

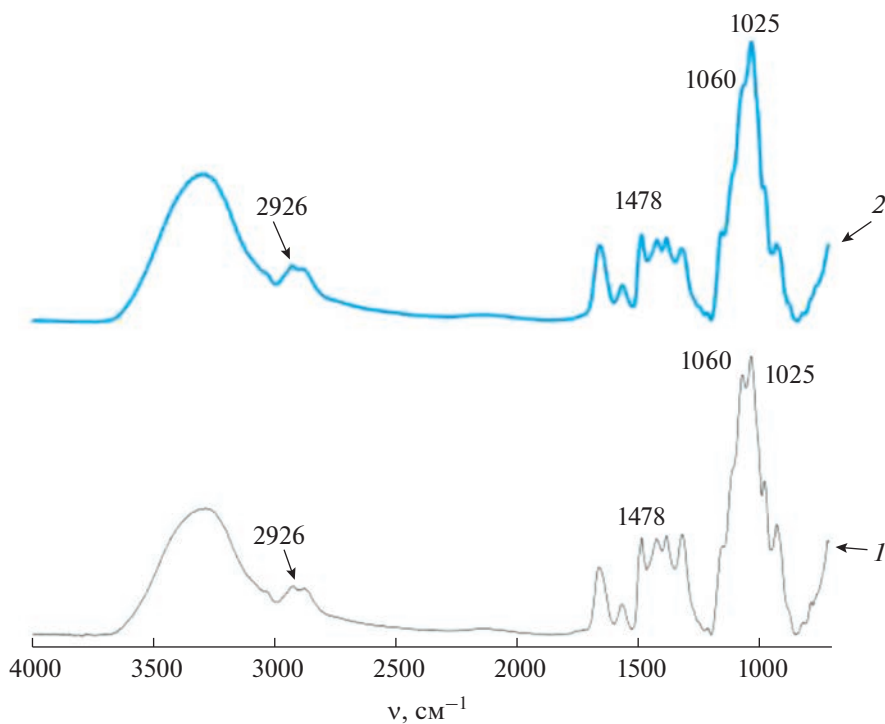
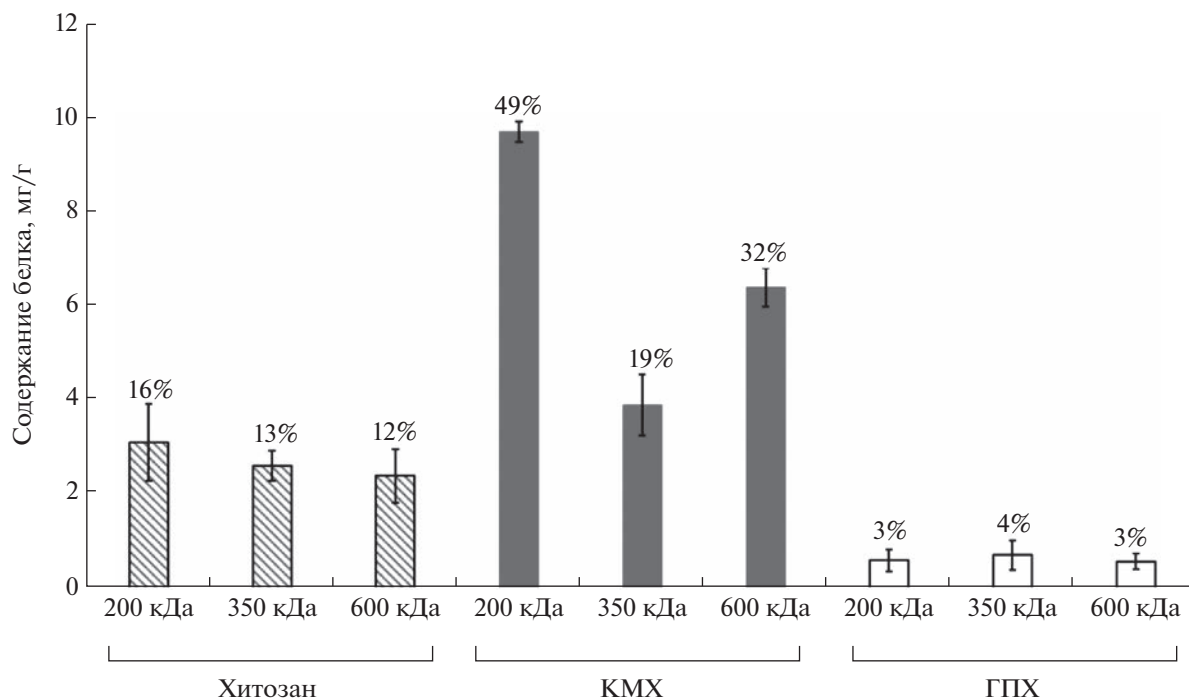


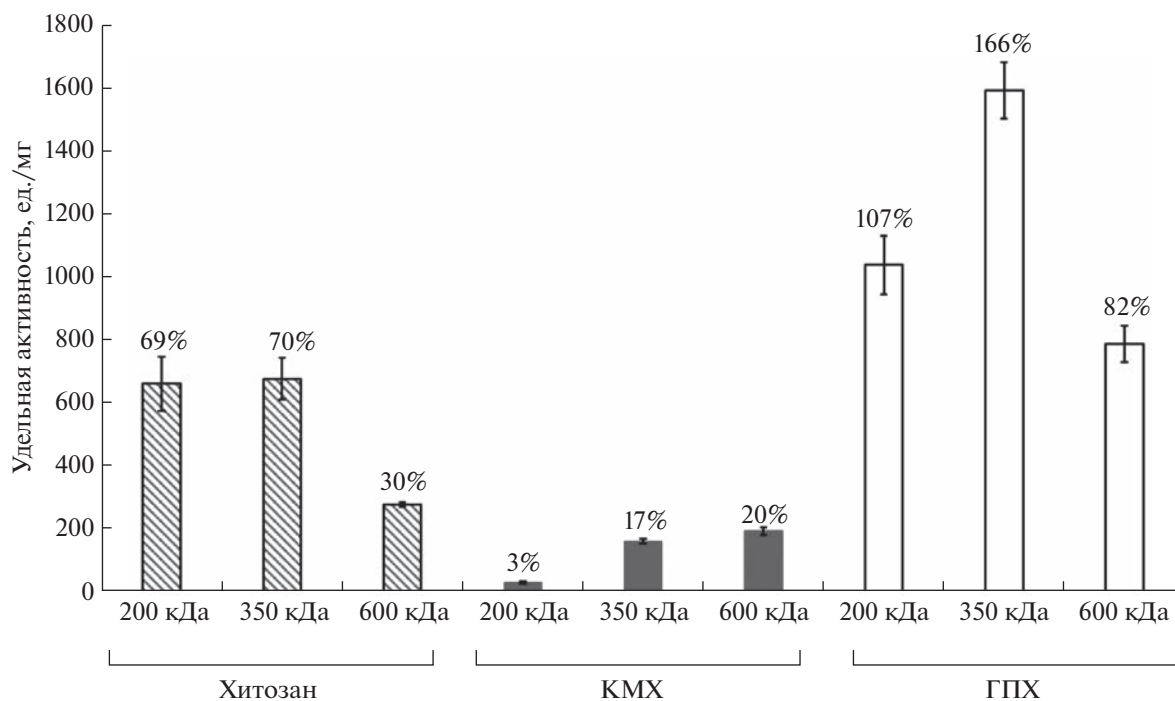
Рис. 3. ИК-спектры *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозана (1) и его комплекса с фицином (2).

**Содержание белка в комплексах фицина с полисахаридами и их удельная каталитическая активность.** Анализ содержания белка в полученных

препаратах показал, что наибольшее количество фицина образует комплекс с карбоксиметилхитозаном с молекулярной массой 200 кДа (рис. 4),



**Рис. 4.** Содержание белка (мг/г носителя) в комплексах фицина с хитозаном и его производными: карбоксиметилхитозаном (КМХ) и *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозаном (ГПХ). Над столбцами указана эффективность комплексообразования фицина (по содержанию белка), выраженная в процентах фермента в составе комплекса от его количества в растворе в процессе комплексообразования, принятого за 100%.

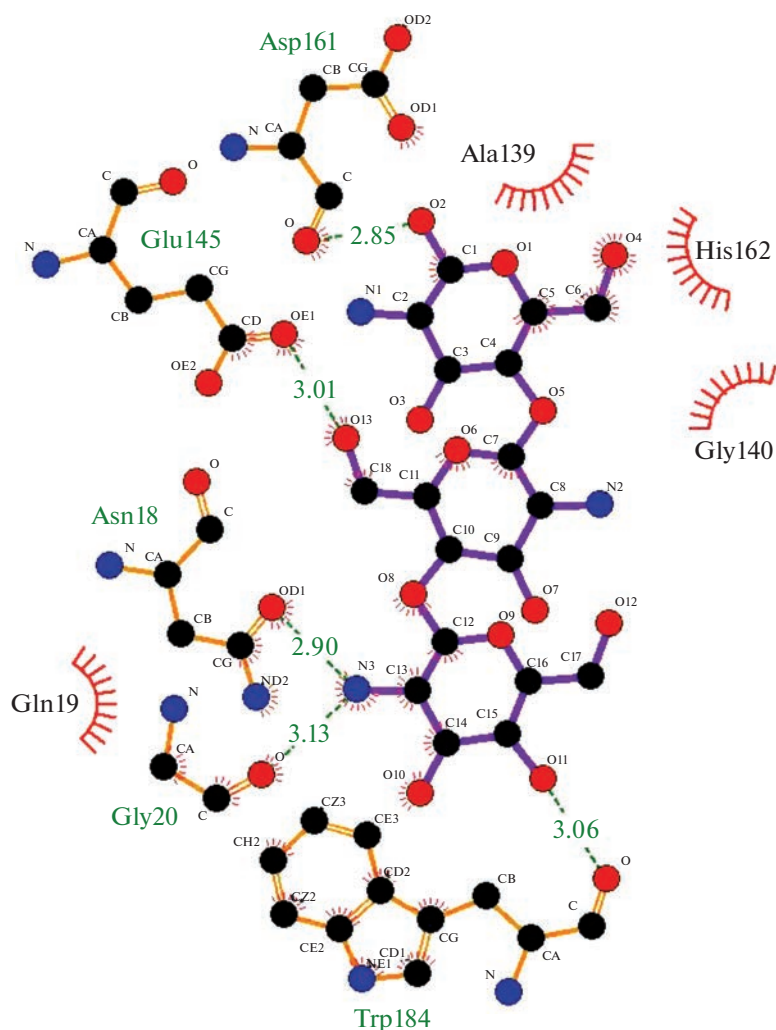


**Рис. 5.** Удельная каталитическая активность (ед./мг белка) комплексов фицина с хитозаном и его производными: карбоксиметилхитозаном (КМХ) и *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозаном (ГПХ). Над столбцами указана эффективность комплексообразования фицина (по удельной каталитической активности), выраженная в процентах сохранения удельной протеолитической активности фермента после иммобилизации по отношению к удельной каталитической активности фицина в растворе, принятой за 100%.

при этом эффективность комплексообразования (по содержанию белка) составляет 49%. Однако фермент, вероятно, находится в каталитически “невыгодной” конформации или происходят процессы автолиза, что отрицательно сказывается на его протеолитической активности. Наибольшую удельную активность показали комплексы фицина с *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозаном с молекулярной массой 350 кДа (рис. 5). Именно они, на наш взгляд, могут оказаться более перспективными, чем комплексы протеазы с хитозаном, для применения в промышленности и медицине, благодаря своей высокой каталитической активности и растворимости в широком диапазоне pH среды. Вероятно, соотношение 0.6–0.7 мг фермента на 1 г носителя оптимально для предотвращения процессов автолиза и приобретения фицином наиболее катали-

тически активной конформации. При увеличении этого соотношения до 9.7 мг на 1 г полимера удельная протеолитическая активность фицина снижается в 9.8 раз по сравнению с максимально измеренной (при соотношении фермент/полисахарид, равном 0.7 мг/г).

**Механизмы комплексообразования между фицином и полисахаридами.** Для проектирования активно и стабильно функционирующих биокатализаторов на основе комплексов ферментов и полисахаридов необходимо понимать механизм взаимодействия носителя с молекулами белка. Известно, что специфические взаимодействия возникают не одновременно. Сначала образуются различные “одноточечно” и “двухточечно” связанные состояния, а за ними следует появление связей по некоторой контактной линии и, наконец, по определенной контактной плоскости,



**Рис. 6.** Связи и взаимодействия между фицином и хитозаном (пунктирными линиями обозначены водородные связи, длина связей приведена в Å).

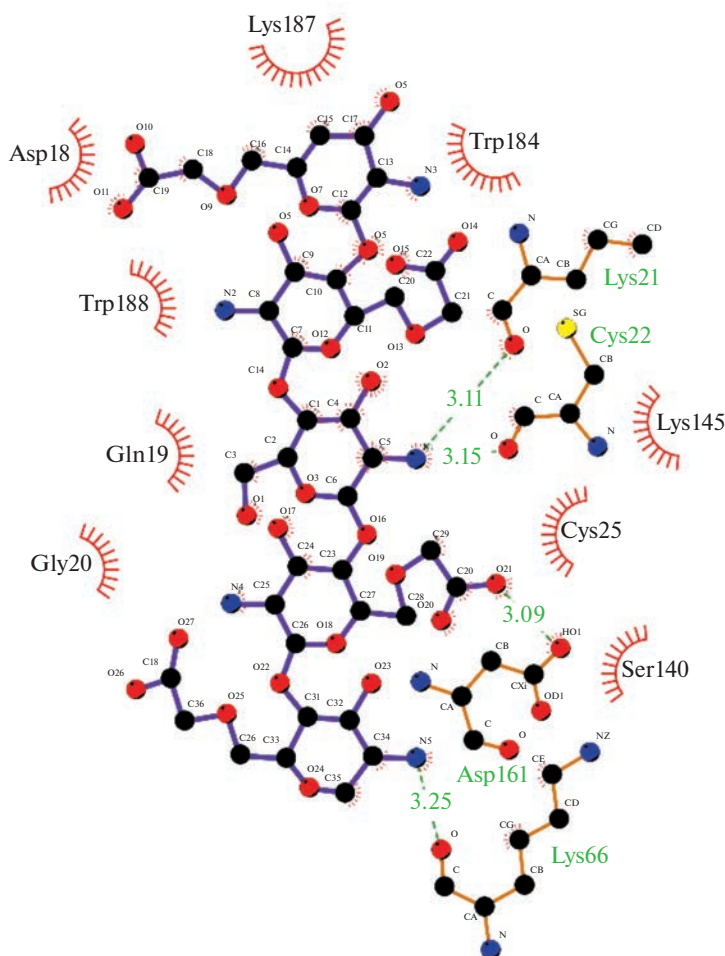
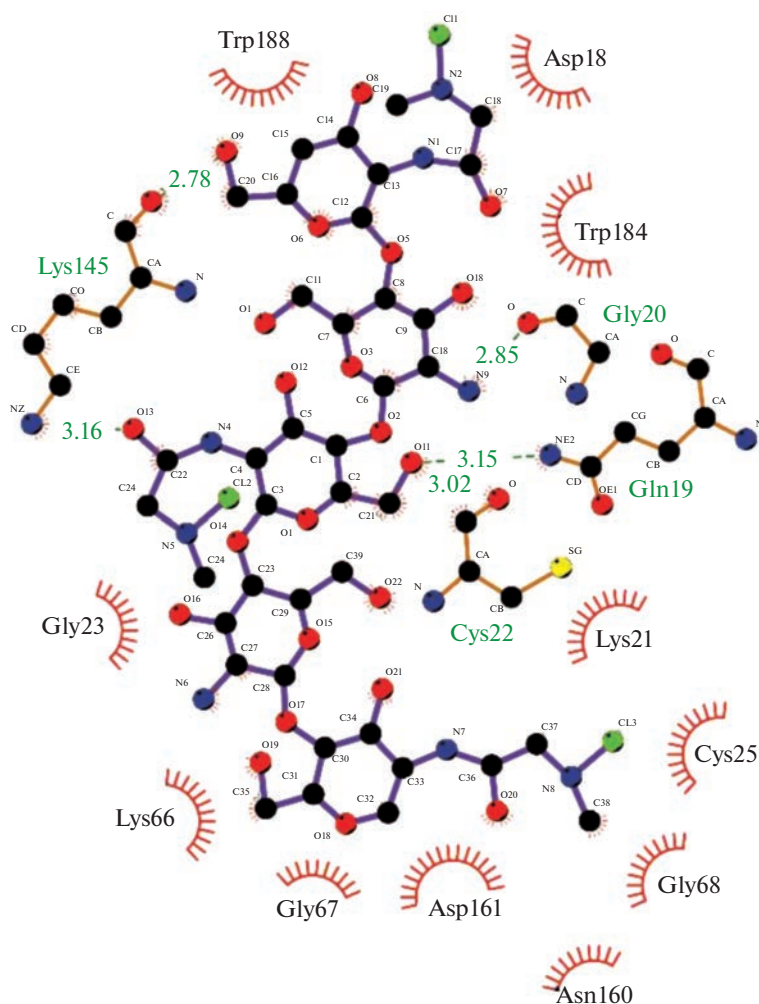


Рис. 7. Связи и взаимодействия между фицином и карбоксиметилхитозаном (пунктирными линиями обозначены водородные связи, длина связей приведена в Å).

Таблица 1. Аминокислотные остатки фицина, формирующие связи и взаимодействия с хитозаном и его производными

Энергия первого взаимодействия, ккал/моль	Аминокислотные остатки, формирующие	
	водородные связи, и длина связи, Å	иные типы взаимодействий
1) Аминокислоты фицина, которые образуют связи и взаимодействия с хитозаном		
-6.6	Asn18, 2.90 Å	Gln19, Ala139, Gly140, His162
	Gly20, 3.13 Å	
	Glu145, 3.01 Å	
	Asp161, 2.85 Å	
	Trp184, 3.06 Å	
2) Аминокислоты фицина, которые образуют связи и взаимодействия с карбоксиметилхитозаном		
-6.5	Lys21, 3.11 Å	Asp18, Gln19, Gly20, Cys25, Ser140, Lys145, Trp184, Lys187, Trp188
	Cys22, 3.15 Å	
	Lys66, 3.25 Å	
	Asp161, 3.09 Å	
3) Аминокислоты фицина, которые образуют связи и взаимодействия с <i>N</i> -(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозаном		
-6.6	Gln19, 3.15 Å	Asp18, Lys21, Gly23, Cys25, Lys66, Gly67, Gly68, Asn160, Asp161, Trp184, Trp188
	Gly20, 2.85 Å	
	Cys22, 3.02 Å	
	Lys145, 2.78 и 3.16 Å	



**Рис. 8.** Связи и взаимодействия между фицином и *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозаном (пунктирными линиями обозначены водородные связи, длина связей приведена в Å).

при этом иммобилизация становится кинетически необратимой [24, 25].

Методом молекулярного докинга мы смоделировали первую “точку” связывания фицина с хитозаном, карбоксиметилхитозаном и *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозаном. Были изучены типы взаимодействий, энергии первого связывания, аминокислотный состав поверхностей фицина, которые в процессе комплексообразования взаимодействуют с носителем (рис. 6–8, табл. 1). Из рисунков видно, что связи и взаимодействия с хитозаном и его производными образуются в том числе с участием аминокислотных остатков, расположенных вблизи активного центра фермента (Cys25 и His162), что, естественно, отражается на активности полученных комплексов. Энергии первого взаимодействия фицина с изучаемыми нами полисахаридами практически идентичны: с хитозаном и *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триме-

тиламмонийхитозаном – 6.6, с карбоксиметилхитозаном – 6.5 ккал/моль.

Исходя из полученных нами данных, можно предположить, что путем введения в структуру хитозана новых функциональных групп можно модулировать механизмы комплексообразования и активность фицина, подбирая оптимальное микроокружение для аминокислот из его активного центра – Cys25 и His162.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Объект исследования и носители для его иммобилизации.** В качестве объекта исследования был выбран фицин из латекса растений рода *Ficus* (Sigma, США), субстратом для гидролиза служил азоказеин (Sigma, США), носителями для комплексообразования – хитозаны (ХТЗ) (ЗАО “Биопрогресс”, Россия) и их производные: карбоксиметилхитозан (КМХ), *N*-(2-гидрок-



си)пропил-3-триметиламмонийхитозан (ГПХ) с молекулярными массами 200, 350 и 600 кДа соответственно.

**Синтез производных хитозана.** Производные хитозана получали по известным методикам с небольшими модификациями. Синтез карбоксиметилхитозана (КМХ) осуществляли по следующей методике: навеску хитозана массой 3.00 г диспергировали в 65 мл изопропилового спирта, затем при помощи капельной воронки в течение 15 мин вводили водный раствор NaOH из расчета 13 моль NaOH на 1 моль хитозана. После этого по каплям в реакционную смесь добавляли спиртовой раствор монохлоруксусной кислоты из расчета 7 моль кислоты на 1 моль хитозана и перемешивали в течение 12 ч при комнатной температуре. Полученный твердый продукт отфильтровывали, суспендировали в метиловом спирте, нейтрализовали раствором уксусной кислоты, промывали этиловым спиртом и сушили в вакуумном сушильном шкафу до постоянной массы [26].

Выход продуктов, вычисленный как отношение массы полученного продукта к теоретически возможной, составлял 79–92%; степень замещения, рассчитанная из данных ИК-спектроскопии, составила 0.46, 0.54 и 0.78 для хитозана с молекулярной массой 600, 350 и 200 кДа соответственно. Существенное увеличение значения степени замещения для хитозана с молекулярной массой 200 кДа может быть объяснено не только влиянием стерического фактора, но и тем, что изначально этот коммерческий хитозан находился в форме порошка, в то время как два других – в форме “чешуек”. Карбоксиметилирование проводили в гетерогенных условиях, поэтому форма и размер частиц модифицируемого полимера оказывают значительное влияние на протекание химического процесса.

*N*-(2-Гидрокси)пропил-3-триметиламмоний-хитозан (ГПХ) получали по следующей методике: навеску хитозана массой 3.00 г суспендировали в 30 мл дистиллированной воды в течение 30 мин при 85°C. Затем по каплям вводили глицидилтриметиламмоний хлорид (ГТМАХ) из расчета на 1 моль хитозана 3 моль ГТМАХ и выдерживали при 85°C в течение 10 ч. Продукт из реакционной смеси выделяли осаждением в ацетон, после чего трижды промывали этиловым спиртом и сушили в вакуумном сушильном шкафу до постоянной массы [27]. Выход продуктов составлял 62–74%; степень замещения, рассчитанная из данных ИК-спектроскопии, составила 0.24, 0.19 и 0.57 для хитозана с молекулярной массой 600, 350 и 200 кДа соответственно.

**ИК-спектроскопия.** Регистрацию ИК-спектров анализируемых образцов в виде сухих порошков без наполнителей осуществляли на спектрометре IR-Affinity 1 (Shimadzu Instruments, Япония) в режиме нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) с призмой из ZnSe, в диапазоне частот 700–4000 см<sup>-1</sup>, разрешение 4 см<sup>-1</sup>.

**Получение комплексов фицина с полисахаридами.** Комплексообразование фицина с хитозаном и его производными осуществляли следующим образом: к 1 г хитозана добавляли 20 мл раствора фермента (в концентрации 10 мг/мл 0.05 М глицинового буфера, pH 9.0), инкубировали в течение 2 ч. После окончания инкубации образовавшийся комплекс промывали с помощью диализа против 50 мМ Tris-HCl-буфера (pH 7.5) через целлофановую мембрану с размером пор 25 кДа до отсутствия в промывных водах белка, контроль осуществляли на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ Спектр, Россия) при  $\lambda = 280$  нм. Полученные препараты лиофильно высушивали до постоянной массы и использовали для дальнейших исследований.

**Определение содержания белка в комплексах фицина с полисахаридами и их удельной каталитической активности.** Содержание белка в комплексах фицина с хитозаном и его производными определяли методом Лоури [29] со следующей модификацией: на первом этапе анализа осуществляли разрушение связей между полисахаридом и молекулами фермента. Для этого иммобилизованный фицин обрабатывали раствором K<sub>2</sub>Na-тартрата (в концентрации 20 мг/мл или 0.7 М), приготовленным на 1 М NaOH, при 50°C в течение 10 мин [30]. Отсутствие процессов разрушения фермента контролировали путем регистрации и анализа его спектра поглощения на спектрофотометре UV-2550PC (Shimadzu, Япония).

Определение протеолитической активности фермента проводили на субстрате азоказеине (Sigma, США) [31, 32]. К 50 мг образца добавляли 200 мкл Tris-HCl-буфера, pH 7.5, 800 мкл азоказеина (0.5% в 50 мМ Tris-HCl-буфере, pH 7.5) и инкубировали 2 ч при 37°C. Далее добавляли 800 мкл ТХУ (5%), инкубировали 10 мин при 4°C, затем центрифугировали в течение 3 мин при 11 700 *g* для удаления негидролизованного азоказеина. К 1200 мкл супернатанта добавляли 240 мкл 3%-ного NaOH для нейтрализации кислоты, после чего измеряли оптическую плотность опытной пробы при 410 нм в 1-см кювете. Контрольная проба содержала 800 мкл азоказеина, 800 мкл ТХУ, 50 мг образца и 200 мкл Tris-HCl-буфера. За единицу каталитической активности принимали количество фицина (в мг белка), которое в усло-

виях эксперимента гидролизует 1 мкмоль субстрата за 1 мин. Удельную протеолитическую активность фицина рассчитывали по формуле [33]:

$$A = \frac{\Delta D \times V}{120 \times \varepsilon \times l \times C},$$

где  $A$  – протеолитическая активность, мкмоль субстрата в мин на 1 мг белка;  $\Delta D$  – изменение оптической плотности опытного образца по отношению к контрольному при 410 нм;  $V$  – общий объем пробы, мл;  $C$  – концентрация белка в пробе, мг/мл; 120 – время инкубации, мин;  $\varepsilon$  – коэффициент молярной экстинкции 0.5%-ного раствора азоказеина при 410 нм, равный  $12 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ;  $l$  – длина оптического пути, равная 1 см.

Эффективность комплексообразования фицина по содержанию белка выражали в процентах фермента в составе комплекса от его количества в растворе в процессе комплексообразования, принятого за 100%; по удельной каталитической активности – в процентах сохранения удельной протеолитической активности фермента после иммобилизации по отношению к удельной каталитической активности фицина в растворе, принятой за 100%.

Статистическую значимость различий величин контрольных и опытных показателей определяли по  $t$ -критерию Стьюдента (при  $p < 0.05$ ,  $n = 8$ ), поскольку все показатели характеризовались нормальным распределением. Полученные данные (рис. 4 и 5) представлены в виде средних значений  $\pm$  доверительный интервал.

**Молекулярный докинг.** Подготовку структуры фицина (PDB ID: 4YYW, <https://www.rcsb.org/structure/4YYW>) для докинга выполняли по схеме, стандартной для Autodock Vina (<https://sourceforge.net/projects/autodock-vina-1-1-2-64-bit/>), описанной авторами пакета на сайте: из входного файла PDB были удалены координаты атомов (и сами атомы) молекул растворителя, буфера и лигандов. Центр молекулы и параметры бокса (“ячейки”) задавали вручную, добиваясь того, чтобы молекула протеазы полностью была внутри расчетной области пространства [28].

Модели структур хитозана и его производных были нарисованы в молекулярном конструкторе HyperChem (<https://hyperchem.software.informer.com>), последовательно оптимизированы сначала в силовом поле AMBER, а потом квантово-химически в PM3 (Parametric Method 3). Лиганд в расчетах докинга имел максимальную конформационную свободу: допускалось вращение функциональных групп вокруг всех одинарных связей. Расстановку зарядов на молекулах полисахаридов и их протонирование/депротонирование прово-

дили автоматически в пакете MGLTools 1.5.6 (<https://ccsb.scripps.edu/mgltools/1-5-6/>).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированы производные хитозана – карбоксиметилхитозан и  $N$ -(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозан с молекулярными массами 200, 350 и 600 кДа. Проведено комплексообразование фицина с хитозаном и его производными. Анализ ИК-спектров подтвердил образование конъюгатов между макромолекулами названных полисахаридов и фицина. Оптимальное соотношение содержания белка (0.7 мг/г носителя) и удельной активности (1590 ед./мг белка) выявлено при образовании комплекса фицина с  $N$ -(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозаном с молекулярной массой 350 кДа. По отношению к удельной каталитической активности фицина в растворе удельная протеолитическая активность полученных комплексов фермента с хитозаном (200 и 350 кДа) составила ~70%, с карбоксиметилхитозаном (350 и 600 кДа) находилась в пределах 20%, а с  $N$ -(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозаном (350 кДа) составила 166%, что делает данный комплекс перспективным для практического применения в пищевой, пивоваренной и кожевенной промышленности, а также в медицине. Методом молекулярного докинга установлено, что связи и взаимодействия с хитозаном и его производными образуются в том числе с участием аминокислотных остатков, расположенных вблизи активного центра фицина (Cys25 и His162), что объясняет изменение протеолитической активности полученных комплексов.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Экспериментальные исследования были проведены с использованием научно-технической базы ФИЦ “Казанский научный центр” РАН.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-20053 – синтез производных хитозана, комплексообразование фицина, докинг) и государственного задания ФИЦ “Казанский научный центр” РАН (ИК-спектроскопия).

## 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

- Holyavka M., Faizullin D., Koroleva V., Olshannikova S., Zakhartchenko N., Zuev Yu., Kondratyev M., Zakharova E., Artyukhov V. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2021. V. 180. P. 161–176.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.016>
- Holyavka M.G., Kayumov A.R., Baydamshina D.R., Koroleva V.A., Trizna E.Y., Trushin M.V., Artyukhov V.G. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. V. 115. P. 829–834.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.107>
- Wingard L.B., Berezin I.V., Klyosov A.A. // *Enzyme Engineering. Future Directions.* New York: Plenum Press, 1980. XIV, 522 p.  
<https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3719-5>
- Efremenko E.N., Lozinsky V.I., Sergeeva V.S., Plieva F.M., Makhlis T.A., Kazankov G.M., Gladilin A.K., Varfolomeyev S.D. // *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2002. V. 51. P. 195–201.  
[https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00135-X](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00135-X)
- Efremenko E., Peregudov A., Kildeeva N., Perminov P., Varfolomeyev S. // *Biocatalysis and Biotransformation.* 2005. V. 23. P. 103–108.  
<https://doi.org/10.1080/10242420500132474>
- Muronetz V.I., Zhang N.X., Bulatnikov I.G., Wang C.-C. // *FEBS Lett.* 1998. V. 426. P. 107–110.  
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00319-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00319-6)
- Siar E.-H., Zaak H., Kornecki J.F., Zidoune M.N., Barbosa O., Fernandez-Lafuente R. // *Process Biochem.* 2017. V. 58. P. 98–104.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.009>
- Siar E.-H., Morellon-Sterling R., Zidoune M.N., Fernandez-Lafuente R. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 144. P. 419–426.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.140>
- Hayashi T., Hyon S.-H., Cha W.-I., Ikada Y. // *Polym. J.* 1993. V. 25. P. 489–497.  
<https://doi.org/10.1295/polymj.25.489>
- Pan Y., Pang Y., Shi Y., Zheng W., Long Y., Huang Y., Zheng H. // *Microchim. Acta.* 2019. V. 186. P. 213.  
<https://doi.org/10.1007/s00604-019-3331-y>
- Kulikov S.N., Tikhonov V.E., Bezrodnykh E.A., Lopatin S.A., Varlamov V.P. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2015. V. 41. P. 57–62.  
<https://doi.org/10.1134/S1068162015010100>
- Akpan E.I., Gbenebor O.P., Adeosun S.O., Cletus O. // *In Handbook of Chitin and Chitosan. Chapter 5 / Eds. Gopi S., Thomas S., Pius Anitha.* Elsevier, 2020. P. 131–164.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817970-3.00005-5>
- Gregorio C. // *Environ. Chem. Lett.* 2019. V. 17. P. 1623–1643.  
<https://doi.org/10.1007/s10311-019-00901-0>
- Prashanth K.V.H., Tharanathan R.N. // *Trends in Food Science & Technology.* 2007. V. 18. P. 117–131.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.10.022>
- Xu I., Du I., Huang R., Gao L. // *Biomaterials.* 2003. V. 24. P. 5015–5022.  
[https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00408-3](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00408-3)
- Trott O., Olson A.J. // *J. Comput. Chem.* 2010. V. 31. P. 455–461.  
<https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Barth A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1767. P. 1073–1101.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2007.06.004>
- Byler D.M., Susi H. // *Biopolymers.* 1986. V. 25. P. 469–487.  
<https://doi.org/10.1002/bip.360250307>
- Wang Q.Z., Chen X.G., Liu N., Wang S.X., Liu C.S., Meng X.H., Liu C.G. // *Carbohydrate Polymers.* 2006. V. 65. P. 194–201.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.01.001>
- Mazancova P., Némethova V., Treľova D., Klesčíkova L., Lacík I., Razga F. // *Carbohydr. Polym.* 2018. V. 192. P. 104–110.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.030>
- Wolpert M., Hellwig P. // *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectroscopy.* 2006. V. 64. P. 987–1001.  
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2005.08.025>
- Yang Y., Xing R., Liu S., Qin Y., Li K., Yu H., Li P. // *Carbohydr. Polym.* 2019. V. 205. P. 194–201.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.101>
- Wang C., Fan J., Xu R., Zhang L., Zhong S., Wang W., Yu D. // *J. Mater. Sci.* 2019. V. 54. P. 12522–12532.  
<https://doi.org/10.1007/s10853-019-03824-x>
- Шкутина И.В., Стоянова О.Ф., Селеменев В.Ф., Меркулова Ю.Д. // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2004. Т. 4. № 4. С. 422–427.
- Шкутина И.В., Стоянова О.Ф., Лунина В.В. // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2009. Т. 9. № 2. С. 247–253.
- Chen S.C., Wu Y.C., Mi F.L., Lin Y.H., Yu L.C., Sung H.W. // *J. Control. Release.* 2004. V. 96. P. 285–300.
- Gorshkova M., Volkova I., Alekseeva S., Molotkova N., Skorikova E., Izumrudov V. // *Polymer Science Series A.* 2011. V. 53. P. 57–66.  
<https://doi.org/10.1134/S0965545X11010019>
- Abdullatypov A.V., Kondratyev M.S., Holyavka M.G., Artyukhov V.G. // *Biophysics.* 2016. V. 61. P. 565–571.  
<https://doi.org/10.1134/S0006350916040023>
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Faar A.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265–275.
- Artyukhov V.G., Kovaleva T.A., Kholyavka M.G., Bityutskaya L.A., Grechkina M.V. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2010. V. 46. P. 422–427.  
<https://doi.org/10.1134/S0003683810040034>
- Sabirova A.R., Rudakova N.L., Balaban N.P., Ilyinskaya O.N., Demidyuk I.V., Kostrov S.V., Rudenskaya G.N., Sharipova M.R. // *FEBS Lett.* 2010. V. 584. P. 4419–4425.  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.09.049>
- Charney J., Tomarely R.M. // *J. Biol. Chem.* 1947. V. 171. P. 501–505.
- Coelho D.F., Saturnino T.P., Fernandes F.F., Mazzola P.G., Silveira E., Tambourgi E.B. // *Biomed. Res. Int.* 2016. P. 8409183.  
<https://doi.org/10.1155/2016/8409183>

## Preparation of Ficin Complexes with Carboxymethylchitosan and *N*-(2-Hydroxy)propyl-3-Trimethyl Ammonium Chitosan and the Study of Their Structural Features

N. V. Malykhina\*, S. S. Olshannikova\*, M. G. Holyavka\*, \*\*, #, A. V. Sorokin\*, \*\*, M. S. Lavlinskaya\*, \*\*, V. G. Artyukhov\*, D. A. Faizullin\*\*\*, and Yu. F. Zuev\*\*\*

#Phone: +7 (47372) 220-85-86; e-mail: holyavka@rambler.ru

\*Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394018 Russia

\*\*Sevastopol State University, ul. Universitetskaya 33, Sevastopol, 299053 Russia

\*\*\*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences, ul. Lobachevskogo 2/31, Kazan, 420111 Russia

Chitosan derivatives – carboxymethyl chitosan and *N*-(2-hydroxy)propyl-3-trimethyl ammonium chitosan with molecular weights of 200, 350, and 600 kDa have been synthesized. Complexes of ficin with chitosan and its named derivatives have been obtained. IR spectra of chitosan, carboxymethylchitosan, and *N*-(2-hydroxy)propyl-3-trimethyl ammonium chitosan and their complexes with ficin were recorded. The analysis of the spectra confirmed the formation of conjugates between the macromolecules of polysaccharides and ficin. The optimal ratio of protein content (0.7 mg/g of carrier) and specific activity (1590 units/mg of protein) was found during the complexation of ficin with the *N*-(2-hydroxy)propyl-3-trimethylammonium chitosan matrix with the molecular weight 350 kDa. The efficiency of ficin complexation (in terms of specific catalytic activity) with *N*-(2-hydroxy)propyl-3-trimethyl ammonium chitosan (350 kDa) exceeds that of chitosan (350 kDa) and carboxymethylchitosan (350 kDa) 2.4 and 9.8 times respectively. The types of interactions, first binding energies, amino acid composition of ficin surfaces, which interact with the carrier in the process of complexation, were studied by molecular docking. It has been established that bonds and interactions with chitosan and its derivatives are formed, among other things, with the participation of amino acid residues located near the ficin active site (Cys25 and His162), which explains the change in the proteolytic activity of the obtained complexes. Ficin complexes with *N*-(2-hydroxy)propyl-3-trimethyl ammonium chitosan are soluble in a wide pH range and, therefore, may be more promising than protease-chitosan complexes in the development of medical preparations and biocatalysts for the food, brewing, and leather industries.

*Keywords: carboxymethyl chitosan, N-(2-hydroxy)propyl-3-trimethyl ammonium chitosan, ficin, complexation*



## ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ ЖУРНАЛА “БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ” 2023

DOI: 10.31857/S0132342323330011, EDN: PRAAGW

### ТЕМАТИКА ПУБЛИКАЦИЙ

Журнал “Биоорганическая химия” (Russian Journal of Bioorganic Chemistry) публикует статьи, посвященные структурным, структурно-функциональным и синтетическим исследованиям биологически значимых высокомолекулярных соединений (белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов и смешанных биополимеров любых типов).

**Предметом публикации** для журнала являются также проблемы изучения химических основ деятельности высокоорганизованных частей клетки (клеточных мембран, рецепторных комплексов и др.), целых клеток или органов, проблемы нейро- и иммунохимии, биотехнологии, фундаментальные основы разработки диагностикомов на инфекционные и наследственные заболевания.

Большое внимание журнал уделяет также новым достижениям в области низкомолекулярных биорегуляторов. Рассматриваются исследования природных веществ (пептидов, пептидных и стероидных гормонов, липидов, витаминов, антибиотиков, простагландинов, алкалоидов и других соединений, выделяемых из микроорганизмов, грибов, высших растений или животных), их синтетических аналогов, а также синтетических биологически активных веществ (например, лекарств и пестицидов). Предметом публикации также могут быть химические аспекты экологических проблем, методы анализа природных токсиантов и ксенобиотиков и проблемы защиты окружающей среды от этих веществ.

**Журнал предназначен** для ученых, медицинских работников, преподавателей и студентов университетов, а также исследователей в промышленных, медицинских, сельскохозяйственных лабораториях и лабораториях экологического контроля.

### ВИДЫ ПУБЛИКАЦИЙ

Основным типом публикаций являются статьи, содержащие результаты оригинальных экспериментальных и теоретических исследований. Представляемые работы должны отражать новые и ранее не публиковавшиеся данные.

**Максимальный объем экспериментальной статьи** вместе с таблицами и списком литературы не должен превышать **24** стандартных машинописных страниц (шрифт Times New Roman, размер шрифта 12, междустрочный интервал 1.5), и 8 рисунков.

Журнал публикует также **обзорные** и **мини-обзорные** статьи о важнейших достижениях в области биоорганической химии.

**Максимальный объем обзорных статей** вместе с таблицами и списком литературы должен составлять **не более 35** машинописных страниц и 15 рисунков. Обзорные статьи большего объема должны быть разбиты на несколько частей и могут быть опубликованы в двух или более номерах журнала.

**Максимальный объем мини-обзорных статей** — **10–15** печатных страниц и 5–8 рисунков.

Авторам, планирующим опубликовать обзорную статью, необходимо вначале представить в редакцию журнала ее аннотацию, содержащую обоснование актуальности предлагаемой темы, краткие данные о содержании и структуре обзора, его объеме, числе иллюстраций и ссылок на цитируемую литературу, временной охват цитирования, с целью предварительной оценки редколлегией целесообразности его публикации. Полный текст одобренной редколлегией обзорной статьи принимается далее к рассмотрению.

Под рубрикой “**Письма редактору**” в журнале помещаются краткие сообщения, содержащие новые, важные результаты, требующие срочной публикации. **Объем** статьи для рубрики “**Письма редактору**” не должен превышать **8–10** машинописных страниц и 2–3 рисунков.

Журнал практикует выпуск тематических номеров (спецвыпусков), посвященных важным проблемам физико-химической биологии и событиям ее истории, а также номеров, формируемых по материалам докладов и сообщений с важнейших конгрессов, симпозиумов и конференций. Решения о специальных и симпозиальных выпусках принимаются редколлегией по предварительным заявкам, представляемым в редакцию **не позднее чем за 6 месяцев** до предполагаемого события. Редколлегия назначает ответственных ре-

дакторов каждого тематического номера. Статьи, предлагаемые участниками конференции с одобрения оргкомитета и ответственных редакторов выпуска, рассматриваются и принимаются к печати по канонам обычных статей.

### МЕЖДУНАРОДНЫЙ РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ ЖУРНАЛА

Международный редакционный совет журнала “Биоорганическая химия” (Russian Journal of Bioorganic Chemistry) представляет собой консультативный совещательный орган, возглавляемый главным редактором журнала. В состав Международного редакционного совета входят как российские, так и зарубежные ученые по соответствующим областям знаний. Члены Международного редакционного совета журнала обеспечивают высокий научный уровень, продвижение журнала как в российском, так и в международном научном сообществе; определяют редакционную политику, тематическую направленность журнала, проблематику и его перспективы; принимают решения по спорным вопросам относительно поступающих материалов.

### РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ ЖУРНАЛА

Редакционная коллегия журнала “Биоорганическая химия” (Russian Journal of Bioorganic Chemistry) представляет собой постоянно действующий рабочий орган, возглавляемый главным редактором журнала. В состав редакционной коллегии входят как российские, так и зарубежные ученые по соответствующим областям знаний. Члены редакционной коллегии журнала непосредственно осуществляют научное сопровождение выпусков журнала, устанавливают требования как к содержанию, так и к оформлению публикаций, визируют поступающие рукописи.

### ПОЛИТИКА РЕЦЕНЗИРОВАНИЯ

В журнале “Биоорганическая химия” все статьи рецензируются, используется **двусторонняя “слепая” форма рецензирования группой внештатных рецензентов** (не менее 2 рецензентов на каждую рукопись). В число рецензентов входит 83 внутренних и внешних эксперта (из них внешних – 85.64%). Количество отклоненных рукописей в 2022 году составило 78%.

**Окончательное решение о публикации рукописи принимает главный редактор.**

Любой приглашенный рецензент, если он чувствует отсутствие необходимой квалификации или не может провести рецензирование рукописи из-за конфликта интересов, должен своевременно сообщить об этом редактору и отклонить предложение о проведении рецензирования.

Рецензенты должны формулировать свои утверждения в ясной форме, аргументированно и логично, так, чтобы авторы могли использовать их для улучшения рукописи. Необходимо полностью исключить критику, направленную на личность авторов. Рецензенты должны указать в своей рецензии: 1) любые работы, которые имеют отношения к рукописи, но не были процитированы авторами; 2) все, что сообщалось в более ранних публикациях, но не было подобающим образом процитировано или указано в работе; 3) любое значимое сходство или пересечение с другими (опубликованными или неопубликованными) рукописями, о которых известно рецензенту.

### ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ЭТИКА

Журнал “Биоорганическая химия” максимально поддерживает принципы добропорядочности и этики в опубликованных материалах.

У журнала есть **политика конфликтов интересов**, и публикуемые работы соответствуют международным, национальным и/или институциональным стандартам работы с людьми и животными, а также при необходимости используют практику информированного согласия.

Журнал “Биоорганическая химия” является членом Committee on Publication Ethics (COPE) и соглашается с его принципами в отношении того, как бороться со случаями ненадлежащего поведения, тем самым обязуясь расследовать утверждения о ненадлежащем поведении в целях обеспечения этичности исследований.

При проверке представленных рукописей используется программное обеспечение для обнаружения плагиата. Если будет выявлен плагиат, журнал будет следовать принципам и рекомендациям COPE в отношении плагиата. **Любые отклонения от приведенных здесь правил могут привести к отклонению рукописи и/или более внимательному рассмотрению рукописей, присланных авторами в будущем.**

**Издатель и/или редакторы не несут юридической ответственности при возникновении материальных претензий со стороны третьих лиц в связи с присланными рукописями.**

### ПРЕДСТАВЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ В РЕДАКЦИЮ ЖУРНАЛА

Рукописи статей, включая иллюстративный материал (таблицы, схемы, рисунки), принимаются в редакцию **в электронной форме** через авторский портал Pleiades Publishing Ltd.: <https://publish.sciencejournals.ru>.

Авторы могут подать рукопись по электронной почте: [rjbc@ibch.ru](mailto:rjbc@ibch.ru) (в копии письма необходимо указать адрес заведующего редакцией журнала: [korolenkoibch@yandex.ru](mailto:korolenkoibch@yandex.ru)).



Рукопись представляется в формате DOC/DOCX **единым файлом (недопустима)** разбивка статьи на несколько файлов, содержащих отдельно текст и иллюстративный материал).

По желанию авторов иллюстративный материал высокого разрешения (схемы, рисунки, фотографии) может быть предоставлен дополнительно (в архиве). Издатель (через редакцию журнала) может запросить у авторов иллюстративный материал высокого разрешения (если при подготовке оригинал-макета сотрудники издательства сочтут качество предоставленного иллюстративного материала неудовлетворительным).

#### *Основные требования к рукописям*

Направление рукописи в журнал предполагает, что:

- 1) представленная работа не публиковалась ранее;
- 2) она не находится на рассмотрении для публикации в другом издании;
- 3) данная рукопись не была отклонена в этом журнале;
- 4) публикация была одобрена всеми соавторами;
- 5) публикация была одобрена (явно или неявно) всеми необходимыми инстанциями в организациях, где была выполнена эта работа.

#### ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

При оформлении текста экспериментальных, обзорных, мини-обзорных рукописей и “Писем редактору” (кратких сообщений) необходимо **строго** придерживаться следующего установленного порядка разделов рукописи:

1. Индекс *УДК* (дается курсивным начертанием). Для подбора индекса авторы могут воспользоваться онлайн-справочником *УДК*: <https://www.triumph.ru/html/serv/udk.html>;

2. **ЗАГЛАВИЕ** (дается прописными буквами);

3. **Инициалы и фамилии авторов** с пометками, позволяющими понять, в каких научных учреждениях (институтах) они работают (необходимо использовать надстрочные символы \*, \*\*, \*\*\*);

4. **Полные официальные названия учреждений** и почтовые адреса, включая почтовый индекс и город, **для всех** авторов рукописи;

5. **Аннотация** объемом около 250 слов машинописного текста с изложением основных результатов работы и выводов.

В аннотации не рекомендуется использовать формулы, изготавливаемые в графическом формате. Аннотация представляет собой автономную часть рукописи, поэтому все вводимые в нее сокращения и условные обозначения обязательно должны быть расшифрованы (до или после сокращений в самом тексте аннотации).

В аннотации не следует использовать номера соединений, аббревиатуры – нужно приводить полные или краткие названия соединений;

6. **Ключевые слова** (не более семи);

7. Список сокращений и контакты автора для переписки (даются в сноске на первой странице);

8. Раздел **ВВЕДЕНИЕ (обязательный раздел для всех рукописей)**;

9. Раздел **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ (обязательный раздел для экспериментальных работ и “Писем редактору”)**;

10. Раздел **ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ (обязательный раздел для экспериментальных работ и “Писем редактору”)**. В начале раздела должны быть приведены данные об использованных реагентах, о применяемых приборах, их происхождении, описание типовых методов и методик и т.п. Для методик, опубликованных ранее, достаточно указать ссылку на соответствующую работу.

11. Раздел **ЗАКЛЮЧЕНИЕ (обязательный раздел для всех рукописей)**. Включает в себя краткое изложение результатов работы и выводы (желательно также отразить в заключении практическую значимость проведенных исследований и перспективы дальнейшего использования полученных результатов).

12. Раздел **БЛАГОДАРНОСТИ** (приводится при необходимости) включает сообщения о полезных обсуждениях и дискуссиях, благодарности коллегам, рецензентам и сотрудникам редакции (в особых случаях); сообщения о предоставлении материалов, данных, компьютерного обеспечения, приборов во временное пользование; информация о проведении исследований в центрах коллективного пользования; помощь в технической подготовке текста, а также все прочее, что расценивается авторами как **полезная помощь**;

13. Раздел **ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА** (приводится при необходимости) включает в себя информацию о грантах и любой другой финансовой поддержке исследований. В данном разделе названия институтов и спонсирующих организаций следует указывать **полностью**, не сокращая;

14. Раздел **СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ** является **обязательным** разделом, который должен содержать информацию о работе с людьми и/или животными (рекомендации по оформлению данного раздела представлены на сайте издателя: <https://www.pleiades.online/ru/authors/guidelines/ethics-statements/>). Если исследования с участием людей и животных не проводились, авторы должны это указать (используется стандартная формулировка: “Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований”). Этот раздел должен присутствовать во **ВСЕХ** статьях (независимо от

того, были ли вовлечены животные и люди в эксперименты в какой-либо конкретной работе);

15. Раздел **КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ** является **обязательным** разделом и должен присутствовать во **ВСЕХ** рукописях. Раздел должен содержать стандартную формулировку: “Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов” или сведения об имеющемся конфликте интересов;

16. **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ** оформляется в виде отдельного раздела рукописи с указанием фамилий и инициалов **всех** авторов (курсивным шрифтом, et al. не допускается), **сокращенных** названий журналов и выходных данных публикации (год выпуска, номер тома, номера страниц через длинное тире). В конце ссылки обязательно указывается doi (при наличии), точка после doi не ставится.

В журнале принята последовательная нумерационная система цитирования, т.е. в порядке упоминания в тексте указывается порядковый номер процитированного источника (арабской цифрой в квадратных скобках), соответствующий номеру в списке литературы. При цитировании статьи, опубликованной в журнале “Биоорганическая химия”, в списке литературы следует привести под тем же номером в квадратных скобках выходные данные английской версии статьи.

Ниже приведены образцы оформления ссылок на статьи в журналах, книги, патенты, диссертации, тезисы конференций.

1. Михалева И.И., Иванов В.Т., Войтенков В.Б., Вечканов Е.М., Бондаренко Т.И. // Биоорг. химия. 2013. Т. 39. С. 277–284. [Mikhaleva I.I., Ivanov V.T., Voitenkov V.B., Vechkanov E.M., Bondarenko T.I. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2013. V. 39. P. 245–251.] [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)93924-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)93924-9)
2. Нероев В.В., Киселева О.А., Бессмертный А.М. // Рос. офтальмологич. журнал. 2013. Т. 6. № 3. С. 4–7.
3. Casu B., Naggi A., Torri G. // Carbohydr. Res. 2015. V. 403. P. 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.06.023>
4. Хираока М. // Краун-соединения. Свойства и применение / Ред. Эммануэль Н.М. Москва: Мир, 1986. С. 258–260.
5. Национальное руководство по глаукоме: для практикующих врачей (3-е изд., испр. и доп.) / Под ред. Егорова Е.А., Астахова Ю.С., Еричева В.П. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2015. 456 с.
6. Lund E., Henrichsen J. // Methods in Microbiology / Eds. Bergan T., Norris J.R. London: Academic Press, 1978. P. 241–262.
7. Alberts B., Johnson A., Lewis Ju., Raff M., Roberts K., Walter P. // In: Molecular Biology of the Cells, 4th ed. New York: Garland Science, 2002. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26871>
8. Свердлов Е.Д., Алексеенко И.В., Безбородова О.А., Виноградова Т.В., Кашкин К.Н., Копанцев Е.П., Монастырская Г.С., Немцова Е.Р., Успенская Н.Я., Чернов И.П., Якубовская Р.И. // Патент RU 2551784 С1, 2015.

9. Knopf J., Seehra J., Kumar R. // Patent US 8343933 B2, 2010.

10. Шарапова Н.Е. // Получение и характеристика рекомбинантных доменов белка LigA как компонентов потенциальной субъединичной противолептоспирозной вакцины. Дис. канд. биол. наук, НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва, 2009.

11. Латашко В.М., Бадовская Л.А., Пономаренко Р.И., Сокирко В.П. // Тез. докл. 6-й Международной конференции “Регуляторы роста и развития растений в биотехнологиях”, Москва, 2001. С. 255.

17. RESUME – английская версия пунктов 2–6 (названия организаций, в которых работают авторы, даются на английском языке, а адреса организаций – с помощью транслитерации);

18. Подписи к рисункам, схемам и заголовки таблиц (все вместе на отдельной странице);

19. Рисунки, схемы и химические формулы (просим использовать редактор ChemDraw).

В электронной версии журнала возможна бесплатная публикация цветных рисунков;

20. Таблицы;

## 21. **ШАБЛОН ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЬИ 2023**

При написании статьи следует употреблять латинские названия животных, растений и микроорганизмов (род и вид – курсивным начертанием, таксоны более высокого уровня – прямым); при первом упоминании в аннотации и в тексте род должен называться полностью.

**Названия ферментов** необходимо давать в соответствии с классификацией IUB, приводя в скобках классификационный номер (КФ).

**Названия химических соединений** должны соответствовать номенклатуре, рекомендованной номенклатурным комитетом Международного союза теоретической и прикладной химии IUPAC и Международного союза биохимии IUBMB. **Все сокращения названий химических соединений даются в журнале в латинской транскрипции.**

Соединения нумеруются римскими полужирными цифрами в скобках (скобки нежирные): (I), (II) и т.д. Если соединений больше 30, их следует нумеровать арабскими полужирными цифрами в скобках (скобки нежирные): (1), (2) и т.д. С 2021 г. редакция журнала рекомендует авторам экспериментальных статей **переносить данные элементного анализа в дополнительные материалы**, размещаемые на сайте журнала.

## РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ РУКОПИСЕЙ И ПОДГОТОВКА ИХ К ПЕЧАТИ

Все статьи, поступающие в редакцию, проходят двухступенчатое двустороннее “слепое” рецензирование (Double-blind review) независимыми экспертами.

Для **первичного** рецензирования рецензенту, как правило, дается 14 календарных дней, для **вторичного** рецензирования — 7 календарных дней.

Рукопись, направленная авторам на **доработку** после рецензирования, **должна быть возвращена** в исправленном чистовом виде в течение 7 календарных дней. К переработанной рукописи авторам необходимо приложить письмо с описанием сделанных исправлений и содержащее ответы на все замечания рецензента.

Статьи, принятые к публикации, тщательно редактируются. Небольшие исправления стилистического, номенклатурного или формального характера вносятся редактором в статью без согласования с авторами. Более серьезные исправления обсуждаются с авторами, и статья направляется авторам на доработку. При доработке авторам следует внести в текст, таблицы и рисунки все необходимые с их точки зрения исправления, а свою позицию по неучтенным исправлениям изложить в ответном письме в редакцию.

**Датой принятия** в печать считается дата поступления версии, удовлетворяющей всем требованиям рецензентов и редакторов журнала.

Доработанные статьи, возвращенные в редакцию **более чем через 2 месяца** после направления из редакции, **регистрируются как новые** и получают **новую дату поступления**.

**Очередность публикации** устанавливается по **дате принятия в печать**. Работы, признанные редакцией приоритетными и высокозначимыми, а также статьи, требующие скорейшей публикации по причинам, затрагивающим интересы авторов, **публикуются вне очереди**, если **процесс подготовки рукописи не требует** существенной доработки.

После согласования всех вопросов с авторами и предоставления авторских договоров рукопись **передается сотрудникам издательства** для осуществления набора и подготовки макета. Издатель рассылает авторам по электронной почте корректуру статьи в виде PDF-файла и инструкцию по работе с ней. На этапе корректуры авторы могут вносить лишь незначительные изменения. Замены рисунков, таблиц и крупные изменения текста не допускаются. Если же это необходимо, вопрос решается редакцией, в крайнем случае, статья переносится в другой номер.

После опубликования статьи корреспондирующему автору, указанному в статье как “Автор для связи”, издатели направляют электронные макеты русской и английской версий статьи в формате PDF.

## ОТЧЕТНОСТЬ И СПРАВКИ О ПРИНЯТИИ СТАТЬИ В ПЕЧАТЬ

До выхода статьи в свет и ее появления в базах данных редакция журнала (по запросу автора) может выдать справку о принятии статьи в печать с указанием только года принятия, например: “...статья прошла все этапы работы и принята в печать в 2023 году”.

Справка с указанием конкретного номера, в котором статья будет опубликована, может быть выдана авторам только после регистрации статьи в научной электронной библиотеке eLIBRARY.RU. Авторам **не рекомендуется** указывать в отчетах (не оповестив при этом редакцию журнала) конкретный номер, в котором планируется выход статьи, если она еще не вышла в свет (например, на этапе корректуры или при согласовании правки, даже если в макете статьи указан номер журнала).

Справка о принятии рукописи в печать выдается на официальном бланке редакции журнала за подписью заведующего редакцией. Письма и иные оповещения от редакции журнала не являются формой отчета о принятии рукописи в печать.

По независящим от редакции причинам уже подготовленная статья может попасть в “**загон**” и быть опубликована на один номер позже (при этом DOI статьи, полученный авторами при окончательной вычитке корректуры и оригинал-макета, закрепляется за статьей).

## ЭТИЧЕСКАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ АВТОРОВ

Журнал “Биоорганическая химия” стремится поддерживать высокую репутацию научных исследований. Будучи членом Комитета по этике публикаций (COPE), журнал будет следовать рекомендациям COPE относительно того, как бороться с потенциальными нарушениями этических норм.

Авторы должны воздерживаться от искажения результатов исследований, поскольку эти искажения могут нанести ущерб доверию к журналу, поставить под вопрос профессионализм авторов журнала и тем самым дискредитировать научную деятельность в целом.

Поддержание высокой репутации научных исследований и их описания может быть достигнуто путем соблюдения правил добросовестной научной практики.

Рукопись не должна направляться на рассмотрение более чем в один журнал.

Рукопись не должна быть опубликована ранее (полностью или частично), если только новая работа не расширяет содержание предыдущей работы. Пожалуйста, в таких случаях четко укажите, какие из материалов используются вами повторно, чтобы это не выглядело как самоплагиат (text recycling).

Никакие данные (включая изображения) не должны быть сфабрикованы или умышленно искажены с целью обоснования выводов, сделанных авторами.

Данные, полученные другими исследователями, а также текст или теории, авторами которых являются другие исследователи, не должны быть представлены в рукописи так, как если бы они были собственными данными, текстом или теориями авторов, приславших рукопись (“плагиат”). Должны быть даны надлежащие ссылки на другие работы, включая материал, который скопирован (почти дословно), обобщен и/или перефразирован. Кавычки используются для дословно скопированного текста. Для материалов, защищенных авторским правом, должно быть получено разрешение на их воспроизведение.

**Авторам настоятельно рекомендуется** обеспечить корректный список фамилий авторов и порядок их следования до направления рукописи в редакцию. Изменения в составе и/или в порядке следования фамилий авторов **полностью исключены** после передачи рукописи на верстку.

Добавление и/или удаление фамилий авторов и/или изменение порядка в списке авторов на стадии доработки рукописи допустимо, но должно быть оправданным. В сопроводительном письме к доработанной рукописи необходимо объяснить причину изменений и роль добавленных и/или удаленных авторов при выполнении работы. Возможно, потребуются дополнительные документы для подтверждения изложенных объяснений.

Просьбы о добавлении или удалении фамилий авторов в результате авторских споров после принятия рукописи принимаются после официального подтверждения со стороны организации или независимого органа, и/или при наличии согласия между всеми авторами.

Если есть подозрение в нарушении норм этики, журнал проводит расследование в соответствии с рекомендациями COPE. Если после расследования обвинения оказываются обоснованными, то обвиняемому автору предоставляется возможность оправдать себя. Если некорректное поведение было однозначно установлено, то главный редактор может принять в числе прочего следующие меры:

1) если статья все еще находится на рассмотрении, она может быть отклонена и возвращена автору;

2) если статья уже была опубликована онлайн, то, в зависимости от характера и серьезности нарушения, либо будет опубликован erratum к статье, либо, в случае серьезных нарушений, статья будет отозвана. Причина должна быть указана в erratum или в сообщении об отзыве (retraction note). Обратите внимание, что отзыв статьи означает, что версия статьи останется на платформе

для распространения журнала с водяным знаком “ОТОЗВАНА”, а объяснение причин отзыва дается в примечании к помеченной таким образом статье;

3) организация, в которой работает автор, может быть проинформирована о нарушении.

## ФОРМА АВТОРСКОГО ДОГОВОРА

Для возможности опубликования рукописи в журнале “Биоорганическая химия” авторам необходимо предоставить два договора: **лицензионный договор** для публикации в оригинальной (русской) версии журнала и **договор о передаче авторского права** (для публикации в английской версии журнала). **Обязательно наличие данных и подписей всех авторов рукописи.**

## ПРАВА РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ ЖУРНАЛА

Редакционная коллегия журнала оставляет за собой право отклонить статью по следующим причинам:

- 1) несоответствие профилю журнала;
- 2) недостаточная значимость полученных результатов;
- 3) нечеткая формулировка целей и задач исследования;
- 4) несоответствие современному уровню исследований;
- 5) недостаточная обоснованность выводов литературным или экспериментальным материалом;
- 6) описанные результаты уже опубликованы достаточно полно авторами статьи или другими исследователями;
- 7) неудовлетворительные литературные качества статьи и/или ее оформление, несоответствие оформления статьи “Правилам для авторов”;
- 8) в варианте, полученном редакцией после двукратной доработки авторами, не учтены (без соответствующего обоснования) все замечания рецензента;
- 9) представленный к публикации экспериментальный материал (полностью или частично) опубликован в иных изданиях (российских или зарубежных).