

ISSN 0132-3423

Том 50, Номер 5

Сентябрь - Октябрь 2024

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 50, номер 5, 2024

Особенности аминокислотного состава желатинизованных из органов и тканей ряда сельскохозяйственных животных (обзорная статья)

С. Ю. Зайцев

577

Разработка метода флуоресцентно-контрастирующего иммуноокрашивания для 3D-визуализации астроцитарной ультраморфологии

К. Е. Мочалов, О. И. Сулягина, А. В. Алтунина, Д. О. Соловьева, А. Е. Ефимов, В. А. Жучков, С. П. Чумаков, В. А. Олейников

591

Производные 3-гидроксихиназолина, аналоги эрастина, индуцируют ферроптоз в клетках колоректального рака

В. Н. Осипов, А. А. Вартамян, Д. А. Хоченков, Д. В. Гусев, О. В. Фатеевкова, Д. С. Хачатрян, Л. М. Борисова

601

Структурно-функциональные особенности белок-полисахаридных комплексов на основе цистеиновых протеаз и гидрофильно модифицированного хитозана

М. С. Лавлинская, А. В. Сорокин, С. С. Гончарова, М. Г. Холявка, М. С. Кондратьев, В. Г. Артюхов

612

Подход к получению циклических фоторасщепляемых РНК для фотоактивируемой системы CRISPR/Cas9

Е. В. Иванская, М. И. Мещанинова, М. А. Воробьева, Д. О. Жарков, Д. С. Новопашина

622

Синтез пептидных фрагментов гликопротеина Spike SARS-CoV-2 и изучение их связывания с клетками крови человека

О. В. Грибовская, В. В. Янченко, А. М. Цыганков, В. П. Мартинович

636

АТФ-зависимые LonBA-протеазы бацилл и клостридий

А. Г. Андрианова, А. М. Куджаев, И. В. Смирнов, Т. В. Ротанова

649

Вос/Bzl-твердофазный синтез пептида дельторфина II и его аналогов без применения безводного фтористого водорода

В. Н. Азев, Л. Г. Мустаева, Е. Ю. Горбунова, Л. К. Байдакова, А. Н. Чулин, Л. Н. Маслов, А. В. Мухомедзянов, М. В. Молчанов, А. И. Мирошников

657

ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

Получение активных аминогрупп на поверхности полиэтилентерефталатной пленки и их количественная оценка для технологии биологических микрочипов

Г. Ф. Штылев, И. Ю. Шишкин, С. А. Лапа, В. Е. Шершов, В. Е. Барский, С. А. Поляков, В. А. Василисков, О. А. Заседателева, В. Е. Кузнецова, А. В. Чудинов

665

Иммобилизация белковых зондов на биочипах с ячейками из щеточных полимеров

Г. Ф. Штылев, И. Ю. Шишкин, В. Е. Шершов, В. Е. Кузнецова, Д. А. Качуляк, В. И. Бутвиловская, А. И. Левашова, В. А. Василисков, О. А. Заседателева, А. В. Чудинов

672

Выявление мутаций генов *IDH1/2* в образцах опухоли с низкой представленностью мутантного аллеля

В. О. Варачев, Д. А. Гуськов, О. Ю. Сусова, А. П. Шехтман, Д. В. Рогожин, С. А. Суржиков, А. В. Чудинов, А. С. Заседателев, Т. В. Наседкина

686

Использование флуоресцентной времяразрешенной микроскопии для повышения селективности флуорогенных красителей ряда арилиден-имидазолонов в отношении эндоплазматического ретикулума

А. Р. Гильванов, А. Ю. Смирнов, С. А. Краснова, И. Д. Соловьев, А. П. Савицкий, Ю. А. Богданова, М. С. Баранов

694



УДК 577.112.3+665.931.7

ОСОБЕННОСТИ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ЖЕЛАТИНОВ ИЗ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ РЯДА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

© 2024 г. С. Ю. Зайцев*,#

* ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста”,
Россия, 142132 Подольск, Дубровицы, 60

Поступила в редакцию 05.01.2024 г.

После доработки 21.01.2024 г.

Принята к публикации 22.01.2024 г.

Желатины образуются при технологических процессах переработки белков соединительной ткани животных (прежде всего коллагенов) и с биохимической точки зрения представляют собой различные полипептидные продукты. В большинстве случаев желатины, как коммерческие продукты, на 52.5% производятся из кожи и костей крупного рогатого скота (КРС), на 46.0% – из кожи свиней и только на 1.5% – с использованием других видов животных. В начале XXI века основная масса произведенных желатинов используется в пищевых продуктах, около трети – в медицинском секторе и только ~6% – в технических или других областях промышленности. В настоящее время усилилась тенденция к здоровому образу жизни, что, наряду с религиозно-культурными традициями многих стран, побуждает ученых искать источники желатинов, не относящиеся к млекопитающим, но близкие к ним по физико-химическим и функциональным характеристикам. Поэтому в последнее время появилась тенденция к некоторому снижению гигантского объема производства желатинов из млекопитающих (КРС и свиней), но пока несущественному по сравнению с относительным ростом производства желатинов из субпродуктов и отходов промышленного птицеводства, тем более что за последние десятилетия мировое производство мяса птицы выросло более чем на треть. Показано оптимальное содержание аминокислот (АК) и их соотношений в желатинах из кожи КРС и свиней для их дальнейшего использования. Конечно, содержание АК в желатинах из кожи свиньи и КРС, определенное в различных технологических условиях, может существенно отличаться, но в целом эти отличия носят не критический характер, поэтому иногда желатины получают из смеси отходов животноводства. Недавно в России была предложена композиция белковых ингредиентов из гидролизатов кожи свиньи и КРС с добавками высушенной плазмы крови, которая имела более “ценный” АК-состав, чем в традиционных желатинах, что позволило авторам сделать предположение о повышенной биологической и пищевой ценности разработанного продукта. Кроме того, ряд авторов обнаружил улучшение отдельных показателей и биологических свойств желатинов из смеси отходов животноводства при образовании некоторых специфических пептидов. Таким образом, в настоящее время активно разрабатываются новые композиции на основе известных желатинов с оптимальным АК-составом, способствующим улучшению питательных и функциональных свойств. Научная и практическая значимость данного обзора заключается в детальном описании основных исследований по АК-составу желатинов и выявлении взаимосвязи их АК-состава с ключевыми биохимическими и технологическими показателями материалов на основе желатинов.

Ключевые слова: аминокислотный состав, белки, желатины и коллагены, биохимия животных

DOI: 10.31857/S0132342324050018, **EDN:** LSGJXZ

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	578
2. СОДЕРЖАНИЕ АМИНОКИСЛОТ В РАЗЛИЧНЫХ ЖЕЛАТИНАХ	579

Сокращения: АК – аминокислоты; КРС – крупный рогатый скот.

Автор для связи: (тел.: +7 (4967) 651-363; +7 (499) 237-42-81; эл. почта: s.y.zaitsev@mail.ru).

2.1. Аминокислотный состав желатинированных из кожи и костей крупного рогатого скота	580
2.2. Аминокислотный состав желатинированных свиней	583
2.3. Аминокислотный состав желатинированных из субпродуктов и отходов промышленного птицеводства	585
3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	587
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	587

1. ВВЕДЕНИЕ

В тематику Института биоорганической химии (ИБХ) АН СССР (ныне ИБХ им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН), связанную со структурно-функциональными исследованиями различных пептидов и белков, мне повезло включиться после зачисления стажером-исследователем в лабораторию полимеров для биологии с 16 октября 1980 г. (зав. лабораторией проф. В.П. Зубов). Лаборатория была создана директором ИБХ акад. Ю.А. Овчинниковым для решения ряда прикладных проблем биоорганической химии, физико-химической биологии и биотехнологии. Одними из главных направлений нашей лаборатории были хроматографический анализ пептидов и белков, включая их аминокислотный состав; создание специфических хроматографических материалов для разделения мембранных белков и липидов; получение ультратонких пленочных и супрамолекулярных систем на основе синтетических и природных полимеров. Ю.А. Овчинников регулярно посещал нашу лабораторию после ее переезда из помещений корпуса “А” МГУ в один из первых корпусов (№ 34) нового здания ИБОХ АН СССР, поскольку ему (и как директору, и как ученому) было важно лично посмотреть, как функционирует научная лаборатория в помещениях, оснащенных новой лабораторной мебелью (по удобству работы не имеющей аналогов в СССР) и специальным оборудованием. При этом он всегда искренне интересовался работой молодых сотрудников лаборатории и периодически читал лекции для студентов как в МГУ и ИБХ, так и на зимних молодежных научных школах в Пущино, куда мы с радостью приезжали при первой возможности. Также хочу отметить замечательную книгу Ю.А. Овчинникова “Биоорганическая химия” [1], которая стала для меня одной из первых систематических книг по аминокислотному составу белков и другим многочисленным вопросам биоорганической химии, а также очень помогала мне не только в научной работе, но и при проведении занятий со студентами и аспирантами. Эта книга Ю.А. Овчинникова не потеряла своего значения и в наше время,

она может быть рекомендована для понимания методических подходов и этапов развития большого научного направления исследований аминокислот (АК) и других биоорганических соединений.

Имея такую большую и славную историю [1], в настоящее время в мире активно продолжают исследования АК-состава органов и тканей именно сельскохозяйственных животных, что имеет не только фундаментальное [2–4], но и важное прикладное значение [5–7]. Например, исследования АК-состава органов и тканей основных видов сельскохозяйственных животных связаны как с оптимизацией их кормления, содержания, получения качественных продуктов питания животного происхождения [5–7], так и с переработкой субпродуктов животноводства в полезные пищевые или технические добавки [8, 9], что ярко иллюстрируется продуктами и материалами на основе желатинированных животного происхождения [10]. По заявлениям ряда авторов [8], в мире существует необходимость в увеличении производства желатинированных различного типа (пищевых и технических), которое с 2011 по 2018 гг. увеличилось практически на треть [8]. Согласно ряду международных источников [8–10], прогнозируется большой рост мирового рынка желатина. Например, к концу 2027 г. общий объем рынка желатина может составить 6.7 млрд долларов США при среднегодовом темпе роста 9.29% [10].

Как известно, желатины образуются при технологических процессах переработки белков соединительной ткани животных (прежде всего коллагенов) и с формальной точки зрения представляют собой различные полипептидные продукты [11–14]. Многочисленные определения желатина приводятся практически в каждой статье, упоминающей этот важный продукт, в том числе в публикациях, цитируемых выше и ниже в данном обзоре. В большинстве случаев желатины, как коммерческие продукты, на 52.5% производились из кожи и костей крупного рогатого скота (КРС), на 46.0% – из кожи свиней и только на 1.5% – с использованием других видов животных [14].

По данным Института производителей желатина Америки (Gelatin Manufacturers Institute of America) [14], в начале XXI века 63% желатина используется в пищевых продуктах, 31% – в медицинском секторе и 6% – в технических или других областях промышленности [8–10]. Интересно, что в последнее время “кошерный/халяльный статус” стал одним из основных индикаторов по отношению к желатину млекопитающих на глобальном рынке продовольствия с точки зрения маркетинга [8–10]. Кроме религиозно-культурных традиций в настоящее время усилилась тенденция к здоровому образу жизни, что побуждает ученых искать источники желатина, не относящиеся к млекопитающим, но близкие к ним по физико-химическим и функциональным характеристикам [8–10]. Поэтому в последнее время появилась тенденция к некоторому снижению гигантского объема производства желатинов из млекопитающих (коров и свиней), пока еще несущественному по сравнению с относительным ростом производства желатинов из субпродуктов и отходов промышленного птицеводства (головы, лапки, кости, части соединительной ткани тушек). За последнее десятилетие производство мяса птицы выросло на ~37.34% [8–10].

Известно, что большое содержание коллагенов в соединительной ткани (в коже, сухожилиях, связках и т.д.) – большой плюс как для людей, так и для животных в физиолого-биохимическом аспекте [11, 15], коллагены составляют примерно треть от общего количества белков организма [13]. Коллагены и полученные из них продукты в настоящее время широко используются в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности благодаря своим питательным и функциональным свойствам [11–15]. Как известно [11–15], одна молекула коллагена, независимо от его многочисленных типов, состоит из трех полипептидных цепей и в сумме имеет молекулярную массу ~300 кДа, включая ~3000 а.о. [15–18]. Коллаген I типа широко известен как основной фибриллярный коллаген у человека и многих млекопитающих из-за его уникальной способности образовывать *in vitro* нерастворимые волокна с высокой прочностью на растяжение и стабильностью [15–18]. Соответственно, в целом основная структура молекулы коллагена (как и желатина) характеризуется наличием высокого содержания глицина (Gly), пролина (Pro) и гидроксипролина (HyPro) в аминокислотных цепях (в виде повторяющихся триплетов) [11–18]. Например, присутствие Gly в каждом третьем остатке – критическое условие для формирования

суперспиральной структуры коллагена [11, 15, 18], но важная роль здесь принадлежит HyPro, а также серину (Ser) и треонину (Thr) за счет возможности гидроксильных групп поддерживать межцепочечные связи [11–18]. Таким образом, структурно-функциональные особенности белков определяются их первичными аминокислотными последовательностями, что полностью согласуется с фундаментальными основами современной химии белков, заложенными во многих работах акад. Ю.А. Овчинникова и сотрудников. Здесь, из-за краткости обзора, предлагаю читателям вновь обратиться к замечательной книге Ю.А. Овчинникова [1], которая до сих пор является настольным пособием для студентов и преподавателей, молодых научных сотрудников и меня лично. Вплотную аминокислотным анализом мне пришлось заниматься в период длительных зарубежных командировок, работы заведующим кафедрой органической и биологической химии Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, а исследованием особенностей АК-состава белков крови и других органов и тканей ряда видов сельскохозяйственных животных – в настоящее время в ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста. Ряд данных последних лет по этим вопросам собран в монографии 2022 г. [19].

Цель данного исследования – выявление общих параметров и отличительных особенностей АК-состава желатинов из коллагенов основных видов сельскохозяйственных животных (прежде всего КРС, свиней и птиц) для оценки состояния и перспектив промышленного применения таких желатинов.

2. СОДЕРЖАНИЕ АМИНОКИСЛОТ В РАЗЛИЧНЫХ ЖЕЛАТИНАХ

Наиболее общий и самый дешевый комплексный способ получения желатинов – денатурация растворимых коллагенов животных при термическом воздействии и гидролизе, катализируемом кислотой или щелочью (в присутствии или в отсутствие катализаторов) [20–24]. В простейшем случае термическая денатурация образцов декальцинированной соединительной ткани происходит либо в жестких условиях в случае костей и кожи крупного рогатого скота (КРС) [20, 21], либо в более мягких условиях путем нагревания коллагена в нейтральных или слабокислых условиях до ~40°C [22, 23]. В первый момент разрушаются только водородные связи и гидрофобные взаимодействия, т.е. происходит дестабилизация спиралей коллагенов,

в результате чего образуются мономерные единицы тропоколлагенов [21]. На следующем этапе гидролиза коллагенов происходит разрыв внутримолекулярных связей и образуется смесь полипептидов [24]. Свойства и физико-химические характеристики полученных желатинированных связаны с их АК-составом и молекулярно-массовым распределением [25–28]. Например, желатины с низким содержанием определенных иминокислот (Pro и HyPro) имеют более низкую температуру плавления и прочность геля [25]. Эти результаты показывают важность полноты экстракции АК из исходного сырья, т.е. превращения коллагенов в желатины при разрывах меж- и внутримолекулярных связей [29]. Выявлены существенные различия в степени и типе этих связей, обнаруженных в костях и коже животных [11–15, 29, 30], рыб [17–19, 22, 31–34] и насекомых [21, 26–28]. На функциональные свойства желатинов сильно влияет структура и АК-состав полипептидных цепей, что будет описано ниже.

2.1. Аминокислотный состав желатинов из кожи и костей крупного рогатого скота

Первая особенность приводимых данных по АК-составу как исходных коллагенов, так и желатинов животного происхождения – отсутствие, как правило, такой аминокислоты, как Trp [15, 21, 31–33]. При детальном рассмотрении их АК-состава выясняется, что преобладают глицин Gly, Pro и HyPro [15, 12, 34]. Ключевые сложности в сравнении данных разных авторов [35–44] – неодинаковое количество определяемых аминокислот (от 10 до 19) в образцах, разные условия (и даже методы) анализа и единицы измерения содержания АК (г/100 г или мг/100 мг сухого и беззольного белка, моль/100 000 г белка, мг% и др.).

Имеются многочисленные данные о содержании аминокислот в желатинах, выделенных из различных тканей КРС, таких как бычья шкура, кожа, шерсть, кости, хрящи и сухожилия. Наиболее хорошо изучено содержание АК в желатине из кожи и костей КРС, полученном при различных условиях приготовления желатина (табл. 1) [33, 45, 46].

В работах за последние десятилетия [33–47] обобщены основные данные по анализу содержания АК в различных желатинах КРС, которые показали большое различие практически по всем АК. Эти различия связаны не столько с составом органов и тканей КРС, сколько с отличиями в методиках гидролиза коллагенов (т.е. выделения

желатинов КРС) и с несовершенством методов анализа АК. Если пытаться определить качественные сходства и наиболее общие интервалы содержания АК в различных желатинах КРС, то в этих работах можно выделить ряд основных АК, таких как Gly (20–27%), Pro (10–15%), Ala (7–10%) и др. (табл. 1). Эти данные получены после обработки исходных значений для основных 19 аминокислот (без Trp) и без учета гидроксикаминокислот: гидроксипролина (HyPro) и гидроксизина (HyLys), которые имеют важное значение, но не часто определяются в таких образцах.

Иногда вместо 19 протеиногенных АК говорят о содержании только 16 или 17 аминокислот, поскольку ряд аминокислот (Cys и амиды), как правило, не выдерживает процесса экстракции при повышенных температурах [5, 34]. Так, Cys практически полностью разрушается во многих препаратах, Asn и Gln во многих препаратах превращаются в Asp и Glu, поэтому реальное значение содержания Asp включает в себя бывший Asn, так же как Gly и Gln, которые часто измеряются вместе.

Во всех случаях измерения желатина из бычьей кожи показано общее сходство для основных АК, таких как Gly, Pro, Ala, и ряда других (табл. 1). Есть несколько значений содержания аминокислот в желатине из бычьей кожи, которые немного отличаются: Lys, His, Phe, HyPro, Met, Tyr и Thr (табл. 1). Напротив, существуют большие различия между значениями АК для желатина из бычьей кожи [45, 46] и из костей [33], особенно для Pro, Ala, Ser, Tyr и Val. То же самое справедливо и для некоторых других работ [47–50], поэтому целесообразно рассматривать значения содержания АК в желатине из бычьих шкур [46] как референтную ссылку (табл. 1) для других данных по содержанию АК в желатине из бычьих шкур.

В целом такая тенденция сохраняется и для современных данных по содержанию АК в различных желатинах из кожи (шкур) молодых бычков (табл. 2), полученных путем действия ультразвука при напряжении 200–400 Вт [50].

Содержание свободных АК может отражать процесс гидролиза белков [50] – чем больше извлечение белка, тем лучше эффект гидролиза [50]. По сравнению с контрольной группой степень гидролиза, скорость восстановления белка в гидролизатах и их антиоксидантная активность были значительно выше после обработки ультразвуком мощностью до 300 Вт, но при дальнейшем увеличении мощности ультразвука существенных изменений не наблюдалось (табл. 2).

Таблица 1. Содержание аминокислот в различных желатинах из кожи и костей КРС [33, 45, 46]

№	АК	Содержание аминокислот					
		кожа КРС*, М/10 ⁵ г [45]	кожа КРС, % [45]	кожа КРС*, М/10 ⁵ г [46]	кожа КРС, % [46]	кости КРС, г/кг [33]	кости КРС, % [33]
1	Ala	113	11.17	123.2	11.18	93.9	10.6
2	Arg	47	4.64	50.8	4.62	88.9	10.1
3	Asp	46	4.55	50.6	4.60	46.4	5.3
4	Cys	–	–	–	–	21.6	2.4
5	Gly	342	33.79	366.0	33.28	235.0	26.6
6	Glu	74	7.31	77.8	7.07	80.8	9.2
7	His	4	0.40	5.0	0.45	6.9	0.8
8	Ile	11	1.09	13.2	1.20	14.1	1.6
9	Leu	24	2.37	25.4	2.31	31.1	3.5
10	Lys	25	2.47	30.6	2.78	47.3	5.4
11	Met	4	0.40	6.0	0.55	7.7	0.9
12	Phe	12	1.19	13.5	1.23	7.6	0.9
13	Pro	127	12.55	141.9	12.90	122.1	12.7
14	Ser	39	3.85	40.2	3.65	45.2	5.1
15	Thr	33	3.26	18.6	1.69	16.5	1.9
16	Tyr	4	0.40	1.6	0.15	4.9	0.5
17	Val	19	1.88	22.1	2.01	22.6	2.5
18	HyPro	83	8.20	107.4	9.76	107.1	–
19	HyLys	5	0.49	6.0	0.55	–	–

Примечание: HyPro – гидроксипролин; HyLys – гидроксизин. Прочерк – не определялось количественно.

* Значения приведены в моль/10⁵ г сухого и беззольного белка.**Таблица 2.** Влияние ультразвука (200–400 Вт) на содержание аминокислот в различных желатинах из кожи (в гидролизате шкур) молодых бычков [50]

№	АК	Содержание аминокислот, г/100 г			
		200 Вт	300 Вт	400 Вт	К
1	Ala	7.27	7.32	7.12	6.69
2	Arg	6.30	6.44	6.22	5.82
3	Asp	4.95	5.00	4.87	4.67
4	Cys	–	–	–	–
5	Gly	20.32	20.60	20.13	19.08
6	Glu	8.54	8.66	8.46	8.11
7	His	0.57	0.58	0.53	0.47
8	Ile	1.15	1.15	1.17	0.95
9	Leu	2.64	2.92	2.59	2.41
10	Lys	2.98	3.02	2.95	2.76
11	Met	0.60	0.60	0.59	0.34
12	Phe	1.75	2.10	1.88	1.47
13	Pro	10.57	10.70	10.47	9.79
14	Ser	2.67	2.70	2.65	2.53
15	Thr	1.56	1.56	1.54	1.46
16	Tyr	0.79	1.40	0.74	0.57
17	Val	1.96	1.98	1.92	1.79

Примечание: прочерк – не определялось количественно. Контрольный образец желатина (К) был извлечен из коллагена без использования ферментов.

Как показано в табл. 2, общее содержание свободных АК в желатиновом гидролизате из кожи молодых бычков, предварительно обработанном ультразвуком мощностью 200, 300 и 400 Вт, составило 0.864, 0.876 и 0.913 г/100 г, что на 5.9, 7.3 и 11.9% выше, чем в контроле (0.816 г/100 г). Эти результаты близки к данным Zou et al. [51] по изменениям в содержании АК в гидролизате головного мозга свиньи после обработки ультразвуком. Содержание свободных АК возрастает при увеличении мощности ультразвука, что согласуется с результатами по степени гидролиза и скорости восстановления белка, однако антиоксидантная активность гидролизата достигла максимального значения 14.3% при мощности 300 Вт, что было на 45.2% выше, чем у контроля (возможно, из-за того, что ультразвуковая обработка изменила структуру белка и увеличила количество основных и ароматических аминокислот). Как показано в табл. 2, предварительная обработка ультразвуком мощностью 200, 300 и 400 Вт изменила содержание общих (основных) аминокислот до значений 68.93, 76.43 и 76.73 г/100 г, что на 6.6% меньше или на 3.5 и 3.9% выше, чем в контроле (73.83 г/100 г). Примечательно, что как основные (Lys, Arg и His), так и ароматические АК являются донорами водорода и считаются эффективными поглотителями свободных радикалов [51, 52]. В настоящем исследовании содержание Asp и Glu в гидролизате желатина из бычьей кожи, предварительно обработанного ультразвуком мощностью 300 Вт, составляло 5.00 и 8.66 г/100 г соответственно; эти значения были на 7.06 и 6.78% выше, чем в контроле (4.67 и 8.11 г/100 г соответственно). Кроме того, антиоксидантная способность гидролизата была связана с содержанием C-концевых (Arg и Tyr) и N-концевых аминокислот (His, Phe и Leu) [52]. По сравнению с контролем, гидролизаты желатина из бычьей кожи, обработанные ультразвуком оптимальной мощностью 300 Вт, имели содержание C- и N-концевых аминокислот на 22.69 и 28.74% выше соответственно.

В работах [29–32, 47–49] изучено влияние на АК-состав желатинов различных ферментов (растительных и животных), которые использовали для предварительной обработки бычьей кожи. Например, растительные ферменты актинидин (А) и папаин (Р) использовали на уровне 5–25 ед./г кожи для предварительной обработки бычьей кожи при соответствующих оптимальных рН и температуре в течение 48 ч (табл. 3) [49].

Содержание таких аминокислот, как Gly, Pro и HyPro (табл. 3), при гидролизе пепсином (П) на

уровне 5–25 отн. ед. (на 1 г кожи) варьировалось и составляло ~21.5, 10.5 и 14.8% соответственно, т.е. было близко к показателю в контрольной группе (К): 19.9, 10.3 и 14.1% соответственно [47]. При этом указанные значения (как в случае П, так и в случае К) сильно отличаются от данных Mulyani et al. [53] по Gly (ниже на 16.2 или 10.0%), но практически совпадают с данными по Pro и HyPro [53]; незначительно отличаются от данных Aykın-Dinçer et al. [54]: ниже на 4.2% или выше на 3.4% по Gly, тогда как более чем на порядок (на 95–102%) выше по Pro и значительно ниже (на 43.9–51.0%) по HyPro [54]. Это связано с существенными различиями в процессах предварительной обработки кислотой [31, 52–54] или с отсутствием ферментной обработки [55], что и привело к изменению содержания аминокислот. Так, сообщалось [31, 53–55] о гораздо меньшем (на 13.0 или на 31.0%) содержании суммы иминокислот (Pro и HyPro) в желатине из бычьей кожи по сравнению с содержанием суммы иминокислот как в случае П (~25.3%), так и в случае К (~24.4%).

При исследовании действия карбоновых кислот (соляной, уксусной и лимонной) в присутствии пепсина (7 ч при 70°C) на процесс экстракции желатинов из костной ткани КРС в работе Cao et al. [56] показано, что лимонная кислота более эффективно разрушает структуру исходного коллагена по сравнению с уксусной и соляной кислотами в равных концентрациях [56]. Кроме того, использование пепсина в смеси с любой из кислот приводит к достоверно более высоким выходам желатинов ($p < 0.05$) по сравнению с контрольной группой без участия пепсина [56]. Таким образом, коллагены, предварительно обработанные лимонной кислотой и пепсином, более эффективно гидролизуются в желатины, чем без ферментативной обработки [56].

Важно, что содержание иминокислот (Pro и HyPro) в желатине бычьей кожи при использовании ферментов типа актинидина (А), папаина (Р), бромелаина (Б) и зингибаина (З) составляло 19.3, 25.1, 24.9 и 25.5% соответственно [48, 49], что значительно ниже (на 20.9% в случае А), незначительно отличается (на 2.9 или 4.5% в случае Р или З) или сопоставимо (для Б) с контролем (~24.4%) [47]. При использовании всех указанных ферментов (на уровне 25 ед./г кожи) выход желатинов был значительно выше, чем в контроле (достоверные отличия, $p < 0.05$) [47–49]. Причем значения прочности геля и вязкости для желатинов, экстрагированных с использованием актинидина, были значительно выше, чем в контроле (283.35 г) (достоверные отличия, $p < 0.05$) [47–49]. Однако

Таблица 3. Аминокислотный состав желатинов, экстрагированных из бычьей кожи при добавлении пепсина (П) [47], бромелаина (Б) [48], зингибаина (З) [48], актинидина (А) [49] и папаина (Р) [49], на уровне 25 отн. ед. на г кожи в сравнении с контролем (К)

№	АК	Аминокислотный состав, %/г кожи					
		К	П	Б	З	А	Р
1	Hyp	14.14	14.76	14.49	15.42	10.93	14.96
2	Asp	4.06	3.54	3.54	3.57	2.95	3.80
3	Ser	2.82	3.20	3.03	3.27	2.11	3.11
4	Glu	7.81	7.18	7.01	7.11	5.70	7.63
5	Gly	19.87	21.47	20.84	21.65	15.97	21.38
6	His	0.82	0.93	0.85	0.94	0.57	0.93
7	Arg	6.87	7.35	7.13	7.29	5.26	7.14
8	Thr	1.63	1.79	1.74	1.78	1.30	1.72
9	Ala	6.50	6.70	6.79	6.68	5.01	6.79
10	Pro	10.29	10.51	10.40	10.08	8.31	10.14
11	Tyr	0.62	0.69	0.78	0.80	0.47	0.72
12	Val	2.11	2.07	2.14	2.13	1.68	2.13
13	Lys	3.13	3.01	2.91	2.84	2.32	3.15
14	Ile	1.30	1.35	1.43	1.44	1.02	1.36
15	Leu	2.66	2.76	2.78	2.89	2.12	2.71
16	Phe	1.78	1.89	1.93	2.01	1.41	1.85

Примечание: контрольный образец желатина (К) был извлечен из коллагена без использования ферментов.

прочность геля и вязкость для желатинов, экстрагированных с использованием папаина и бромелаина, была значительно ниже, чем в контроле (283.35 г) (достоверные отличия, $p < 0.05$) [47–49]. Образцы желатина, экстрагированного зингибаином (З), не образовывали гель, а вязкость этих желатинов была значительно ниже, чем у желатинов, экстрагированных с использованием бромелаина (достоверные отличия, $p < 0.05$) [48]. Полученные данные можно объяснить степенью деградации α - и β -цепей, а также присутствием пептидов с невысокой молекулярной массой [40, 47–49]. С использованием этих и других методов (инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье и сканирующей электронной микроскопии) обнаружены существенные изменения в молекулярном порядке (нарушения α -спиральной структуры), что позволило авторам [40, 47–49] сделать вывод о том, что актинидин и бромелаин могут более эффективно использоваться как для относительного увеличения выхода, так и для улучшения свойств желатина из бычьей кожи по сравнению с другими изученными ферментами [40, 47–49].

2.2. Аминокислотный состав желатинов свиней

Следует обратить внимание, что в доступной литературе представлены данные об АК-составе желатинов только из кожи свиней или вообще без

упоминания органов и тканей свиней [57–60] – это существенное отличие от данных по желатинам, получаемым из разных органов и тканей КРС (что описано выше). Представляется важным сравнить литературные данные об АК-составе желатинов из кожи свиньи (PSG) с таковыми из кожи КРС (BSG). В солидной работе Hafidz et al. [57] были исследованы желатины из бычьей и свиной кожи не только в плане сравнения по АК-составу (табл. 4) и структуре полипептидов, но и по “силе проседания”, мутности и пенообразующим свойствам [57], что исключительно важно для технического применения желатинов.

По мнению авторов [57], абсолютное содержание Gly, Pro и Arg в свином желатине было заметно выше, чем в бычьем желатине, хотя структура полипептидов обоих желатинов очень близка (как в столбцах 1 и 4 в табл. 4). Однако если пересчитать это в относительные данные (% к сумме всех АК, как в столбцах 2 и 3 в табл. 4), то заметные отличия видны только по содержанию Tyr (на 48.1%), Phe (на 14.6%), Thr (10.3%), Val (10.3%), которых больше в свином желатине, чем в бычьем желатине [57]. Кроме того, содержание Ile (на 27.3%), Met (на 9.1%), Gly (на 6.2%) меньше в свином желатине, чем в бычьем желатине [57]. Причем в этой работе не приведены данные по Cys и His, их содержание обычно невелико и не повлияет на общие тенденции в полученных

Таблица 4. Аминокислотный состав желатинов кожи свиней (PSG) и крупного рогатого скота (BSG) в сравнительном аспекте [57]

№	АК	Содержание аминокислот			
		PSG*	PSG, %	BSG*	BSG, %
1	Ala	80	8.85	33	8.62
2	Arg	111	12.28	47	12.27
3	Asp	41	4.54	17	4.44
4	Cys	—	—	—	—
5	Gly	239	26.44	108	28.20
6	Glu	83	9.18	34	8.88
7	His	—	—	—	—
8	Ile	12	1.33	7	1.83
9	Leu	29	3.21	12	3.13
10	Lys	27	2.99	11	2.87
11	Met	10	0.11	4	1.04
12	Phe	27	2.99	10	2.61
13	Pro	151	16.70	63	16.45
14	Ser	35	3.87	15	3.92
15	Thr	26	2.88	10	2.61
16	Tyr	7	0.77	2	0.52
17	Val	26	2.88	10	2.61

Примечание: прочерк – не определялось количественно.

* Число остатков на 1000 а.о.

значениях содержания АК в свином и бычьем желатине (табл. 4). Небольшие отличия в свином и бычьем желатинах [57] по содержанию Glu и Gln, Pro и ряда других АК (менее чем на 5%) не являются статистически значимыми (табл. 4) и не будут здесь обсуждаться.

Следует обратить внимание, что “сила проседания” – важная характеристика, определяющая сорт желатинов и область их использования в промышленности [20–23]. Обнаружено, что “сила проседания” у желатинов свиней существенно выше (в среднем в 1.5 раза), чем у бычьих желатинов (в диапазоне pH 3–10) [57], причем желатины из обоих источников обладали самыми высокими (низкими) “силами проседания” при pH 9 (pH 3). Так, по данным Hafidz et al. [57], у желатинов из свиных кож максимальные (минимальные) значения составляли 415.1 (330.6), а у желатинов из бычьих кож – 270.4 (193.5) отн. ед. Блума. С другой стороны, такие параметры, как расширение и стабильность пены (FE и FS), у бычьих желатинов были в разной степени выше, чем у свиных желатинов при всех изученных концентрациях водных растворов (2–5%) [57]. Так, у желатинов из бычьих кож максимальные (минимальные) значения FE и FS составляли 93.0 ± 2.7 и $91.7 \pm 3.2\%$ (72.3 ± 5.5 и $86.5 \pm 5.5\%$) при концентрациях 2% (5%). Для сравнения, у

желатинов из свиных кож максимальные (минимальные) значения FE и FS составляли 93.0 ± 1.0 и $88.67 \pm 2.5\%$ (53.0 ± 1.0 и $51.33 \pm 0.6\%$) при концентрациях 3% (5%) [57].

По данным Hafidz et al. [57], у желатинов из свиных кож значения мутности (поглощения их растворов при 360 нм) были значительно ниже (почти в 12 раз), чем у желатинов из бычьих кож при всех изученных pH (pH 3.0–9.0). Мутность растворов желатинов из бычьих кож была максимальной при pH 7 и снижалась при щелочных pH, тогда как растворы желатинов из свиных кож показали наибольшую мутность при pH 9 (хотя эти значения мало отличались от таковых в области pH 5–7) [57]. Эти эффекты связаны с различиями в изоэлектрических точках растворов указанных желатинов [20–22]. Как известно, при pH, близких к изоэлектрической точке растворов указанных желатинов, происходит агрегация молекул этих белковых и пептидных фрагментов (с β- и α-цепями молекулярных масс ~220 и 100 кДа), поскольку снижается их взаимодействие с молекулами воды [20–22].

Конечно, полученные в различных технологических условиях данные по содержанию АК в желатинах из кожи свиньи и КРС могут существенно отличаться [14, 34, 40, 46, 57–61]. Однако в целом эти отличия носят не критический

характер, как описано выше. Именно поэтому желатины в промышленности иногда получают из смеси отходов животноводства. Более того, в работе Kremenevskaya et al. [61] была предложена композиция белковых ингредиентов из гидролизатов кожи свиньи и КРС с добавками высушенной плазмы крови в соотношении 45 : 45 : 10. Показано, что АК-состав препаратов, полученных с добавлением сухой плазмы крови, существенно более “ценный”, чем в традиционных желатинах (по аминокислотному “скорю” в сравнении с идеальным белком, рекомендованным ВОЗ/ВТО), что позволило авторам сделать предположение о повышенной биологической и пищевой ценности разработанного продукта [61]. Кроме того, авторы обнаружили улучшение реологических и органолептических показателей при добавлении до 15% указанной выше композиции вместо говядины в технологию производства фаршевых полуфабрикатов [61].

2.3. Аминокислотный состав желатинов из субпродуктов и отходов промышленного птицеводства

В работах [14, 41–45] приведены данные о содержании аминокислот в желатинах из органов и тканей кур и цыплят, уток и индеек. Конечно, наибольший интерес представляет сравнение АК-состава желатинов птиц со свиным и бычьим желатинами. Поэтому обращаем внимание на работу Abedinia et al. [14], в которой приведены данные по АК-составу желатинов из кожи и ног уток, кур и индеек в сравнении с коммерческим желатином из шкуры свиней (табл. 5), о котором говорилось выше (табл. 4).

Согласно данным Abedinia et al. [14], желатины из кожи уток (DSG) после экстракции 0.1 М (0.6%-ным) раствором уксусной кислоты по АК-составу сильно отличались как в положительную сторону по Pro (+34.0), Ser (+30.6), Gly (+28.9), Met (+21.8), His (+21.3), Ala (+18.6), так и в отрицательную сторону по Thr (–83.8), Lys (–28.0), Val (–22.9), Asn + Asp (–19.8), Ile (–15.4), Cys (–9.0), Leu (–6.9), Tyr (–10.0), Arg (–7.4) и практически не отличались по Phe (–4.3), Gln + Glu (+1.2) (табл. 5) по сравнению с таковым для желатина из свиной кожи (коммерческий тип А).

Желатины из кожи цыплят (CSG) после экстракции раствором NaOH (0.15%, *m/v*), а затем раствором серной кислоты (0.15%, *v/v*) по АК-составу сильно отличались как в положительную сторону по Gly (+66.8), Tyr (+52.5), Ala (+21.4), Lys (+16.5), так и в отрицательную сторону по Met (–93.6), Asn + Asp (–64.8), His (–62.5), Gln + Glu (–44.4),

Ser (–38.9), Thr (–36.9), Arg (–34.5), Val (–19.2), Phe (–15.7), Ile (–11.5), Leu (–9.3) и практически не отличались по Cys (–2.0) и Pro (± 0.1) (табл. 5) по сравнению с таковым для желатина из свиной кожи [14].

Согласно данным Abedinia et al. [14], желатины из кожи индейки (MDTRG) после экстракции 5%-ным раствором соляной кислоты при 70°C по АК-составу сильно отличались как в положительную сторону по Ile (+80.8), Gly (+74.0), Ala (+56.5), Thr (+31.3), Lys (+25.3) и Met (+19.1), так и в отрицательную сторону по Leu (–53.1), Tyr (–46.3), Arg (–32.5), His (–27.5), Ser (–23.6), Phe (–21.4), Gln + Glu (–17.5), Val (–6.7) и практически не отличались по Asn + Asp (–3.0), Cys (–2.0), Pro (+3.5) (табл. 5) по сравнению с таковым для желатина из свиной кожи [14].

Интересно, что желатины из лап уток (DFG) после экстракции 4%-ным раствором уксусной кислоты по АК-составу сильно отличались как в положительную сторону только по Met (+21.8), так и в отрицательную сторону по Thr (–70.6), Lys (–56.3), Gly (–56.0), Asn + Asp (–54.7), Gln + Glu (–47.3), Tyr (–46.3), Arg (–33.3), Ser (–23.6), Leu (–13.8), His (–12.5), Phe (–12.4), Ile (–12.3), Val (–6.7), Ala (–2.2) и практически не отличались по Pro (+3.5) (табл. 5) по сравнению с таковым для желатина из свиной кожи [14]. При этом АК-состав полученных желатинов сильно отличался (в разные стороны) от такового для желатинов из шкуры уток (DSG) (табл. 5) по большинству АК: Ala, Arg, Asn + Asp, Gly, Gln + Glu, His, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr и Val [14].

Важно, что желатины из лап кур (DFG) после экстракции 1.5%-ным раствором уксусной кислоты по АК-составу сильно отличались как в положительную сторону по Gly (+56.0), Ala (+21.8), Leu (+19.7), Met (+1.8), так и в отрицательную сторону по Gln + Glu (–70.2), Ser (–60.3), Phe (–50.5), Lys (–39.8), Pro (–31.3), Asn + Asp (–29.3), Ile (–14.4), Val (–4.25) и практически не отличались по Arg, Cys, His, Thr, Tyr и Trp (табл. 5) по сравнению с таковым для желатина из свиной кожи [14]. При этом АК-состав полученных желатинов слабо отличался от такового для желатинов из шкуры кур (DSG) (табл. 5).

Как следует из табл. 5, 6 и соответствующих работ, общее содержание аминокислот в желатинах из кожи птиц близко к таковому из кожи свиней (т.к. разница в 3.7% не является статистически значимой).

Если взять общее содержание аминокислот (HyPro и Pro) в желатинах из кожи КРС и свиней как референтное значение, то в желатинах из

Таблица 5. Содержание аминокислот в желатинах из кожи и лапок уток, кур и индеек в сравнении с таковым из шкуры свиней [14]

№	АК	Содержание аминокислот, %					
		DSG	CSG	MDTRG	DFG	CFG	PSG
1	Ala	9.84	10.08	12.99	8.12	10.11	8.30
2	Arg	7.87	5.57	5.74	5.67	–	8.50
3	Asp	4.81	2.11	5.82	2.72	4.24	6.00
4	Cys	0.02	0.16	–	–	–	0.20
5	Gly	26.04	33.70	35.14	29.81	31.51	20.20
6	Glu	10.63	5.84	8.66	5.53	3.13	10.50
7	His	0.97	0.30	0.58	0.70	–	0.80
8	Ile	1.10	1.15	2.35	1.14	–	1.30
9	Leu	2.70	2.63	1.36	2.50	3.47	2.90
10	Lys	2.88	4.66	2.99	1.75	2.41	4.00
11	Met	1.34	0.07	0.89	1.47	1.12	1.10
12	Phe	2.19	1.77	1.65	1.84	3.16	2.10
13	Pro	8.84	13.42	13.87	10.68	17.60	13.40
14	Ser	2.50	2.20	2.57	3.75	1.43	3.60
15	Thr	2.94	1.01	2.10	2.37	–	1.90
16	Trp	–	0.04	–	–	1.23	–
17	Tyr	0.72	1.22	0.43	0.46	0.96	0.80
18	Val	1.85	1.94	2.24	2.00	1.38	2.40
19	HyPro	12.78	12.13	–	10.70	9.24	10.80
20	HyLys	–	–	–	–	2.25	1.20

Примечание: HyLys – гидроксизин; HyPro – гидроксипролин. Прочерк – не определялось количественно. DSG – желатины из кожи уток, CSG – желатины из кожи цыплят, MDTRG – желатины из кожи индейки, DFG – желатины из лап уток, CFG – желатины из лап кур, PSG – желатины кожи свиней.

Таблица 6. Содержание аминокислот в желатинах из кожи КРС (BSG) и пекинских уток (DFG) при различных обработках [62]

№	АК	Содержание аминокислот, ед./1000			
		BSG	Ac-DFG	Al-DFG	En-DFG
1	Ala	81.22	81.28	78.98	84.18
2	Arg	51.90	56.73	59.64	63.22
3	Asp	32.20	32.20	30.00	30.79
4	Cys	4.70	–	–	–
5	Gly	365.00	298.11	251.27	279.16
6	Glu	54.14	55.37	59.49	60.77
7	His	–	7.08	25.91	11.99
8	Ile	10.10	11.41	12.84	12.35
9	Leu	18.90	25.10	29.19	29.15
10	Lys	48.80	17.58	18.16	20.74
11	Met	2.20	14.79	10.73	11.06
12	Phe	16.02	18.41	20.22	20.56
13	Pro	101.12	106.83	101.56	100.13
14	Ser	29.40	37.57	37.72	37.95
15	Thr	8.20	23.72	23.59	26.04
16	Tyr	10.60	4.65	5.14	5.65
17	Val	20.07	20.28	20.46	21.59
18	HyPro	102.32	107.08	105.04	98.89

Примечание: прочерк – не определялось количественно. HyPro – гидроксипролин, Ac-DFG – при кислой обработке сырой массы DFG, Al-DFG – при щелочной обработке сырой массы DFG, En-DFG – при ферментативной обработке сырой массы DFG.

кожи кур это содержание значительно выше (на 18–20%). Как известно, высокий уровень общего содержания HyPro и Pro в желатинах улучшает характеристики геля, в том числе свойства пищевых продуктов на его основе. Таким образом, желатины из кожи кур могут служить альтернативой желатинам из других источников.

Abedinia et al. [62] исследовали влияние различных видов обработки и экстракции на процент выхода и состав, физико-химические и реологические свойства желатинов из утиных лапок (DFG). Желатины экстрагировали из цельных лап пекинской утки со средним выходом 4.09, 3.65 и 5.75% при кислой (Ac-DFG), щелочной (Al-DFG) и ферментативной (En-DFG) предварительной обработке сырой массы [62]. При этом содержание белков было на уровне 81.38, 79.41, 82.55 и 87.38% по основному составу желатинов (Ac-DFG, Al-DFG, En-DFG и бычьего соответственно) [62]. Аминокислотный анализ показал, что Gly, безусловно, преобладает во всех образцах, особенно в бычьем желатине. Далее следуют HyPro , Pro , Ala , прежде всего для образцов Ac-DFG, а затем и других образцов Al-DFG и En-DFG. Более высокая термостабильность связана именно с высоким содержанием Pro и HyPro (в Ac-DFG и Al-DFG) по сравнению с таковым в BG и En-DFG [62]. Методом ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием показано, что пики желатинов расположены преимущественно в области амидной полосы (амиды I, II и III) [62]. Реологический анализ показал, что максимальный модуль упругости (9972.25 Па) и модуль потерь (4956.28 Па) [62] были значительно выше у желатина Ac-DFG, чем у других желатинов. Таким образом, именно желатин из утиных лапок (типа Ac-DFG) наиболее перспективен как альтернатива желатинам млекопитающих в пищевой и фармацевтической промышленности.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основными коммерческими источниками желатинов выступают органы и ткани КРС и свиней, хотя в последнее время начинают применять желатины из птиц, рыб и даже насекомых. Во многих пищевых продуктах желатин используется в качестве источника текстуры и связующего агента, стабилизатора и наполнителя. Показано оптимальное содержание аминокислот и их соотношений в желатинах из кожи КРС и свиней для их дальнейшего использования. Конечно, данные по содержанию АК в желатинах из кожи свиней и КРС, полученные в различных технологических условиях, могут существенно отличаться, однако в целом эти отличия носят не критический ха-

рактер. Именно поэтому в промышленности желатины иногда получают из смеси отходов животноводства. Недавно в России была предложена композиция белковых ингредиентов из гидролизатов кожи свиньи и КРС с добавками высушенной плазмы крови, которая имела более “ценный” АК-состав, чем в традиционных желатинах, что позволило авторам сделать предположение о повышенной биологической и пищевой ценности разработанного продукта [61]. Кроме того, ряд авторов обнаружил улучшение отдельных показателей и биологических свойств желатинов из смеси отходов животноводства при образовании некоторых специфических пептидов.

Таким образом, в настоящее время активно разрабатываются новые композиции на основе известных желатинов с оптимальным АК-составом, способствующим улучшению питательных и функциональных свойств продуктов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность к.х.н. И.С. Зайцеву за помощь в технической подготовке текста.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследования по подразделам “Аминокислотный состав желатинов из кожи и костей крупного рогатого скота” и “Аминокислотный состав желатинов из субпродуктов и отходов промышленного птицеводства” выполнены при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках выполнения государственного задания 124020200032-4 на 2024 г. (регистрационный номер ЕГИСУ темы НИР FGGN-2024-0016).

Исследования по разделу “Введение” и подразделу “Аминокислотный состав желатинов свиней” выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-16-00032-П).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных автором данной работы с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Овчинников Ю.А. // Биоорганическая химия / Ред. Овчинников Ю.А. Москва: Просвещение, 1987. С. 27–91.
2. Kaur J., Rangra N.K., Chawla P.A. // Sep. Sci. Plus. 2023. V. 6. P. e2300040. <https://doi.org/10.1002/sscp.202300040>

3. Нестеров С.В., Ягужинский Л.С., Подопригора Г.И., Нарциссов Я.Р. // Биохимия. 2020. Т. 85. С. 459–475.
<https://doi.org/10.31857/S0320972520040016>
4. Tsetlin V.I. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2023. V. 49. P. 224–228.
<https://doi.org/10.31857/S0132342323030235>
5. Hou Y., Yin Y., Wu G. // Exp. Biol. Med. 2015. V. 240. P. 997–1007.
<https://doi.org/10.1177/1535370215587913>
6. Zaitsev S.Yu., Kolesnik N.S., Bogolyubova N.V. // Molecules. 2022. V. 27. P. 2278.
<https://doi.org/10.3390/molecules27072278>
7. Zaitsev S.Yu., Belous A.A., Voronina O.A., Savina A.A., Rykov R.A., Bogolyubova N.V. // Animals. 2021. V. 11. P. 2400.
<https://doi.org/10.3390/ani11082400>
8. Karim A.A., Bhat R. // Trends Food Sci. Technol. 2008. V. 19. P. 644–656.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.08.001>
9. Alipal J., Pu'ad N.M., Lee T.C., Nayan N.H.M., Sahari N., Basri H., Idris M.I., Abdullah H.Z. // Materials Today: Proceedings. 2021. V. 42. P. 240–250.
<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.922>
10. Global Food Gelatin Market Industry. Growth, Share, Size, Forecast. 2019–2027.
<https://www.inkwoodresearch.com/reports/global-food-gelatinmarket/#report-summary> (accessed February 27, 2024).
11. Liu D., Nikoo M., Boran G., Zhou P., Regenstein J.M. // Ann. Rev. Food Sci. Technol. 2015. V. 6. P. 527–557.
<https://doi.org/10.1146/annurev-food-031414-111800>
12. Зайцев С.Ю. // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2023. № 6. С. 119–129.
<https://doi.org/10.36871/vet.zoo.bio.202306015>
13. Bello A.B., Kim D., Kim D., Park H., Lee S.-H. // Tissue Eng. Part B Rev. 2020. V. 26. P. 164–180.
<https://doi.org/10.1089/ten.teb.2019.0256>
14. Abedinia A., Nafchi A.M., Sharifi M., Ghalambor P., Oladzadabbasabadi N., Ariffin F., Huda N. // Trends Food Sci. Technol. 2020. V. 104. P. 14–26.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.08.001>
15. Rather J.A., Akhter N., Ashraf Q.S., Mir S.A., Makroo H.A., Majid D., Barba F.J., Khaneghah A.M., Dar B.N. // Food Packaging and Shelf Life. 2022. V. 34. P. 100945.
<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100945>
16. Saito M., Takenouchi Y., Kunisaki N., Kimura S. // Eur. J. Biochem. 2001. V. 268. P. 2817–2827.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02160.x>
17. Liu Z.Y., Oliveira A.C.M., Su Y.C. // J. Agric. Food Chem. 2010. V. 58. P. 1270–1274.
<https://doi.org/10.1021/jf9032415>
18. Bae I., Osatomi K., Yoshida A., Osako K., Yamaguchi A., Hara K. // Food Chem. 2008. V. 108. P. 49–54.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.039>
19. Зайцев С.Ю., Боголюбова Н.В., Молянова Г.В. // Биохимический анализ крови ряда пород свиней и их гибридов / Ред. Зайцев С.Ю. Москва: Сельскохозяйственные технологи, 2022. С. 162–256.
20. Джафаров А.Ф. // Производство желатина. Агропромиздат: Москва, 1990. 287 с.
21. Mariod A.A., Adam H.F. // Acta Sci. Pol. Technol. Aliment. 2013. V. 12. P. 135–147.
22. Gimenez B., Turnay J., Lizarbe M.A., Montero P., Gómez-Guillén M.C. // J. Food Hydrocoll. 2005. V. 19. P. 941–950.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.09.011>
23. Jusila J. // J. Forensic Sci. Int. 2004. V. 141. P. 91–98.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2003.11.036>
24. Nishimoto M., Sakamoto R., Mizuta S., Yoshinaka R. // J. Food Chem. 2005. V. 90. P. 151–156.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.034>
25. Johnston-Banks F.A. // Gelatine. In: Food Gels / Ed. Harris P. Elsevier Applied Food Science Series. Dordrecht: Springer, 1990. P. 233–289.
https://doi.org/10.1007/978-94-009-0755-3_7
26. Mariod A.A., Bushra M., Abdel-Wahab S.I., Ain N.M. // Int. J. Trop. Insect. 2011. V. 31. P. 145–153.
<https://doi.org/10.1017/S1742758411000282>
27. Mariod A.A., Abdel-Wahab S.I., Ibrahim M.Y., Mohan S., Abd Elgadir M., Ain N.M. // J. Food Sci. Eng. 2011. V. 1. P. 45–55.
28. Cole C.G.B. // In: Encyclopedia of Food Science and Technology. 2000. V. 4. P. 1183–1188.
29. Cole C.G.B., McGill A.E.G. // Int. J. Food Sci. Technol. 1988. V. 23. P. 525–529.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb00610.x>
30. Sims J.T., Bailey A.J. // J. Chromat. 1992. V. 582. P. 49–55.
[https://doi.org/10.1016/0378-4347\(92\)80301-6](https://doi.org/10.1016/0378-4347(92)80301-6)
31. Zhou P., Mulvaney S.J., Regenstein J.M. // J. Food Sci. 2006. V. 71. P. C313–C332.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00151.x>
32. Zhou P., Regenstein J.M. // J. Food Sci. 2005. V. 70. P. 392–396.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb11435.x>
33. Acevedoa C.A., Díaz-Calderón P., Lópezcand D., Enrione J. // CyTA—Journal of Food. 2015. V. 13. P. 227–234.
<https://doi.org/10.1080/19476337.2014.944570>
34. Karim A.A., Bhat R. // Food Hydrocoll. 2009. V. 23. P. 563–576.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.002>
35. Simon A., Grohens Y., Vandanjon L., Bourseau P., Balnois E., Levesque G. // Macromol. Symp. 2003. V. 203. P. 331–338.
<https://doi.org/10.1002/masy.200351337>
36. Morimura S., Nagata H., Uemura Y., Fahmi A., Shigematsu T., Kida K. // J. Proc. Biochem. 2002. V. 37. P. 1403–1412.
[https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00024-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00024-9)

37. Paul C., Leser S., Oesser S. // *Nutrients*. 2019. V. 11. P. 1079.
<https://doi.org/10.3390/nu11051079>
38. Ross-Murphy S.B. // *Imaging Sci. J.* 1997. V. 45. P. 205–209.
<https://doi.org/10.1080/13682199.1997.11736407>
39. Jamilah B., Harvinder K.G. // *Food Chem.* 2002. V. 77. P. 81–84.
[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00328-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00328-4)
40. Зайцев С.Ю. // Вест. Моск. ун-та. Сер. 2: Химия. 2023. Т. 64. С. 490–499.
<https://doi.org/10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-5-490-499>
41. Gómez-Guillén M.C., Montero P. // *J. Food Sci.* 2001. V. 66. P. 213–216.
42. Gómez-Guillén M.C., Ihl M., Bifani V., Silva A., Montero P. // *Food Hydrocoll.* 2007. V. 21. P. 1133–1143.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.08.006>
43. Gómez-Guillén M.C., Turnay J., Fernandez-Diaz M.D., Ulmo N., Lizarbe M.A., Montero P. // *J. Food Hydrocoll.* 2002. V. 16. P. 25–34.
[https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00035-2](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00035-2)
44. Nurilmala M., Suryamarevita H., Hizbullah H.H., Jacob A.M., Ochiai Y. // *Saudi J. Biol. Sci.* 2022. V. 29. P. 1100–1110.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.09.056>
45. Gomez-Estaca J., Lopez de Lacey A., Gomez-Guillen M.C., Lopez-Caballero M.E., Montero P. // *J. Aquatic Food Product Technol.* 2009. V. 18. P. 46–52.
<https://doi.org/10.1080/10498850802581252>
46. Eastoe J.E. // *Biochem. J.* 1955. V. 61. P. 589–600.
<https://doi.org/10.1042/bj0610589>
47. Ahmad T., Ismail A., Ahmad S.A., Abdul Khalil K., Awad E.A., Akhtar M.T., Sazili A.Q. // *Polymers (Basel)*. 2021. V. 13. P. 1554.
<https://doi.org/10.3390/polym13101554>
48. Ahmad A., Ismail A., Ahmad S.A., Khalil K.A., Kee L.T., Awad E.A., Sazili A.Q. // *J. Food Sci. Technol.* 2020. V. 57. P. 3772–3781.
<https://doi.org/10.1007/s13197-020-04409-2>
49. Ahmad T., Ismail A., Ahmad S.A., Khalil K.A., Kee L.T., Awad E.A., Sazili A.Q., Ahmad A. // *Int. J. Food Prop.* 2019. V. 22. P. 138–153.
<https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1576731>
50. He L., Gao Y., Wang X., Han L., Yu Q., Shi H., Song R. // *Ultrasonics Sonochemistry*. 2021. V. 78. P. 105738.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105738>
51. Zou Y., Wang W., Li Q., Chen Y., Zheng D., Zou Y., Zhang M., Zhao T., Mao G., Feng W., Wu X., Yang L. // *Process. Biochem.* 2016. V. 51. P. 431–443.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.12.011>
52. Rajapakse N., Mendis E., Jung W.K., Je J.Y., Kim S.K. // *Food Res. Int.* 2005. V. 38. P. 175–182.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.10.002>
53. Mulyani S., Setyabudi F.M.S., Pranoto Y., Santoso U. // *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 2017. V. 37. P. 708–715.
<https://doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.5.708>
54. Aykan-Dinçer E., Koç A., Erbas M. // *Poult. Sci.* 2017. V. 96. P. 4124–4131.
<https://doi.org/10.3382/ps/pex237>
55. Al-Hassan A.A. // *Food Hydrocoll.* 2020. V. 101. P. 105457.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105457>
56. Cao S., Wang Y., Xing L., Zhang W., Zhou G. // *Food and Bioproducts Processing*. 2020. V. 121. P. 213–223.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.03.001>
57. Hafidz R.M.R.N., Yaakob C.M., Amin I., Noorfaizan A. // *Int. Food Res. J.* 2011. V. 18. P. 787–791.
58. Norizah M.S., Badii F., Howell N.K. // *Food Hydrocolloids*. 2013. V. 30. P. 143–151.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.009>
59. Eastoe J.E., Leach A.A. // *Chemical Constitution of Gelatin*. In: *The Science and Technology of Gelatin* // Eds. Ward A.G., Courts A. London: Academic Press, 1977. P. 73–107.
60. Chen L., Ma L., Zhou M., Liu Y., Zhang Y. // *Food Hydrocoll.* 2014. V. 36. P. 316–322.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.012>
61. Kremenevskaya M.I., Dobryagin R.V., Bogomolov V.V., Snarkiy S.I. // *Theory and Practice of Meat Processing*. 2019. V. 4. P. 20–26.
<https://doi.org/10.21323/2414-438X-2019-4-2-20-26>
62. Abedinia A., Ariffin F., Huda N., Nafchi A.M. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2017. V. 98. P. 586–594.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.139>

Features of the Amino Acid Composition of Gelatins from Organs and Tissues of a Number of Farm Animals

S. Yu. Zaitsev*, #

Phone: 7 (4967) 651-363, +7 (499) 237-42-81; e-mail: s.y.zaitsev@mail.ru

* Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst,
Dubrovitsy 60, Podolsk, 142132 Russia

Gelatins are formed during technological stages of processing animal connective tissue proteins (primarily – collagens) and, from a biochemical point of view, are represented as various polypeptide products. In most cases, gelatins as commercial products are 52.5% made from the skin and bones of cattle; 46.0% – from pig skin and only 1.5% – using other animals. At the beginning of the 21st century, the bulk of gelatins produced are used in food products, about a third in the medical sector, and only about 6% in technical or other industrial applications. Currently, trends towards a healthy lifestyle have intensified, which, along with the religious and cultural traditions of many countries, encourages scientists to look for sources of gelatins that are not related to mammals, but are close to them in physicochemical and functional characteristics. Therefore, recently there has been a tendency that the gigantic volume of production of gelatins from mammals (cattle and pigs) is beginning to decline, although not significantly so far, compared with the relative increase in the production of gelatins from by-products and waste from industrial poultry farming. Moreover, over the past decades, global poultry meat production has increased by more than a third. The optimal content of amino acids (AA) and their ratios in gelatins from cattle and pig skin for their further use is shown. Of course, the AA content in gelatins from pig and cattle skin obtained under different technological conditions may differ significantly. However, in general, these differences are not critical and therefore, sometimes gelatins are obtained from a mixture of animal waste. Recently, in Russia, a composition of protein ingredients from hydrolysates of pig and cattle skin with the addition of dried blood plasma was proposed, which had a significantly better AA composition than in traditional gelatins, which allowed the authors to assume increased biological and nutritional value of the developed product. In addition, a number of authors have discovered an improvement in a number of indicators and biological properties of gelatins from a mixture of animal waste with the formation of a number of specific peptides. Thus, new compositions based on known gelatins with an optimal AA composition are currently being actively developed, leading to improved nutritional and functional properties. The fundamental and applied significance of this review lies in a detailed description of the main studies on the amino acid composition of gelatins and identifying their relationship with the key biochemical and technological indicators of gelatin-based materials.

Keywords: amino acid composition, proteins, gelatins and collagens, animal biochemistry



УДК 616-076.4:616-097

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ФЛУОРЕСЦЕНТНО-КОНСТРАСТИРУЮЩЕГО ИММУНООКРАШИВАНИЯ ДЛЯ 3D-ВИЗУАЛИЗАЦИИ АСТРОЦИТАРНОЙ УЛЬТРАМОРФОЛОГИИ

© 2024 г. К. Е. Мочалов*, О. И. Сутягина*, **, А. В. Алтунина*, ***, Д. О. Соловьева*,
А. Е. Ефимов****, В. А. Жучков*, С. П. Чумаков*, В. А. Олейников*, ***, #

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

** Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 26

*** ФГ АОУ ВО “Московский физико-технический институт (национальный исследовательский
университет)”,

Россия, 141701 Долгопрудный, Институтский пер., 9

**** ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных
органов имени академика В.И. Шумакова” Минздрава России,

Россия, 123182 Москва, ул. Щукинская, 1

***** Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ (Московский инженерно-физический
институт),

Россия, 115409 Москва, Каширское шоссе, 31

Поступила в редакцию 27.10.2023 г.

После доработки 12.11.2023 г.

Принята к публикации 13.11.2023 г.

Изменение астроцитарной ультраморфологии может лежать в основе развития нейродегенеративных процессов на их ранних стадиях. Однако механизмы ее изменения до настоящего времени изучены мало, поскольку размеры периферических астроцитарных отростков, формирующих основу астроцитарного синаптического покрытия, лежат за пределами разрешающей способности большинства методов оптической микроскопии (ОМ). В свою очередь, недостатком перспективных для таких исследований методов электронной (ЭМ) и сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ) является отсутствие возможности определения целевого участка исследования за счет одновременного использования флуоресцентной микроскопии иммуноокрашенных клеток и возможности полноценного 3D-анализа образцов. В данной работе рассмотрена концепция решения вышеуказанной проблемы за счет применения инструментального подхода, объединяющего в рамках единого аппаратного комплекса методы СЗМ и ОМ совместно с ультрамикротомией в качестве метода восстановления 3D-структуры образца. Для реализации предлагаемой комбинированной методики (оптико-зондовой нанотомографии) в данной статье представлена разработка первой стадии создания специализированных флуоресцентно-контрастирующих меток на основе конъюгатов флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов и однодоменных антител. Такой тип метки обеспечит как иммуноокрашивание “зоны интереса” для восстановления 3D астроцитарной ультраморфологии, так и контрастирование астроцитов методом СЗМ.

Ключевые слова: астроцитарная ультраморфология, нейродегенеративные процессы, сканирующая зондовая микроскопия, оптическая микроспектроскопия, однодоменные антитела (наноантитела), флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы, оптико-зондовая нанотомография

DOI: 10.31857/S0132342324050027, **EDN:** LSDJAJ

Сокращения: ОМ – оптическая микроскопия; ЭМ – электронная микроскопия; СЗМ – сканирующая зондовая микроскопия; ОЗНТ – оптико-зондовая нанотомография; SVR – отношение площади поверхности к объему (surface-to-volume ratio); УМТ – ультрамикротомия; НТ – наноантитела; НК – нанокристаллы.

Автор для связи: (тел.: +7 (910) 409-84-55; эл. почта: voleinik@mail.ru).

ВВЕДЕНИЕ

Приоритетное направление современной нейробиологии – изучение клеточных механизмов нейродегенеративных процессов и, в частности, поиск способов выявления и предотвращения нейродегенерации на ранних стадиях развития заболеваний. При этом считается, что важную роль в нейродегенеративных процессах играет глия [1, 2], и развитие патологий мозга при старении и нейродегенеративных заболеваниях (эпилепсии, болезни Альцгеймера) начинается с изменений в астроцитах [3–5]. Известно, что астронейрональные взаимодействия лежат в основе работы головного мозга [1, 6, 7], и в норме астроциты обеспечивают нейтропротекцию и метаболическую поддержку нейронов, регулируют активность нейронов и локальный кровоток [8], участвуют в регуляции синаптической передачи [1, 7, 9] и механизмах синаптической пластичности. Нарушение астронейрональных взаимодействий сопровождается снижением когнитивных функций, потерей памяти, психическими расстройствами [1]. В свою очередь, астроциты потенциально могут быть использованы в качестве мишеней для терапии, предотвращающей негативные изменения до начала развития необратимых нейродегенеративных процессов.

В соответствии с моделью трехчастного синапса в организацию синаптических связей между нейронами вовлекаются отростки астроцитарных клеток [6, 10]. Терминальные отростки астроцитов преимущественно располагаются в непосредственной близости от постсинаптического отдела, охватывая по периметру синаптическую щель [11]. Астроциты эффективно модулируют синаптическую передачу, контролируя ионный гомеостаз. В частности, тонкие астроцитарные отростки несут на мембране многочисленные транспортеры глутамата (GLT-1 и GLAST/GLT-1) [12], осуществляя удаление из синаптической щели глутамата и снабжение нейрональных терминалей глутамином [2, 9, 13–15]. Участие астроцитов в регуляторных процессах включает изменение их ультраморфологии. Астроцитарные отростки динамически реагируют на изменения в окружающей среде и за счет актинового цитоскелета способны к быстрой пространственной реорганизации [16], в частности терминальные отростки могут вытягиваться при высокой синаптической активности, обуславливая

повышение эффективности захвата глутамата. Возможны и еще более тонкие ультраструктурные изменения – перемещение транспортеров GLT-1 по мембране отростка в сторону большей концентрации глутамата [17, 18].

Изменение астроцитарной ультраморфологии может лежать в основе развития нейродегенеративных процессов на их ранних стадиях. Так, на примере гиппокампа продемонстрирована связь снижения синаптической пластичности при старении с дистрофией астроцитов, в том числе с истощением фракции мелких астроцитарных отростков. Продemonстрированное ранее снижение эффективности захвата глутамата астроцитами при болезни Альцгеймера [4, 5] также с большой долей вероятности может быть обусловлено тонкими изменениями в компартменте терминальных астроцитарных отростков, в частности ингибированием экспрессии GLT-1 вблизи депозитов β -амилоида.

Таким образом, для понимания регуляторных и дисфункциональных астронейрональных процессов огромное значение имеет изучение клеточных и молекулярных механизмов изменений в терминальных отростках астроцитов на ультраструктурном уровне на ранних стадиях развития нейродегенеративных заболеваний. Однако эти механизмы до настоящего времени недостаточно хорошо изучены, что во многом связано с тем, что размеры периферических астроцитарных отростков, формирующих основу астроцитарного синаптического покрытия (стандартная толщина ~100 нм) [16, 19], лежат за пределами разрешающей способности большинства методов оптической микроскопии. В частности, они не могут быть визуализированы с помощью широко распространенной конфокальной или двухфотонной микроскопии. Ультраструктура клеточных компонентов с разрешением от десятков до единиц нанометров может быть исследована методами микроскопии высокого разрешения (электронная (ЭМ) и сканирующая зондовая (СЗМ) микроскопия), однако у этих методик есть существенный недостаток – отсутствие возможности определения целевого участка исследования за счет одномоментного использования флуоресцентной микроскопии иммуноокрашенных клеток и возможности полноценного 3D-анализа образцов. Необходимость точного выбора участка

“зоны интереса” с использованием иммунного окрашивания очевидна, поскольку это в значительной степени оптимизирует экспериментальную процедуру как с точки зрения значительного сокращения времени измерений, так и существенного повышения их информативности. При этом информация о 3D-структуре периферических астроцитарных отростков не менее важна. Так, одним из ключевых параметров, определяющих физиологические свойства астроцитарных отростков (например, интенсивность обменных процессов и характер ионной динамики), является показатель отношения площади поверхности структуры к ее объему (surface-to-volume ratio, SVR) [19], который невозможно определить без 3D ультраструктурной реконструкции. Для решения указанной проблемы с успехом могут быть использованы современные методы корреляционной микроскопии [20–22], объединяющие в рамках единого аппаратного комплекса методы микроскопии высокого разрешения (ЭМ и СЗМ), оптическую микроскопию (ОМ) и методики восстановления 3D-структуры, такие как, например, ультрамикротомия (УМТ).

Однако использование данных методик для исследования астроцитарной ультраморфологии требует соответствующей адаптации методик иммунофлуоресцентного мечения астроцитов с целью как минимизации общего размера меток, так и их комбинированного использования для флуоресцентного окрашивания в режимах ОМ и контрастирования в режимах ЭМ и СЗМ. В данной работе мы предлагаем методику иммунофлуоресцентного мечения астроцитов с использованием однодоменных антител (наноантител), конъюгированных со стандартным флуоресцентным красителем, с целью использования для комбинированного исследования ультраморфологии методами элек-

тронной, оптической, сканирующей зондовой микроскопии и оптико-зондовой нанотомографии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Концепция использования конъюгатов наноантител и флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов для визуализации астроцитарных структур методом оптико-зондовой нанотомографии (ОЗНТ). ОЗНТ предлагается в качестве коррелятивной методики, позволяющей в ходе одной экспериментальной процедуры получать данные о расположении “зоны интереса” методом широкопольной флуоресцентной ОМ и объемную ультраструктуру астроцитов методом СЗМ, комбинированным с УМТ. Данная методика основана на проведении последовательных УМТ-срезов заключенного в эпоксидные смолы образца и одновременном получении совмещенных данных ОМ/СЗМ от каждого среза. Далее последовательность данных 2D-ОМ/СЗМ соответствующими программными средствами восстанавливается в массив 3D-ОМ/СЗМ. Данный подход обеспечивает полноценное решение ранее указанной задачи восстановления 3D астроцитарной ультраморфологии в иммуноокрашенной “зоне интереса”. Важно отметить, что использование в качестве меток флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов дает дополнительную возможность контрастирования астроцитарных сетей на фоне остального объема образца. В действительности особенностью СЗМ является то, что данный метод “видит” все содержимое образца, а не то, что помечено специальными контрастирующими агентами, как это происходит в случае ЭМ. Предлагаемая концепция визуализации объемной ультраструктуры астроцитов отображена на рис. 1 и заключается в следующем:

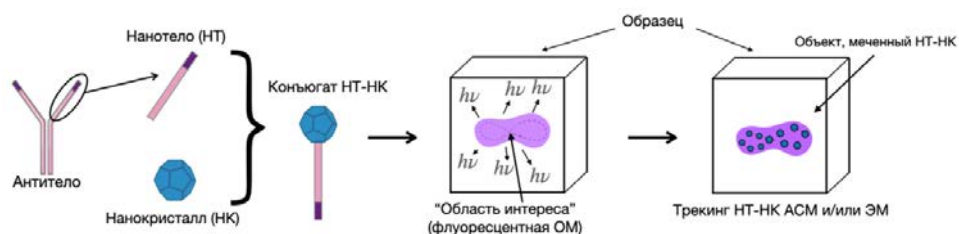


Рис. 1. Концепция использования флуоресцентно-контрастирующих меток на основе конъюгатов наноантител (НТ) и флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов (НК) для визуализации объемной ультраструктуры астроцитов методом ОЗНТ.

- проводится иммуномечение соответствующих участков астроцитарных сетей с использованием конъюгатов антител к определенному белку, содержащемуся в астроцитах, и флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов;
- исследуемые образцы фиксируются и иммобилизуются в эпоксидных смолах;
- в определяемых с помощью флуоресцентной ОМ по излучению нанокристаллов “зонах интереса” проводится восстановление данных 3D-СЗМ;
- с использованием высокого контраста нанокристаллов в режиме СЗМ проводится восстановление непосредственной ультраструктуры астроцитов в “зоне интереса”.

Важно отметить, что использование антител для иммунофлуоресцентного мечения – это общепринятый подход. Однако большинство доступных в настоящее время коммерческих антител, предназначенных для иммуноцитохимического окрашивания, представляют собой крупные молекулы иммуноглобулинов. Кроме того, значительная часть доступных коммерческих антител предназначена для метода непрямого иммуноцитохимического окрашивания, когда с белком интереса связываются первичные антитела, не несущие на себе флуоресцентной метки, после чего с первичными антителами связываются вторичные антитела, несущие флуорофор; на одно первичное антитело прикрепляется, как правило, несколько вторичных. Таким образом очевидно, что в целом размеры таких меток чрезвычайно большие для ультраструктурных исследований, поэтому в данном подходе предпочтительным видится использование так называемых однодоменных антител (наноантител) – антител, представляющих собой мономерный антигенсвязывающий вариабельный домен, например, VHH-E9 верблюжьих антител [23, 24]. За счет своего небольшого размера наноантитела глубже проникают в объемные образцы, чем обычные антитела [24], что должно способствовать более глубокому окрашиванию 400-мкм блока, предназначенного для дальнейшего изготовления срезов вибротома, что дает преимущество при нацеливании на менее доступные эпитопы, а также способствует более мягкому окрашиванию, сохраняющему ультраструктуру [25, 26]. Кроме того, локализация одиночной молекулы с помощью методов ЭМ и СЗМ требует специфической доставки меток в

непосредственной близости от целевого белка. Вследствие большого размера иммуноглобулинов их применение для визуализации может привести к получению ошибочного результата при используемой разрешающей способности, что происходит из-за существенного расстояния между меткой и белком-мишенью. Однако предлагаемые конъюгаты наноантител обеспечат минимальную ошибку благодаря их небольшому размеру [24]. Кроме того, на данный момент в мире существуют наработки, связанные с получением высокоориентированных конъюгатов наноантител с флуоресцентными полупроводниковыми нанокристаллами [27], что дает основания считать дальнейшую разработку указанного выше подхода весьма перспективной. Однако сама по себе методика иммуноокрашивания наноантителами астроцитов до настоящего времени не разработана. На решение этой задачи и была направлена данная работа.

Разработка методики иммуноокрашивания астроцитов конъюгатами наноантител и флуоресцентных красителей. Как было показано выше, астроцитарная морфология на ультраструктурном уровне может быстро изменяться при перемене условий [16], таким образом, для получения объективной ультраморфологической картины в течение всей пробоподготовки вплоть до момента фиксации необходимо поддерживать состояние среды, максимально приближенное к нативному. Это требование и было положено в основу модификации протокола иммуноокрашивания астроцитов конъюгатами наноантител и флуоресцентных красителей.

На первом этапе при подготовке срезов гиппокампа материал в течение всего процесса резки находился в растворе, соответствующем по составу спинномозговой жидкости, а также в течение всего процесса нарезки производили карбогенизацию раствора. Поскольку при нарезке клеточные структуры подвергаются стрессу, перед фиксацией срезы инкубировали в растворе, аналогичном используемому при резке, но характеризующемся повышенным содержанием глюкозы, способствующей восстановлению ткани после стресса.

Для иммуноцитохимического окрашивания в данной работе использовали специфичные к GFAP коммерческие кроличьи поликлональные антитела (ab7260; Abcam, США) и наноантитела

VNH-E9, специфичные к GFAP, конъюгированные с флуорофором малеинид-FAM, специально произведенные на базе ИБХ РАН.

Эффективность иммуноокрашивания астроцитов конъюгатами наноантител и флуоресцентных красителей методом флуоресцентной микроскопии. Флуоресцентные изображения срезов мозговой ткани, окрашенных конъюгатами коммерческих антител и наноантителами, приведены на рис. 2а и 2б соответственно). Оба способа окрашивания продемонстрировали тканевую архитектуру гиппокампа и морфологию астроцитарных клеток, соответствующие нормальным. Анализ полученных изображений с использованием программного обеспечения Fiji (Fiji/ImageJ2 – общедоступное программное обеспечение для обработки и анализа изображений, www.fiji.sc) показал, что плотность выявляемых при иммуноокрашивании астроцитов в зоне *stratum radiatum* составляет 49 ± 4 и 52 ± 3 на $250\,000\text{ мкм}^2$ при использовании коммерческих антител и наноантител соответственно (рис. 2в). Сравнение выявляемой при различных окрашиваниях морфологии астроцитов посредством анализа Шолля (определение числа астроцитарных отростков, детектируемых по мере удаления

от астроцитарной сомы) показало совпадение в пределах статистической ошибки Шолль-профилей, полученных с изображений с разным окрашиванием (рис. 2г). Таким образом, можно сделать вывод о равной на макроуровне эффективности иммуноокрашивания, достигаемого при помощи коммерческих антител-иммуноглобулинов и наноантител.

Полученные результаты демонстрируют эффективность разработанной методики пробоподготовки в целом и иммуноокрашивания с использованием изготовленных наноантител VNH-E9 в частности, что открывает перспективы разработки аналогичной методики, но уже с использованием флуоресцентно-контрастирующих агентов на основе флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов. Нанокристаллы типа “ядро/оболочка” (например, CdSe/ZnS) обладают узким симметричным пиком флуоресценции (в отличие от органических красителей), высокой яркостью флуоресценции и уникально высокой фотостабильностью [28]. Кроме того, их высокая твердость и непрозрачность для электронных пучков делает их крайне привлекательными для использования в качестве контрастирующих агентов для СЗМ и ЭМ.

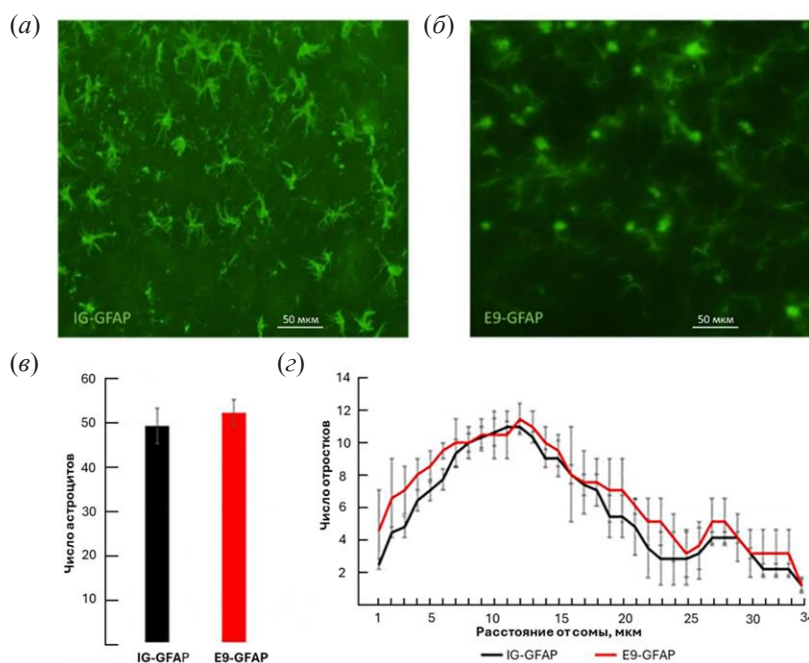


Рис. 2. Визуализация астроцитов гиппокампа мыши C57Bl6 (зона *stratum radiatum*). (а) – Иммуноцитохимическое окрашивание с использованием антител IgG-GFAP; (б) – иммуноцитохимическое окрашивание с использованием наноантител E9-GFAP; (в) – плотность астроцитов в зоне *stratum radiatum* (число астроцитов на $250\,000\text{ мкм}^2$) при окрашивании IgG-GFAP и E9-GFAP; (г) – профиль 2D-анализа Шолля (количество пересечений астроцитарных отростков с концентрическими сферами с центром в середине клеточной сомы) одиночных астроцитов при окрашивании IgG-GFAP и E9-GFAP.

Важно отметить, что создание методики иммуноокрашивания/контрастирования с использованием конъюгатов изготовленных наноантител VHH-E9 и флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов – важная задача работ по внедрению методики ОЗНТ в область исследования 3D астроцитарной ультраморфологии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные. В работе использовали трех самцов мышей линии C57BL/6 в возрасте 6 месяцев весом 29 ± 0.5 г, предоставленных НПП “Питомник лабораторных животных” ФИБХ РАН (Пушино, Россия). Для получения биоматериала мышей умерщвляли путем декапитации, предварительно проводили анестезию изофлураном (1-хлор-2,2,2-трифторэтилдифторметилловый эфир), выполняли декапитацию, извлекали гиппокамп, который впоследствии закрепляли в специальном агаровом блоке для соблюдения необходимой ориентации, позволяющей минимально повредить функциональные связи и максимально сохранить структуру клеток.

Изготовление срезов гиппокампа. После извлечения гиппокампы переносили в раствор, соответствующий по составу спинномозговой жидкости, содержащий (в mM) 92 *N*-метил-D-глюкамина (NMDG), 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 30 NaHCO_3 , 20 NEPES, 25 глюкозы, 2 тиомочевины, 5 Na-аскорбата, 3 Na-пирувата, 0.5 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 10 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Срезы толщиной 350 мкм изготавливали с помощью вибрационного микротомы (Microm HM650 V; Thermo Fisher Scientific, США). Для восстановления ионного равновесия срезы инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в растворе, содержащем (в mM) 127 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 2 MgCl_2 , 1 CaCl_2 , 25 NaHCO_3 и 25 D-глюкозы. Все растворы имели осмолярность 295 ± 5 мОсм, pH 7.4 и были насыщены карбогеном (95% O_2 и 5% CO_2).

Иммуноцитохимическое окрашивание. Общая методика окрашивания при применении коммерческих или наноантител VHH-E9 состоит из следующих этапов. Для проведения иммуноцитохимического окрашивания срезы гиппокампа фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида в течение 60 мин при 37°C, затем дважды промывали фосфатным буферным раствором (PBS, pH 7.4). Фиксированные срезы инкубировали в блок-растворе (PBS с 0.3%

Triton-X100, 0.1% Tween 20 и 5%-ным раствором BSA) при комнатной температуре в течение 90 мин для пермеабиллизации. После пермеабиллизации срезы инкубировали в растворе первичных антител в PBS с 0.01% Tween 20 в течение 60 ч при 25°C, трижды промывали PBS (3 смены по 10 мин) и в случае коммерческих первичных антител инкубировали со вторичными антителами в течение 2 ч при 25°C в темноте.

Для окрашивания использовали наноантитела VHH-E9 (специфичные к глиальному фибриллярному белку GFAP, конъюгированные с флуорофором малеинид-FAM, произведенные на базе ИБХ РАН) или первичные кроличьи моноклональные антитела против глиального фибриллярного кислого белка GFAP (ABIN-3043832) + вторичные антимышиные поликлональные антитела Alexa Fluor® 594 AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (кат. № AB_2338871; Jackson ImmunoResearch, США).

Наноантитела VHH-E9, специфичные к GFAP, конъюгированные с флуорофором малеинид-FAM, произведены на базе ИБХ РАН. Для этого нуклеотидная последовательность, кодирующая наноантитело VHH-E9 к GFAP с добавленной на 3'-конце последовательностью, кодирующей 6 гистидинов и цистеин, была синтезирована (ДНК-синтез, Россия) и клонирована в экспрессионную плазмиду pET22 по сайтам рестрикции XbaI и BamHI. Для получения штамма-продуцента pET22-VHNE9 были трансформированы клетки *Escherichia coli* штамма Rosetta-gami (DE3) (Novagen, США). Нарработку белка проводили при помощи автоиндукции в питательной среде LB без NaCl с добавлением 25 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50 mM KH_2PO_4 , 50 mM Na_2HPO_4 , 1 mM MgSO_4 , 0.5% глицерина, 0.05% глюкозы и 0.2% лактозы. Наноантитела очищали из осветленных клеточных лизатов при помощи металл-хелатной хроматографии на колонках HisTrap FF (Cytiva, США) с последующей гель-фильтрацией на колонке 16/60 HiPrep Sephacryl S200 HR (Cytiva, США). Для флуоресцентного мечения наноантитела использовали малеимид-FAM (Lumiprobe, Россия). К раствору VHH-E9 (1 мг/мл) в PBS добавляли 10 mM раствор флуоресцентной метки в DMSO в 20-кратном молярном избытке и оставляли в атмосфере аргона при 3°C на 18 ч. Для удаления непрореагировавшего красителя образец очищали на колонке PD-10 (Cytiva, США).

Наноантитела VNH-E9 непосредственно конъюгированы с флуорофором, коммерческие антитела ab7260 (Abcam, США) предназначены для непрямого иммуноцитохимического окрашивания, в качестве вторичных антител использовали коммерческие ослиные антикроличьи поликлональные антитела Alexa Fluor® 488 (AB_2313584; Jackson ImmunoResearch, США). Оптимальное разведение наноантител VNH-E9 (1 : 100) было определено на серии образцов посредством титрования, для коммерческих антител использовали разведение, рекомендуемое для иммуноцитохимического исследования в описании продукта.

Для визуализации использовали инвертированный флуоресцентный микроскоп Axiovert 200M (Carl Zeiss Inc., Германия), объективы PlanApo 20× и 40×, цифровую камеру AxioCamHR.

2D-Анализ Шолля. Анализ морфологии астроцитов, визуализированных при различных способах окрашивания, осуществляли посредством теста Шолля с использованием программного обеспечения FiJi (Fiji/ImageJ2, www.fiji.sc) [29–31]. Тест предполагает построение концентрических окружностей с увеличивающимся радиусом (5–50 мкм с шагом 1 мкм) из центра сомы астроцита с регистрацией числа пересечения окружностей каждого радиуса с астроцитарными отростками для каждой клетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие комбинированных методик, объединяющих в себе методы высокоразрешающей микроскопии типа ЭМ и СЗМ, оптической микроспектроскопии и методик восстановления 3D-ультраструктуры образца необходимо для изучения клеточных и молекулярных механизмов изменений в терминальных отростках астроцитов на ультраструктурном уровне на ранних стадиях развития нейродегенеративных заболеваний. Такого рода исследования требуются для понимания регуляторных и дисфункциональных астроцитарных процессов, лежащих в основе развития нейродегенеративных заболеваний.

В качестве перспективной методики такого рода в данной работе предложена концепция применения методики ОЗНТ, позволяющей в ходе одной экспериментальной процедуры получать данные о расположении “зоны интереса” методом широкопольной флуоресцентной ОМ и объемную ультраструктуру астроцитов методом

СЗМ, комбинированным с УМТ. Данная методика основана на проведении последовательных УМТ-срезов заключенного в эпоксидные смолы образца и одновременном получении совмещенных данных ОМ/СЗМ от каждого среза. Далее последовательность данных 2D-ОМ/СЗМ соответствующими программными средствами восстанавливается в массив 3D-ОМ/СЗМ. Данный подход обеспечивает полноценное решение ранее указанной задачи – восстановление 3D астроцитарной ультраморфологии в иммуноокрашенной “зоне интереса”.

Один из необходимых шагов по внедрению методики ОЗНТ в область исследования 3D астроцитарной ультраморфологии – создание специализированных флуоресцентно-контрастирующих меток на основе конъюгатов флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов и однодоменных антител. Главное достоинство таких систем – узкий симметричный пик, высокая яркость и фотостабильность флуоресценции полупроводниковых нанокристаллов, что важно для иммуноокрашивания “зоны интереса”, а также их высокая твердость и непрозрачность для электронных пучков, что делает их крайне привлекательными для использования в качестве контрастирующих агентов как для СЗМ, так и для ЭМ.

Предлагаемая концепция визуализации объемной ультраструктуры астроцитов заключается в следующем:

- проводится иммуномечение соответствующих участков астроцитарных сетей с использованием конъюгатов антител к определенному белку, содержащемуся в астроцитах, и флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов;
- исследуемые образцы фиксируются и иммобилизуются в эпоксидных смолах;
- в определяемых с помощью флуоресцентной ОМ по излучению нанокристаллов “зонах интереса” проводится восстановление данных 3D-СЗМ;
- с использованием высокого контраста нанокристаллов в режиме СЗМ проводится восстановление непосредственной ультраструктуры астроцитов в “зоне интереса”.

Важно отметить, что для создания подобных меток необходимо использование конъюгатов нанокристаллов и наноантител (однодоменных антител), которые за счет своего небольшого

размера значительно глубже проникают в объемные образцы, чем обычные антитела, что должно способствовать более глубокому и мягкому, сохраняющему ультраструктуру, окрашиванию образца.

В рамках данного исследования была разработана предварительная методика иммуноокрашивания астроцитов конъюгатами верблюжьих наноантител VHH-E9, специфичных к глиальному фибриллярному кислому белку GFAP, и красителя малеимид-FAM. Полученные результаты демонстрируют эффективность разработанной методики пробоподготовки в целом и иммуноокрашивания с использованием изготовленных VHH-E9 наноантител в частности, что открывает перспективы разработки аналогичной методики, но уже с использованием флуоресцентно-контрастирующих агентов на основе флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов.

Полученные в работе результаты станут первым шагом в разработке методики адресного мечения астроцитов универсальными флуоресцентно-контрастирующими метками на основе конъюгатов наноантител и флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов для анализа их наноструктуры при помощи коррелятивной технологии оптико-зондовой нанотомографии (ОЗНТ) с использованием уникальной научной установки (<http://ckp-gf.ru/usu/486825/>), объединяющей в себе возможности 3D-СЗМ и ОМ [32–34].

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-00168 (<https://rscf.ru/project/22-14-00168/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры проводили в соответствии с этическими регламентами Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Исследования одобрены институтской комиссией по содержанию и использованию лабораторных животных (протокол № 337/2021).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Verkhatsky A., Rodríguez J.J., Parpura V. // *Cell Tissue Res.* 2014. V. 2. P. 493–503. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1814-z>
2. Verkhatsky A., Zorec R., Rodríguez J.J., Parpura V. // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2016. V. 26. P. 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.09.011>
3. Popov A., Brazhe A., Denisov P., Sutyagina O., Li L., Lazareva N., Verkhatsky A., Semyanov A. // *Aging Cell.* 2021. V. 20. P. e13334. <https://doi.org/10.1111/ace1.13334>
4. Kelly P., Hudry E., Hou S.S., Bacskaï B.J. // *Front. Aging Neurosci.* 2018. V. 10. P. 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.0021>
5. Hefendehl J.K., LeDue J., Ko R.W., Mahler J., Murphy T.H., MacVicar B.A. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 13441. <https://doi.org/10.1038/ncomms13441>
6. Allen N.J., Barres B.A. // *Nature.* 2009. V. 7230. P. 675–677. <https://doi.org/10.1038/457675a>
7. Verkhatsky A., Nedergaard M. // *Physiol. Rev.* 2018. V. 1. P. 239–389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>
8. Takano T., Tian G.-F., Peng W., Lou N., Libionka W., Han X., Nedergaard M. // *Nat. Neurosci.* 2006. V. 9. P. 260–267. <https://doi.org/10.1038/nn1623>
9. Garwood C.J., Ratcliffe L.E., Simpson J.E., Heath P.R., Ince P.G., Wharton S.B. // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2017. V. 4. P. 281–298. <https://doi.org/10.1111/nan.12338>
10. Araque A., Parpura V., Sanzgiri R.P., Haydon P.G. // *Trends. Neurosci.* 1999. V. 5. P. 208–215. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(98\)01349-6](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(98)01349-6)
11. Papouin T., Dunphy J., Tolman M., Foley J.C., Haydon P.G. // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* V. 1715. P. 20160154. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0154>
12. Rimmele T.S., Rosenberg P.A. // *Neurochem. Int.* 2016. V. 98. P. 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.04.010>
13. Verkhatsky A., Zorec R., Rodríguez J.J., Parpura V. // *Opera Med. Physiol.* 2016. V. 1. P. 13–22.
14. Dossi E., Vasile F., Rouach N. // *Brain Res. Bull.* 2018. V. 136. P. 139–156. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.02.001>
15. Heller J.P., Rusakov D.A. // *Glia.* 2015. V. 63. P. 2133–2151. <https://doi.org/10.1002/glia.22821>
16. Hennebelle M., Champeil-Potokar G., Lavialle M., Vancassel S., Denis I. // *Nutr. Rev.* 2014. V. 72. P. 99–112. <https://doi.org/10.1111/nure.12088>

17. *Perez-Alvarez A., Navarrete M., Covelo A., Martin E.D., Araque A.* // J. Neurosci. 2014. V. 34. P. 12738–12744.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2401-14.2014>
18. *Murphy-Royal C., Dupuis J.P., Varela J.A., Panatier A., Pinson B., Baufreton J., Groc L., Oliet S.H.* // Nat. Neurosci. 2015. V. 2. P. 219–226.
<https://doi.org/10.1038/nn.3901>
19. *Patrushev I., Gavrilov N., Turlapov V., Semyanov A.* // Cell Calcium. 2013. V. 54. P. 343–349.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2013.08.003>
20. *Caplan J., Niethammer M., Taylor R.M., Czymmek K.J.* // Curr. Opin. Struct. Biol. 2011. V. 21. P. 686–693.
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2011.06.010>
21. *Spiegelhalter C., Tosch V., Hentsch D., Koch M., Kessler P., Schwab Y., Laporte J.* // PLoS One. 2010. V. 5. P. e9014.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009014>
22. *Miranda A., Gómez-Varela A.I., Stylianou A., Hirvonen L.M., Sánchez H., De Beule P.A.A.* // Nanoscale. 2021. V. 13. P. 2082–2099.
<https://doi.org/10.1039/d0nr07203f>
23. *Rothbauer U., Zolghadr K., Tillib S., Nowak D., Schermelleh L., Gahl A., Backmann N., Conrath K., Muyldermans S., Cardoso M.C., Leonhardt H.* // Nat. Methods. 2006. V. 3. P. 887–889.
<https://doi.org/10.1038/nmeth953>
24. *Perruchini C., Pecorari F., Bourgeois J.P., Duyckaerts C., Rougeon F., Lafaye P.* // Acta Neuropathol. 2009. V. 118. P. 685–695.
<https://doi.org/10.1007/s00401-009-0572-6>
25. *Muyldermans S.* // Annu. Rev. Biochem. 2013. V. 82. P. 775–797.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>
26. *Fang T., Lu X., Berger D., Gmeiner C., Cho J., Schalek R., Ploegh H., Lichtman J.* // Nat. Methods. 2018. V. 15. P. 1029–1032.
<https://doi.org/10.1038/s41592-018-0177-x>
27. *Wu M., Petryayeva E., Medintz I.L., Algar W.R.* // Methods Mol. Biol. 2014. V. 1199. P. 215–239.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1280-3_17
28. *Sukhanova A., Venteo L., Devy J., Artemyev M., Oleinikov V., Pluot M., Nabiev I.* // Lab. Inves. 2002. V. 82. P. 1259–1261.
<https://doi.org/10.1097/01.lab.0000027837.13582.e8>
29. *Milosovic N.T., Ristanovic D.* // J. Theor. Biol. 2007. V. 245. P. 130–140.
30. *Wu C.C., Reilly J.F., Young W.G., Morrison J.H., Bloom F.E.* // Cereb. Cortex. 2004. V. 14. P. 543–554.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhh016>
31. *Ferreira T.A., Blackman A.V., Oyrer J., Jayabal S., Chung A.J., Watt A.J., Sjöström P.J., van Meyel D.J.* // Nat. Methods. 2004. V. 11. P. 982–984.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3125>
32. *Efimov A.E., Agapov I.I., Agapova O.I., Oleinikov V.A., Mezin A.V., Molinari M., Nabiev I., Mochalov K.E.* // Rev. Sci. Instrum. 2017. V. 88. P. 023701.
<https://doi.org/10.1063/1.4975202>
33. *Mochalov K.E., Chistyakov A.A., Solovyeva D.O., Mezin A.V., Oleinikov V.A., Vaskan I.S., Molinari M., Agapov I.I., Nabiev I., Efimov F.E.* // Ultramicroscopy. 2017. V. 182. P. 118–123.
<https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2017.06.022>
34. *Efimov A.E., Bobrovsky A.Y., Agapov I.I., Agapova O.I., Oleinikov V.A., Nabiev I.R., Mochalov K.E.* // Tech. Phys. Lett. 2016. V. 42. P. 171–174.
<https://doi.org/10.1134/S1063785016020231>

Development of a Fluorescence Contrasting Immunostaining Technique for Visualizing 3D Astrocytic Ultramorphology

K. E. Mochalov*, O. I. Sutyagina*, **, A. V. Altunina*, ***, D. O. Solovieva*,
A. E. Efimov****, V. A. Zhuchkov*, S. P. Chumakov*, and V. A. Oleinikov*, ***, **, #

Phone: +7 (910) 409-84-55; e-mail: voleinik@mail.ru

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

** Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

*** Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University),
Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, 141701 Russia

**** Laboratory of Bionanotechnology, V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs
ul. Shchukinskaya 1, Moscow, 123182 Russia

***** National Research Nuclear University “MEPhI” (Moscow Engineering Physics Institute)
Kashirskoe shosse 31, Moscow, 115409 Russia

Changes in astrocytic ultramorphology may underlie the development of neurodegenerative processes in their early stages. However, the mechanisms of its change are still poorly understood, since the size of the peripheral astrocytic processes forming the basis of the astrocytic synaptic coating are beyond the resolution of most optical microscopy (OM) methods. In turn, the disadvantage of promising methods of electron and scanning probe microscopy (EM and SPM) for such studies is the inability to determine the target area of the study due to the simultaneous use of fluorescence microscopy of immunocolored cells and the possibility of full-fledged 3D analysis of samples. In this paper, we consider the concept of solving the above problem by using an instrumental approach that combines the methods of SPM and OM together with ultramicrotomy as a method of restoring the 3D structure of the sample within a single hardware complex. To implement the proposed combined technique (optical-probe nanotomography, OPNT), the first stage of creating specialized fluorescent-contrasting labels based on conjugates of fluorescent semiconductor nanocrystals and single-domain antibodies has been developed in this work. This type of label will provide both immuno-staining of the “area of interest” for the restoration of 3D astrocytic ultramorphology, and contrast of astrocytes by the SPM method.

Keywords: astrocytic ultramorphology, neurodegenerative processes, scanning probe microscopy, optical microspectroscopy, single-domain antibodies (nanoantibodies), fluorescent semiconductor nanocrystals, optical probe nanotomography



УДК 547.856.1;616-006.66

ПРОИЗВОДНЫЕ 3-ГИДРОКСИХИНАЗОЛИНА, АНАЛОГИ ЭРАСТИНА, ИНДУЦИРУЮТ ФЕРРОПТОЗ В КЛЕТКАХ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

© 2024 г. В. Н. Осипов^{*,#}, А. А. Вартанян^{*}, Д. А. Хоченков^{*}, Д. В. Гусев^{*},
О. В. Фатеенкова^{**}, Д. С. Хачатрян^{***}, Л. М. Борисова^{*}

^{*} ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина” Минздрава России, Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

^{**} ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

^{***} НИЦ “Курчатовский институт”, Россия, 123182 Москва, пл. Академика Курчатова, 1

Поступила в редакцию 23.11.2023 г.

После доработки 28.11.2023 г.

Принята к публикации 29.11.2023 г.

В последние годы достигнут значительный прогресс в лечении больных раком толстой кишки, однако в большинстве случаев лечение сопровождается развитием лекарственной резистентности. Обнаруженная недавно железозависимая гибель клетки, ферроптоз, позволяет надеяться на продление периода ремиссии. В работе изучена возможность индукции ферроптоза в клетках рака толстой кишки новыми производными 3-гидроксихиназолина. Исследования проводили на двух клеточных линиях рака толстой кишки HCT-116 и DLD-1. Гибель опухолевых клеток по типу ферроптоза идентифицировали по уровню перекисного окисления липидов. Уровень перекисного окисления липидов в клетках HCT-116, индуцируемый некоторыми производными 3-гидроксихиназолина, приближался к активности референтного препарата эрастина. Картина существенно менялась при исследовании индукции ферроптоза в клетках DLD-1. Два производных 3-гидроксихиназолина индуцировали уровень перекисного окисления липидов в клетках DLD-1, превышающий этот показатель у эрастина. Полученные предварительные результаты позволяют предположить, что три новые соединения могут рассматриваться в качестве противоопухолевых средств для лечения рака толстой кишки, а также указывают на перспективность дальнейшего поиска индукторов ферроптоза среди производных 3-гидроксихиназолина.

Ключевые слова: синтез производных хиназолина, цитотоксическая активность, индукция ферроптоза, рак толстой кишки

DOI: 10.31857/S0132342324050033, **EDN:** LRZRMВ

ВВЕДЕНИЕ

Колоректальный рак (КРР) – третья по частоте диагностируемая злокачественная опухоль и вторая по смертности от рака [1]. Несмотря на существенное улучшение результатов химиотерапии, пятилетняя выживаемость больных КРР с метастазами составляет 10% [2]. Отсутствие биомаркеров с достаточной чувствительностью и

специфичностью – один из наиболее важных факторов, который увеличивает время между появлением ранних симптомов болезни и верификацией окончательного диагноза, что, несомненно, усложняет схему лечения. Клинические исследования показали, что КРР формируется в результате злокачественной трансформации клеток эпителия кишечника, непосредственно развитию КРР способствуют му-

Сокращения: КРР – колоректальный рак; АФК – активная форма кислорода; GPX4 – глутатионпероксидаза 4; ИГК – иммунная гибель клетки; DAMPs – молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждениями (Damage-associated molecular patterns); HRMS – масс-спектры высокого разрешения; МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (916) 412-61-43; эл. почта: ovn65@yandex.ru).

тации в гене *KRAS* [3]. Эти исследования дали важные подсказки для разработки таргетной терапии КРР. Однако в большинстве случаев лечение КРР сопровождается развитием лекарственной резистентности, что приводит к более агрессивному течению болезни [4, 5]. По всей видимости, нужно искать возможности вовлечения других типов программируемой гибели клеток в лечение КРР. В последние годы все больше сообщений указывает на то, что обнаруженный недавно новый тип регулируемой гибели клетки – ферроптоз [6] – способен вызывать гибель клеток с высокосложным фенотипом. Два независимых наблюдения привели нас к инициации поиска низкомолекулярных активаторов ферроптоза в лечении КРР: высокую чувствительность к ферроптозу проявляли опухолевые клетки с мутациями в генах семейства *RAS* и индукторы ферроптоза вызывали гибель опухолевых клеток, уцелевших после химиотерапии [7, 8]. Об участии железа в прогрессии КРР говорили и недавно опубликованные данные: так, тест на рецептор трансферина, CD71, практически единственного белка, доставляющего железо в клетку, демонстрировал более высокую точность для выявления КРР и предраковых поражений, чем иммунофлюоресцентный анализ скрытой крови [9]. А высокий уровень ферритина в крови (белка, депонирующего железо, не участвующее в метаболизме клетки) указывал на низкую выживаемость больных КРР [10].

Центральный медиатор ферроптоза – перекисное окисление полиненасыщенных липидов мембран, этот процесс протекает при обязательном участии ионов железа. Эта форма гибели клетки связана с генерацией в клетке АФК, которые образуются в результате реакции Фентона:



Масштабному окислению полиненасыщенных липидов мембран противодействует антиоксидантная система защиты. Система антиоксидантной защиты включает глутатионпероксидазу 4 (GPX4), которая восстанавливает потенциально опасные гидроперекиси липидов в нетоксичные спирты (дефицит GPX4 несовместим с жизнью), и глутатион, субстрат GPX4, основной внутриклеточный антиоксидант (см. обзор Xu et al. [11]).

Накопленные за последнюю декаду данные позволяют рассматривать иммуногенную гибель клетки (ИГК) как важнейшую составляющую

эффективности терапии рака [12]. Ферроптоз сочетает в себе способность прямого уничтожения опухолевых клеток с активацией иммунного ответа. Медиаторы ИГК, известные как молекулярные паттерны, связанные с повреждением (DAMPs), выбрасываются в межклеточную среду при повреждении мембраны клетки. DAMPs представляют собой семейство эндогенных молекул: ДНК, АТФ, РНК, белки теплового шока, жирные кислоты, лейкотриены, простагландины. Их высвобождение во внеклеточное пространство, по-видимому, необходимо для оптимального представления антигенов дендритными клетками. Индукция программируемого некроза или некроптоза, иммуногенной гибели клетки, на сегодняшний день активно обсуждается как многообещающая терапия рака, особенно для борьбы с опухолевыми клетками, резистентными к апоптозу [13]. Некротическая морфология типична и для ферроптотических клеток: перекисное окисление липидов мембраны приводит к появлению в плазматической мембране многочисленных пор, содержимое клетки вытекает в межклеточную среду. Таким образом, с одной стороны, индукция ферроптоза в опухолевых клетках напрямую вызывает гибель большинства опухолевых клеток, а с другой стороны, погибающие клетки активируют иммунную систему, формируя специфический иммунный ответ на опухолевые антигены, что должно приводить к уничтожению оставшихся опухолевых клеток и предотвращению раннего рецидива. Таким образом, индукторы ферроптоза будут не только эффективно уничтожать опухолевые клетки, но и привлекать иммунокомпетентные клетки в зону массовой гибели опухолевых клеток, способствовать развитию противоопухолевого иммунного ответа и, тем самым, предотвращать ранний рецидив болезни [14].

Ранее нами было показано, что некоторые производные 3-гидроксикиназолина (замещенные 3-гидрокси-2-(3,5-диметил-1*H*-пиразол-1-ил)-киназолин-4(3*H*)-оны) индуцируют ферроптоз в метастатических клетках меланомы [15] и в экспериментальной модели карциномы молочной железы [16]. В продолжение наших исследований был расширен ряд производных 3-гидроксикиназолина.

Цель данной работы – изучение способности новых производных 3-гидроксикиназолина инду-

цировать ферроптоз в клетках колоректального рака HCT-116 и DLD-1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск низкомолекулярных активаторов ферроптоза был инициирован опубликованными недавно данными о способности активаторов ферроптоза восстанавливать чувствительность метастатических опухолевых клеток к противоопухолевой терапии [17]. Молекула эрастина, исторически первого индуктора ферроптоза, содержит структурный фрагмент хинаязолина, который, возможно, важен для индукции ферроптоза. Эрастин индуцирует ферроптоз, блокируя цистин/глутаматный антипортер (также известный как “system Xc⁻”) – аминокислотный антипортер, который обеспечивает поглощение клетками цистина, прекурсора глутатиона, основного антиоксиданта клетки, в обмен на глутамат. Через этот канал из клетки выводится глутамин и поступает цистин. Предполагалось, что, сохраняя структуру хинаязолина и вводя различные заместители во второе и третье положения хинаязолинового цикла, мы получим более эффективный системный ингибитор Xc-системы.

Новые замещенные 3-гидрокси-2-(3,5-диметил-1*H*-пиразол-1-ил)хинаязолин-4(3*H*)-оны с присоединенными к атому кислорода в 3-м положении различными бензиловыми эфирами уксусной кислоты были синтезированы по схеме 1.

Производные 3-гидрокси-2-меркаптохинаязолин-4(3*H*)-она (**IVa–d**) получали трехстадийным синтезом без выделения промежуточных соединений. На первой стадии действием тиофосгена на соответствующие эфиры антралиновой кислоты (**Ia–d**) получали соединения (**IIa–d**), которые обрабатывали раствором ацетата натрия. Затем производные изотиоцианатов (**IIIa–d**) подвергали взаимодействию с водным раствором гидросиламина и получали целевые соединения (**IVa–d**) в виде выпадающих из реакционной массы белых осадков. Осадки отфильтровывали и высушивали.

Далее нагреванием полученных соединений с избытком гидразингидрата в этаноле получали соединения (**Va–d**), которые конденсировали с ацетилацетоном, получая соединения (**VIa–d**). Целевые соединения (**VIIa–g**) получали алкилированием различными бензиловыми эфирами хлоруксусной кислоты соединений (**VIa–d**).

Полученные соединения (**VIIa–g**) охарактеризованы данными спектров ¹H-, ¹³C-ЯМР и масс-спектрометрии. Чистота всех соединений по результатам ВЭЖХ составила более 95%.

Цитотоксичность соединений (**VIIa–g**) на клетках KPP (HCT-116 и DLD-1) определяли с помощью МТТ-теста. При инкубации клеток с соединениями (**VIIa–g**) в диапазоне концентраций 1–100 мкМ в течение 24 ч наблюдалось ингибирование роста клеток на 30–80% (данные не приведены). В табл. 1 представлен показатель цитотоксической

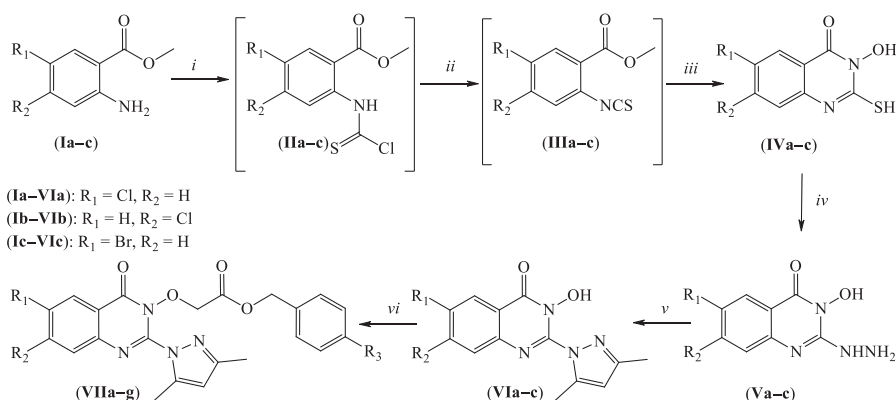


Схема 1. Синтез производных 3-гидроксихинаязолинов. Реагенты и условия: *i* – CH₂Cl₂/H₂O, тиофосген; *ii* – AcONa, H₂O; *iii* – NaOH, NH₂OH · HCl, H₂O; *iv* – NH₂NH₂ · H₂O, этанол; *v* – ацетилацетон, этанол; *vi* – бензиловый эфир хлоруксусной кислоты, K₂CO₃, ДМФА.

Таблица 1. Цитотоксичность соединений (**VIIa–g**) на клетках колоректального рака HCT-116 и DLD-1

Соединение	Структура	IC ₅₀ , мкМ (<i>p</i> < 0.05)	
		HCT-116	DLD-1
(VIIa)		4.1	6.3
(VIIb)		3.6	5.5
(VIIc)		1.9	2.9
(VIIId)		1.9	2.9
(VIIe)		2.1	3.2
(VIIIf)		2.1	3.2
(VIIg)		2.1	3.2
Эрастин		4.86	7.2

активности соединений – значения IC₅₀ (концентрация, при которых наблюдается 50%-ное ингибирование роста клеток). Наибольшей цитотоксической активностью с равными значениями обладали соединения (**VIIc**) и (**VIIId**). Соединения (**VIIe–g**) также показали одинаковые значения цитотоксичности на двух линиях. При этом все соединения обладали большей цитотоксичностью, чем эрастин.

Для изучения индукции ферроптоза в клетках КРР производными хиназолина (**VIIa–g**) мы использовали две клеточные линии: HCT-116 и

DLD-1. По морфологии обе клеточные линии эпителиальные и несут мутацию в онкогене *KRAS*. Ранее при исследовании индукции ферроптоза производными хиназолина, аналогами эрастина, в клетках рака толстой кишки HCT-116 и меланомы Mel Z гибель клетки по типу ферроптоза мы подтверждали исключением апоптоза (отсутствие фрагментации ядра, блокирование апоптоза панкаспазным ингибитором zVAD-fmk), исключением аутофагии (ингибирование слияния аутофагосомы с лизосомой хлорокином) и связыванием внутриклеточного железа DFO, хелатором

железа [18]. На основании этих результатов в данном исследовании мы не представляем подтверждение железозависимой гибели клетки, а исследуем ферроптоз, индуцированный новыми аналогичными производными хиनाзолина, соединениями (**VIIa–g**), оперируя перекисным окислением липидов мембран и используя в качестве контроля эрастин – общепринятый референсный индуктор ферроптоза. О гибели клеток по типу ферроптоза судили по интенсивности перекисного окисления липидов мембран, которое фиксировали после инкубации клеток с флуоресцентной меткой C11-BODIPY. C11-BODIPY – это флуорофор, который, переходя из тиоэфира в сульфоксид, меняет флуоресцентные характеристики – смещается пик излучения флуоресценции с красного (~590 нм) на зеленый (~510 нм), что позволяет проводить количественный анализ перекисного окисления липидов с использованием флуоресцентной микроскопии.

Для исключения индукции апоптоза и/или некроза в клетках KPP соединениями (**VIIa–g**) мы исследовали индукцию ферроптоза при дозе $1/3 IC_{50}$. При этой дозе вклад апоптоза и других типов гибели клетки будет заметно снижен. Если соединение представляет собой индуктор ферроптоза, то перекисное окисление липидов можно зарегистрировать и при таких дозах. Ранее нами было показано, что подобные производные хиназолина даже при $1/5 IC_{50}$ индуцируют ферроптоз [16]. В качестве контроля использовали эрастин также при дозе $1/3 IC_{50}$. Перекисное окисление липидов мембран в клетках HCT-116, индуцированное $1/3 IC_{50}$ соединения (**VIIa**),

приближалось (75%) к значениям перекисного окисления липидов, индуцированного $1/3 IC_{50}$ эрастина (рис. 1б, 1в). Перекисное окисление липидов, индуцированное остальными шестью соединениями при $1/3 IC_{50}$, составляло 45–60% активности эрастина (рис. 2). По всей видимости, соединение (**VIIa**) препятствует проникновению цистина в клетку и снижению уровня глутатиона, основного антиоксиданта клетки, в большей степени, чем остальные шесть соединений, и, как следствие, наблюдается интенсивное окисление липидов мембран и гибель клеток HCT-116.

Картина существенно менялась при индукции ферроптоза в клетках DLD-1. Интенсивность флуоресценции, индуцированная соединением (**VIIa**), была сравнима с его эффектом в клетках HCT-116. Активность соединений (**VIIb**) и (**VIIg**) превышала ответ клеток DLD-1 на эрастин на 30 и 20% (рис. 2). Остальные соединения на клетках DLD-1 также проявляли более высокую активность, чем на клетках HCT-116. Одним из объяснений такого поведения клеток DLD-1 в ответ на индукцию ферроптоза может стать высококачественный фенотип этих клеток. В отличие от клеток HCT-116 с мутацией в гене *KRAS*, клетки DLD-1 характеризуются мутациями также в генах *MYC*, *MYB*, *RAF*, *FOS*, *SIS* и *P53* [19]. В обеих линиях клеток, инкубированных с эквивалентным количеством DMSO, интенсивность флуоресценции была невысокой и равнялась значениям интенсивности флуоресценции контрольных клеток (без добавления аналогов хиназолина или DMSO) (рис. 1а).

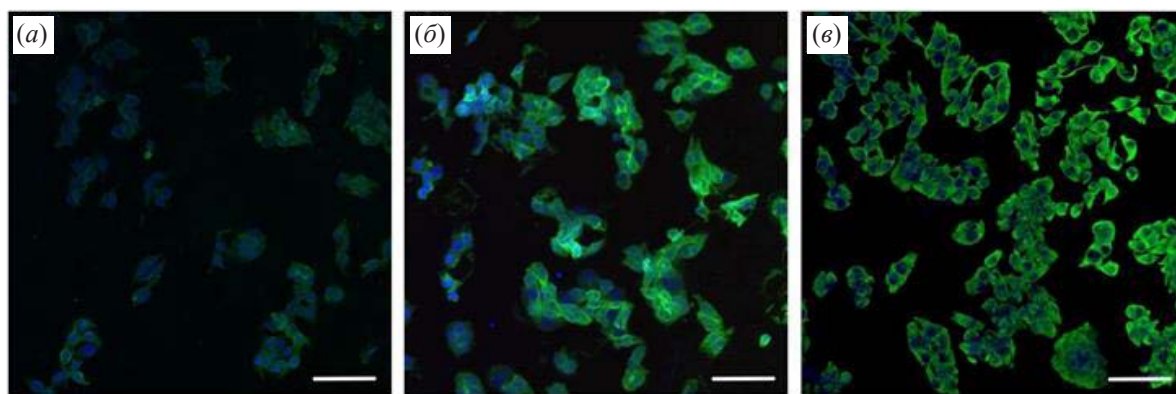


Рис. 1. Влияние соединения (**VIIa**) на индукцию ферроптоза в клетках HCT-116: (а) – контроль – рост клеток с 5% DMSO; (б) – рост клеток с $1/3 IC_{50}$ эрастина; (в) – рост клеток с $1/3 IC_{50}$ соединения (**VIIa**). Масштабный отрезок – 100 мкм.

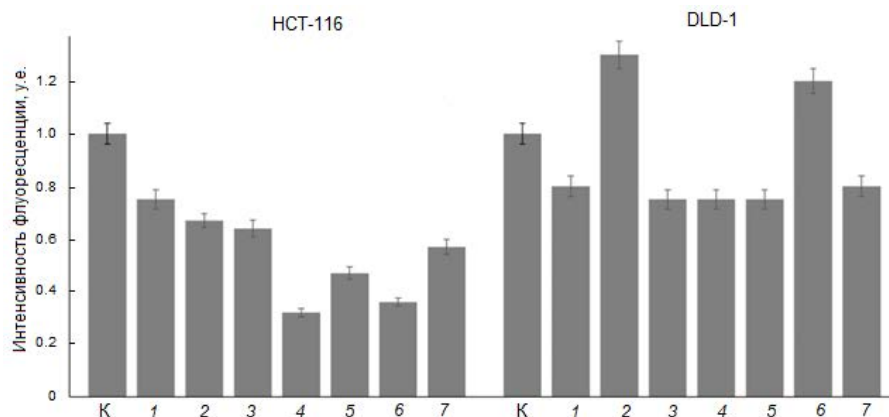


Рис. 2. Количественная характеристика интенсивности перекисного окисления липидов в клетках HCT-116 и DLD-1. К – интенсивность флуоресценции, индуцированная эрастином, 1–7 – соединениями (VIIa–g) соответственно. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение, $p < 0.05$.

Таким образом, проведен первичный скрининг семи производных 3-гидроксихиназолина на двух клеточных линиях KPP, отличающихся по степени злокачественности. Исследования *in vitro* производных 3-гидроксихиназолина (VIIa–g) на их способность индуцировать ферроптоз в клетках KPP показали, что перекисное окисление липидов мембран наиболее выражено для клеток DLD-1 с высокозлокачественным фенотипом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все реактивы были получены от Acros Organics (Бельгия), ABCR (Германия), Merck KGaA (Германия) и использовались без дополнительной очистки. Бензиловые эфиры хлоруксусной кислоты получали из хлорацетилхлорида и бензиловых спиртов по методике Chen et al. [20] и использовали далее без дополнительной очистки. Спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР регистрировали на спектрометре AVANCE III NanoBay (Bruker, Германия) с частотой 300 и 76 МГц соответственно. Спектры получали в режиме стабилизации по дейтерию, термостабилизация 25°C, в растворе DMSO- d_6 или CDCl_3 , в качестве стандарта использовали остаточные сигналы растворителя. Химические сдвиги приведены в миллионных долях (δ), константа спин-спиновой взаимодействия J – в герцах (Гц). Аналитическую ВЭЖХ проводили на хроматографической системе LC/MS 1200 (Agilent, США) с использованием колонки Reprosil-Pur Basic C18 (5 мкм), 4.6 $\times$ 240 мм, подвижная фаза: буфер А – 0.1%-ная TFA в

воде, буфер Б – 0.1%-ная TFA в ацетонитриле, элюирование градиентом концентрации буфера Б в буфере А от 5 до 100% за 20 мин; скорость потока 1 мл/мин, детекция при 220 нм. Масс-спектры с ионизацией электроспреем (ESI-MS) получали на масс-детекторе Ion Trap 6310 (Agilent, США). Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на масс-спектрометре amaZon (Bruker Daltonics, США) с ионной ловушкой в режиме электрораспылительной ионизации. Элементный состав анализировали с помощью элементного CHNS-анализатора Euro EA 3000 (Eurovector Instruments, Италия). Температуру плавления определяли в открытом капилляре на анализаторе температуры плавления MP 90 (Mettler Toledo, Швейцария).

Общая методика синтеза соединений (IVa–с).

К смеси 0.02 моль соответствующего метилантрацила, 50 мл хлористого метилена и 25 мл воды при 0–10°C и интенсивном перемешивании добавляли раствор 2.4 г (0.021 моль) тиофосгена в 10 мл хлористого метилена, перемешивали еще 2 ч при 10°C. Затем водный слой отделяли, органический слой промывали 10 мл воды. К органическому слою при комнатной температуре добавляли раствор 6.8 г (0.05 моль) ацетата натрия тригидрата в 20 мл воды. Реакционную массу перемешивали в течение 1 ч. Органический слой отделяли, промывали 10 мл воды и затем приливали его к раствору 2.78 г (0.04 моль) хлоргидрата гидроксиламина и 1.6 г (0.04 моль) гидроксида натрия в 200 мл воды при 10°C и интенсивном

перемешивании. После добавления температуру доводили до комнатной и перемешивали в течение 2 ч. Осадок отфильтровывали, промывали на фильтре 2 × 25 мл воды, 25 мл хлористого метилена.

3-Гидрокси-2-тиоксо-6-хлор-2,3-дигидро-хиназолин-4(1H)-он (IVa). Выход 3.6 г (79.2%), белые кристаллы, т. пл. 252°C. Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆): 7.88 (д, *J* 2.5, 1H), 7.73 (дд, *J* 8.8, *J* 2.5, 1H), 7.37 (д, *J* 8.8, 1H). Спектр ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 171.76, 155.02, 139.18, 134.50, 127.59, 125.46, 119.84, 117.95. ESI-MS, *m/z* 228.5 [M+H]⁺. Найдено, %: C, 42.19; H, 2.23; N, 12.16. C₈H₅ClN₂O₂S (*M* 228.66). Вычислено, %: C, 42.02; H, 2.20; N, 12.25.

3-Гидрокси-2-тиоксо-7-хлор-2,3-дигидро-хиназолин-4(1H)-он (IVb). Выход 2.8 г (61.3%), белые кристаллы, т. пл. >226–228°C. Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆): 7.94 (д, *J* 8.5, 1H), 7.37 (д, *J* 2.0, 1H), 7.31 (дд, *J* 8.5, *J* 2.0, 1H). Спектр ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 172.37, 155.44, 141.15, 139.00, 128.80, 123.80, 116.67, 115.49. ESI-MS, *m/z* 228.5 [M+H]⁺. Найдено, %: C, 42.11; H, 2.24; N, 12.19. C₈H₅ClN₂O₂S (*M* 228.66). Вычислено, %: C, 42.02; H, 2.20; N, 12.25.

6-Бром-3-гидрокси-2-тиоксо-2,3-дигидро-хиназолин-4(1H)-он (IVc). Выход 4.9 г (89.76%), белые кристаллы, т. пл. >260°C (разл.). Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆): 8.00 (д, *J* 2.3, 1H), 7.83 (дд, *J* 8.8, 2.4, 1H), 7.30 (д, *J* 8.8, 1H). Спектр ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 171.69, 154.82, 139.77, 137.05, 128.43, 120.32, 118.48, 115.21. ESI-MS, *m/z* 273.4 [M+H]⁺. Найдено, %: C, 35.21; H, 1.83; N, 10.27. C₈H₅BrN₂O₂S (*M* 273.11). Вычислено, %: C, 35.18; H, 1.85; N, 10.26

Общая методика синтеза соединений (Va–c). К суспензии (0.02 моль) соответствующего соединения (IV) в 50 мл этанола добавляли 5 г (0.1 моль) гидразингидрата и кипятили при перемешивании 18 ч. Реакционную массу охлаждали, добавляли 10 мл воды, осадок отфильтровывали, промывали на фильтре 2 × 20 мл воды, 10 мл этанола.

2-Гидразинил-3-гидрокси-6-хлор-4(3H)-хиназолинон (Va). Выход 3.7 г (81.0%), белые кристаллы, т. пл. 254°C (разл.). Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆): 7.80 (с, 1H), 7.48 (д, *J* 6.6, 1H), 7.32 (д, *J* 8.8, 1H), 4.53 (с, 4H). Спектр ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 157.86, 153.12, 145.19, 131.67,

126.24, 124.41, 124.05, 118.53. ESI-MS, *m/z* 226.9 [M+H]⁺. Найдено, %: C, 42.38; H, 13.14; N, 24.66. C₈H₇ClN₄O₂ (*M* 226.62). Вычислено, %: C, 42.40; H, 3.11; N, 24.72.

2-Гидразинил-3-гидрокси-7-хлор-4(3H)-хиназолинон (Vb). Выход 3.5 г (78.1%), белые кристаллы, т. пл. >260°C. Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆): 7.94 (д, *J* 2.4, 1H), 7.64 (дд, *J* 8.8, *J* 2.5, 1H), 7.26 (д, *J* 8.8, 1H). Спектр ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 158.30, 153.53, 147.29, 135.99, 127.15, 122.76, 120.45, 116.23. ESI-MS, *m/z* 226.9 [M+H]⁺. Найдено, %: C, 42.39; H, 3.13; N, 24.69. C₈H₇ClN₄O₂ (*M* 228.66). Вычислено, %: C, 42.40; H, 3.11; N, 24.72.

6-Бром-2-гидразинил-3-гидрокси-4(3H)-хиназолинон (Vc). Выход 4.3 г (76.2%), белые кристаллы, т. пл. >260°C. Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆): 7.86 (д, *J* 8.6, 1H), 7.29 (д, *J* 2.0, 1H), 7.05 (дд, *J* 8.5, *J* 2.1, 1H). Спектр ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 157.76, 153.22, 145.43, 134.25, 127.17, 126.52, 119.09, 112.08. ESI-MS, *m/z* 271.1 [M+H]⁺. Найдено, %: C, 35.39; H, 2.61; N, 20.70. C₈H₇BrN₄O₂ (*M* 271.07). Вычислено, %: C, 35.45; H, 2.60; N, 20.67.

Общая методика синтеза соединений (VIa–c). К суспензии (10 ммоль) соответствующего соединения (V) в 20 мл этанола добавляли 1.2 г (12 ммоль) ацетилацетона и две капли уксусной кислоты. Смесь кипятили при перемешивании 4 ч, охлаждали до комнатной температуры, отфильтровывали осадок, промывали 10 мл воды и 10 мл этанола.

2-(3,5-Диметил-1H-пиразол-1-ил)-3-гидрокси-6-хлорхиназолин-4(3H)-он (VIa). Выход 1.8 г (61.5%), бежевые кристаллы, т. пл. 197–198°C. Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆): 11.95 (с, 1H), 8.15 (д, *J* 2.5, 1H), 7.92 (дд, *J* 8.7, 2.5, 0.7, 1H), 7.76 (д, *J* 8.7, 1H), 6.12 (д, *J* 1.0, 1H), 2.29 (д, *J* 0.8, 3H), 2.20 (с, 3H). Спектр ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 157.78, 149.85, 143.80, 143.37, 142.29, 134.73, 131.92, 129.73, 125.16, 123.11, 106.98, 13.23, 10.93. ESI-MS, *m/z* 291.4 [M+H]⁺. Найдено, %: C, 53.79; H, 3.86; N, 19.24. C₁₃H₁₁ClN₄O₂ (*M* 290.71). Вычислено, %: C, 53.71; H, 3.81; N, 19.27.

2-(3,5-Диметил-1H-пиразол-1-ил)-3-гидрокси-7-хлорхиназолин-4(3H)-он (VIb). Выход 1.6 г (53.5%), светло-желтые кристаллы, т. пл. 206–207°C. Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆): 11.93 (с, 1H), 8.20 (д, *J* 8.6, 1H), 7.83 (д, *J* 2.0, 1H), 7.66 (дд, *J* 8.6,

J 2.1, 1H), 6.13 (с, 1H), 2.30 (д, J 0.8, 3H), 2.20 (с, 3H). Спектр ^{13}C -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 158.22, 149.91, 145.67, 144.59, 142.36, 139.22, 128.28, 127.80, 126.65, 120.64, 107.09, 13.24, 10.98. ESI-MS, m/z 291.0 $[M+H]^+$. Найдено, %: C, 53.73; H, 3.83; N, 19.25. $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{ClN}_4\text{O}_2$ (M 290.71). Вычислено, %: C, 53.71; H, 3.81; N, 19.27.

6-Бром-2-(3,5-диметил-1H-пиразол-1-ил)-3-гидроксихиназолин-4(3H)-он (VIc). Выход 1.8 г (52.2%), белые кристаллы, т. пл. 194–195°C. Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 8.29 (д, J 2.3, 1H), 8.04 (дд, J 8.7, J 2.4, 1H), 7.69 (д, J 8.7, 1H), 6.13 (с, 1H), 2.30 (с, 3H), 2.21 (с, 3H). Спектр ^{13}C -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 157.65, 149.84, 143.89, 143.62, 142.27, 137.44, 129.82, 128.25, 123.42, 120.07, 106.97, 13.22, 10.92. ESI-MS, m/z 335.0 $[M+H]^+$. Найдено, %: C, 46.55; H, 3.33; N, 16.76. $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{BrN}_4\text{O}_2$ (M 335.16). Вычислено, %: C, 46.59; H, 3.31; N, 16.72.

Общая методика синтеза соединений (VIIa–g). К раствору соответствующего соединения (VI) (1.0 ммоль) в 5 мл ДМФА добавляли 138 мг мелкоизмельченного карбоната калия (1.0 ммоль), затем добавляли по каплям раствор соответствующего бензилового эфира хлоруксусной (1.1 ммоль) в 1 мл ДМФА. Перемешивали при комнатной температуре 12 ч, добавляли 15 мл охлажденной воды, экстрагировали 2 раза по 10 мл этилацетата, органический слой промывали 10 мл насыщенного раствора хлорида натрия, сушили над сульфатом натрия, отгоняли растворитель. Остаток растирали в 5 мл смеси гексан–эфир (1 : 1) до получения гомогенного осадка.

4-Хлорбензил 2-((2-(3,5-диметокси-1H-пиразол-1-ил)-6-хлор-4-оксохиназолин-3(4H)-ил)окси)ацетат (VIIa). Выход 155 г (65.7%), белые кристаллы, т. пл. 108–109°C. Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 8.12 (д, J 2.4, 1H), 7.92 (дд, J 8.8, J 2.5, 1H), 7.73 (д, J 8.7, 1H), 7.49–7.34 (м, 4H), 6.15 (с, 1H), 5.17 (с, 2H), 5.15 (с, 2H), 2.41 (с, 3H), 2.09 (с, 3H). ^{13}C -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 166.23, 157.53, 150.34, 143.23, 142.70, 135.04, 134.50, 132.84, 131.77, 129.93, 129.59, 128.39, 125.32, 123.65, 108.04, 73.57, 65.13, 40.34, 13.08, 11.58. HRMS: m/z 473.0784 $[M]^+$. Вычислено для $(\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_4)^+$: 473.0782.

1-(4-(трет-Бутил)фенил)этил 2-((6-бром-2-(3,5-диметил-1H-пиразол-1-ил)-4-оксохиназолин-3(4H)-ил)окси)ацетат (VIIb). Выход 130 мг (58.7%), светло-бежевые кристаллы, т. пл.

119–120°C. Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 8.26 (д, J 2.3, 1H), 8.04 (дд, J 8.7, J 2.4, 1H), 7.65 (д, J 8.7, 1H), 7.37 (д, J 8.4, 2H), 7.26 (д, J 8.4, 2H), 6.13 (с, 1H), 5.88 (кв, J 6.6, 1H), 5.11 (д, J 1.7, 2H), 2.40 (д, J 0.8, 3H), 2.01 (с, 3H), 1.48 (д, J 6.6, 3H), 1.28 (с, 9H). Спектр ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 165.92, 158.17, 151.89, 151.37, 144.02, 138.39, 137.91, 129.86, 129.82, 126.30, 125.68, 123.92, 121.46, 108.75, 77.66, 77.23, 76.81, 74.04, 73.48, 34.78, 31.54, 22.10, 13.62, 12.26. HRMS: m/z 553.1492 $[M]^+$. Вычислено для $(\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{BrN}_4\text{O}_4)^+$: 553.1449.

4-Метилбензил 2-((2-(3,5-диметокси-1H-пиразол-1-ил)-7-хлор-4-оксохиназолин-3(4H)-ил)окси)ацетат (VIIc). Выход 125 г (55.2%), белые кристаллы, т. пл. 91–92°C. Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 8.17 (д, J 8.6, 1H), 7.79 (д, J 2.0, 1H), 7.64 (дд, J 8.6, J 2.0, 1H), 7.30–7.13 (м, 4H), 6.16 (д, J 1.0, 1H), 5.13 (д, J 2.0, 4H), 2.42 (д, J 0.9, 3H), 2.30 (с, 3H), 2.10 (с, 3H). Спектр ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 166.68, 158.74, 151.90, 146.07, 144.12, 143.71, 141.53, 138.62, 132.29, 129.47, 128.75, 128.66, 128.27, 127.52, 120.89, 108.92, 74.05, 67.04, 21.40, 13.68, 12.36. HRMS: m/z 453.1332 $[M]^+$. Вычислено для $(\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{ClN}_4\text{O}_4)^+$: 453.1328.

4-Метоксибензил 2-((2-(3,5-диметокси-1H-пиразол-1-ил)-7-хлор-4-оксохиназолин-3(4H)-ил)окси)ацетат (VIIId). Выход 140 мг (59.7%), белые кристаллы, т. пл. 78–80°C. Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 8.18 (д, J 8.6, 1H), 7.80 (д, J 2.0, 1H), 7.66 (дд, J 8.6, J 2.1, 1H), 7.30 (д, J 8.6, 2H), 6.93 (д, J 8.6, 2H), 6.17 (с, 1H), 5.12 (д, J 3.2, 4H), 3.76 (с, 3H), 2.43 (с, 3H), 2.11 (с, 3H). Спектр ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 166.77, 160.14, 158.79, 151.94, 146.12, 144.16, 143.76, 141.59, 130.77, 128.71, 128.32, 127.57, 120.93, 114.33, 108.96, 74.11, 66.99, 55.56, 13.73, 12.40. HRMS: m/z 469.1279 $[M]^+$. Вычислено для $(\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{ClN}_4\text{O}_5)^+$: 469.1277.

4-Метилбензил 2-((2-(3,5-диметокси-1H-пиразол-1-ил)-6-хлор-4-оксохиназолин-3(4H)-ил)окси)ацетат (VIIe). Выход 200 мг (88.3%), белые кристаллы, т. пл. 97–98°C. Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 8.12 (д, J 2.5, 1H), 7.92 (дд, J 8.7, 2.5, 1H), 7.73 (д, J 8.7, 1H), 7.28–7.13 (м, 4H), 6.19–6.13 (м, 1H), 5.13 (д, J 1.3, 4H), 2.44–2.38 (м, 3H), 2.30 (с, 3H), 2.10 (с, 3H). Спектр ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 166.59, 158.24, 151.86, 143.64, 143.21, 138.63, 133.77, 132.27, 129.59, 129.48, 128.76, 126.63, 123.60, 108.75, 73.98, 67.07, 21.40, 13.67, 12.26. HRMS: m/z 453.1333 $[M]^+$. Вычислено для $(\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{ClN}_4\text{O}_4)^+$: 453.1328.

4-Бромбензил 2-((6-бром-2-(3,5-диметил-1H-пирозол-1-ил)-4-оксохиназолин-3(4H)-ил)-окси)ацетат (VII_f). Выход 120 мг (53.3%), белые кристаллы, т. пл. 135–137°C. Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆): 8.26 (д, *J* 2.4, 1H), 8.04 (дд, *J* 8.7, *J* 2.4, 1H), 7.65 (д, *J* 8.7, 1H), 7.58 (д, *J* 8.3, 2H), 7.40–7.23 (м, 2H), 6.16 (с, 1H), 5.15 (д, *J* 3.5, 4H), 2.41 (с, 3H), 2.09 (с, 3H). Спектр ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 166.51, 158.17, 151.87, 143.97, 143.70, 143.24, 138.46, 134.31, 131.99, 130.23, 129.81, 123.84, 122.84, 121.51, 108.84, 74.04, 66.25, 13.67, 12.31. HRMS: *m/z* 560.9781 [*M*]⁺. Вычислено для (C₂₂H₁₉Br₂N₄O₄)⁺: 560.9773.

4-Бромбензил 2-((2-(3,5-диметокси-1H-пирозол-1-ил)-6-хлор-4-оксохиназолин-3(4H)-ил)окси)ацетат (VII_g). Выход 150 мг (57.9%), белые кристаллы, т. пл. 126–127°C. Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆): 8.14 (д, *J* 2.5, 1H), 7.93 (дд, *J* 8.7, *J* 2.5, 1H), 7.74 (д, *J* 8.7, 1H), 7.64–7.41 (м, 2H), 7.41–7.23 (м, 2H), 6.16 (с, 1H), 5.17 (с, 2H), 5.15 (с, 2H), 2.42 (с, 3H), 2.10 (с, 3H). Спектр ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 166.51, 158.29, 151.84, 143.72, 135.68, 134.31, 133.85, 131.99, 130.23, 129.61, 126.64, 123.57, 122.84, 108.80, 74.03, 66.25, 13.65, 12.29. HRMS: *m/z* 517.0281 [*M*]⁺. Вычислено для (C₂₂H₁₉BrClN₄O₄)⁺: 517.0277.

Культивирование клеток. В работе использовали клетки колоректального рака HCT-116 (ATCC, CCL-247TM) и DLD-1 (ATCC, CCL-221TM). Клетки культивировали в полной среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки (HyClone, США), 2 mM глутамина и 0.1 мг/мл гентамицина. В экспериментах использовали клетки 70–75%-ной конfluентности.

МТТ-тест. Клетки рака толстой кишки HCT-116 или DLD-1 (5 × 10⁴ клеток/мл) рассеивали в 96-луночный планшет в среде RPMI-1640. Спустя 24 ч добавляли соединения в различных концентрациях в объеме 20 мкл среды и инкубировали сутки, затем добавляли в каждую лунку по 10 мкл раствора МТТ до конечной концентрации 0.5 мг/мл (Sigma, США). Клетки инкубировали еще 4 ч, далее клетки осаждали центрифугированием планшетов при 1000 об/мин в течение 23 мин, среду отбирали, клетки ресуспендировали в 200 мкл DMSO и инкубировали 10 мин при 37°C, после чего немедленно определяли оптическую плотность раствора формазана на анализаторе иммуноферментных реакций Униплан АИФР-01 (Пикон, Россия) при 540 нм, используя DMSO как нулевой контроль. Для каждого препарата

строили график зависимости “доза–эффект” и определяли IC₅₀.

Влияние производных хиназолина на индукцию ферроптоза *in vitro*. Флуоресцентный индикатор окисления липидов C11-BODIPY получен от Thermo Fisher Scientific (США), эрастин был приобретен у Sigma-Aldrich (США).

Клетки HCT-116 и DLD-1 выращивали в полной среде RPMI-1640 в 24-луночном планшете. Через 24 ч роста клеток в CO₂-инкубаторе при 37°C добавляли 1/3 IC₅₀ эрастина или 1/3 IC₅₀ исследуемых соединений и инкубировали в течение 6 ч. В качестве контроля использовали клетки, растущие в полной среде RPMI-1640 без индуктора ферроптоза (на рис. 1 не представлен), и клетки, инкубированные с эквимоллярным количеством DMSO. Затем среду заменяли свежей, с 1%-ной сывороткой, и добавляли 5 мкМ C11-BODIPY. Ядра клеток доокрашивали при помощи красителя для нуклеиновых кислот Hoechst 33258 (Thermo Fisher Scientific, США). После инкубации с флуоресцентной меткой в течение 30 мин клетки трижды промывали фосфатным буфером. Интенсивность флуоресценции клеток определяли на флуоресцентном анализаторе IN Cell Analyzer (GE Healthcare, США) при активации C11-BODIPY-лазером 488 нм, детекции в канале “FITC” с фильтром 525/20 нм, при увеличении ×20, с использованием программного обеспечения InCell Investigator (GE Healthcare, США). Для анализа окрашенных C11-BODIPY клеток проводили определение клеток на основе локализации ядер, окрашенных Hoechst 33258, и определяли границы клеток, в которых определяли интенсивность флуоресценции при 525/20 нм, анализируя не менее 200 клеток. На основании полученных данных рассчитывали среднее значение интенсивности флуоресценции. Методика определения C11-BODIPY с использованием только одного канала адаптирована из статьи Chen et al. [20].

Статистический анализ. Все эксперименты выполняли в трех повторах независимо друг от друга. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. Статистическую проверку гипотез проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при *p* < 0.05.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Колоректальный рак – высокозлокачественная опухоль, резистентная к химио- и таргетной терапии. Высокая частота рецидивов, непредсказуемость клинического течения болезни и отсутствие эффективной системной терапии

делают пессимистическими прогнозы лечения КРР. Одной из основных причин клинического прогрессирования КРР на фоне лечения остается лекарственная резистентность [21]. Утрата программы клеточной гибели дает возможность опухолевой клетке сохранять жизнеспособность в присутствии высоких концентраций противоопухолевых лекарств и формировать опухолевую ткань, абсолютно резистентную к химиотерапии. Именно это свойство опухолевых клеток обуславливает трудность лечения резистентных к терапии больных: опухоль нечувствительна к химиотерапии независимо от комбинирования применяемых лекарств. Если при этом исчерпаны возможности других видов лечения – хирургического и лучевого – болезнь вступает в необратимую стадию.

На сегодняшний день получены убедительные данные о том, что опухолевые клетки, уцелевшие после химио-, радио-, иммуно- и таргетной терапии, чувствительны к индукции ферроптоза [22, 23]. Гибель резистентной к терапии клетки становится возможной благодаря добавлению дополнительного окислительного стресса радикалами гидроксила, генерируемыми в реакции Фентона: антиоксидантная система защиты клетки практически полностью разрушается. Несмотря на несомненную перспективность активации ферроптоза, к настоящему времени в клинической практике отсутствуют препараты, индуцирующие ферроптоз в опухолевых клетках. Полученный нами экспериментальный материал о способности производных гидроксихиназолинов (в частности соединений (VIIa), (VIIb) и (VIIc)) индуцировать ферроптоз в клетках колоректального рака, превышающий эффект “золотого стандарта” – эрастина, позволяет инициировать исследования их противоопухолевой активности на модели перевиваемой опухоли рака толстой кишки на мышцах.

БЛАГОДАРНОСТИ

Аналитические исследования проведены с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Исследовательский химико-аналитический центр НИЦ “Курчатовский институт”.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено в рамках государственного задания “Экспериментальная разработка новых лекарственных средств для терапии злокачественных опухолей” рег. №: 123022100036-8.

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. *Fabregas J.C., Ramnaraigh B., George T.J.* // Clin. Colorectal Cancer. 2022. V. 21. P. 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2022.05.006>
2. *Grazzini G., Danti G., Chiti G., Giannessi C., Pradella S., Miele V.* // Diagnostics (Basel). 2023. V. 13. P. 2104–2115. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13122104>
3. *Afrăsănie V.A., Marinca M.V., Alexa-Stratulat T., Gaf-ton B., Păduraru M., Adavidoaiei A.M., Miron L., Rusu C.* // Radiol. Oncol. 2019. V. 53. P. 265–274. <https://doi.org/10.2478/raon-2019-0033>
4. *Kozovska Z., Gabrisova V., Kucerova L.* // Biomed. Pharmacother. 2014. V. 68. P. 911–916. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.10.019>
5. *Van der Jeught K., Xu H.C., Li Y.J., Lu X.B., Ji G.* // World J. Gastroenterol. 2018. V. 24. P. 3834–3848. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i34.3834>
6. *Dixon S.J., Lemberg K.M., Lamprecht M.R., Skouta R., Zaitsev E.M., Gleason C.E., Patel D.N., Bauer A.J., Cantley A.M., Yang W.S., Morrison B., 3rd, Stockwell B.R.* // Cell. 2012. V. 149. P. 1060–1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>
7. *Negri F., Bottarelli L., de'Angelis G.L., Gnetti L.* // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 4120–4128. <https://doi.org/10.3390/ijms23084120>
8. *Zhang C., Liu X., Jin S., Chen Y., Guo R.* // Mol. Cancer. 2022. V. 21. P. 47–59. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01530-y>
9. *Prukli M., Poljak-Blazi M., Jakopovic M., Tomas D., Stipancic I., Zarkovic N.* // Cancer Lett. 2006. V. 238. P. 188–96. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.07.001>
10. *Demir H., Beypinar I., Urvay S., Davarci S.E., Baykara M.* // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2021. V. 25. P. 6473–6479. https://doi.org/10.26355/eurrev_202111_27091
11. *Xu T., Ding W., Ji X., Ao X., Liu Y., Yu W., Wang J.* // J. Cell Mol Med. 2019. V. 23. P. 4900–4912. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14511>
12. *Galluzzi L., Vitale I., Warren S., Adjemian S., Agostinis P., Martinez A.B., Chan T.A., Coukos G., Demaria S., Deutsch E., Draganov D., Edelson R.L., Formenti S.C., Fucikova J., Gabriele L., Gaipal U.S., Gameiro S.R.,*

- Garg A.D., Golden E., Han J., Harrington K.J., Hemminki A., Hodge J.W., Hossain D.M.S., Illidge T., Karin M., Kaufman H.L., Kepp O., Kroemer G., Lasarte J.J., Loi S., Lotze M.T., Manic G., Merghoub T., Melcher A.A., Mossman K.L., Prosper F., Rekdal Ø., Rescigno M., Riganti C., Sistigu A., Smyth M.J., Spisek R., Stagg J., Strauss B.E., Tang D., Tatsuno K., van Gool S.W., Vandenabeele P., Yamazaki T., Zamarin D., Zitvogel L., Cesano A., Marincola F.M. // *J. Immunother. Cancer*. 2020. V. 8. P. e000337. <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000337>
13. Sprooten J., De Wijngaert P., Vanmeerbeerk I., Martin S., Vangheluwe P., Schlenner S., Krysko D.V., Parys J.B., Bultynck G., Vandenabeele P., Garg A.D. // *Cells*. 2020. V. 9. P. 1823. <https://doi.org/10.3390/cells9081823>
 14. Wiernicki B., Maschalidi S., Pinney J., Adjemian S., Vanden Berghe T., Ravichandran K.S., Vandenabeele P. // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. P. 3676. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31218-2>
 15. Борисова Л.М., Осипов В.Н., Гусев Д.В. Голубева И.С., Киселева М.П., Вартамян А.А. // *Рос. биотерапевтич. журнал*. 2021. Т. 20. С. 67–73. <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-1-67-73>
 16. Борисова Л.М., Осипов В.Н., Голубева И.С., Киселева М.П., Хоченков Д.А., Вартамян А.А. // *Усп. мол. онкологии*. 2022. Т. 9. С. 48–56. <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2022-9-1-48-56>
 17. Wang Y., Wu X., Ren Z., Li Y., Zou W., Chen J., Wang H. // *Drug Resist. Updat.* 2023. V. 66. P. 100916. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2022.100916>
 18. Вартамян А.А., Осипов В.Н., Хоченков Д.А., Гусев Д.В., Борисова Л.М. // Патент RU 2722308 C1, опубл. 28.05.2020.
 19. Trainer D.L., Kline T., McCabe F.L., Faucette L.F., Feild J., Chaikin M., Anzano M., Rieman D., Hofstein S., Li D.J., Gennaro D., Buscarino C., Lynch M., Poste G., Greig R. // *Int. J. Cancer*. 1988. V. 41. P. 287–296. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910410221>
 20. Chen S.K., Ma W.Q., Yan Z.B., Zhang F.M., Wang S.H., Nu Y.Q., Zhang X.M., Tian J.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2018. V. 140. P. 10099–10103. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00992>
 21. Martinez A.M., Kim A., Yang W.S. // *Methods Mol. Biol.* 2020. V. 2108. P. 125–130. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0247-8_11
 22. Sakata S., Larson D.W. // *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 2022. V. 31. P. 255–264. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2021.11.006>
 23. Zhang C., Liu X., Jin S., Chen Y., Guo R. // *Mol. Cancer*. 2022. V. 21. P. 47–58. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01530-y>

3-Hydroxyquinazoline Derivatives, Analogues of Erastin, Induce Ferroptosis in Colorectal Cancer Cells

V. N. Osipov^{*,#}, A. A. Vartanyan^{*}, D. A. Khochenkov^{*}, D. V. Gusev^{*}, O. V. Fateenkova^{**}, D. S. Khachatryan^{***}, and L. M. Borisova^{*}

[#] Phone: +7 (916) 412-61-43; e-mail: ovn65@yandex.ru

^{*} N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Kashirskoe shosse 24, Moscow, 115478 Russia

^{**} I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Sechenov University), ul. Trubetskaya 8/2, Moscow, 119991 Russia

^{***} National Research Center “Kurchatov Institute”, pl. Akad. Kurchatova 1, Moscow, 123182 Russia

In recent years, significant progress has been achieved in the treatment of patients with colon cancer, but in most cases treatment is accompanied by the development of drug resistance. Recently discovered iron-dependent cell death, ferroptosis, makes it a promising therapeutic target to reduce the recurrence rates. In this study we have examined the effect of 3-hydroxyquinazoline derivatives on ferroptosis induction in two colon cancer cells HCT-116 and DLD-1. The ferroptotic cell death was identified by the level of lipid peroxidation. The level of lipid peroxidation in HCT-116 cells induced by some compounds approached the activity of the reference drug erastin. This scenario changed significantly when the ferroptosis induction was studied in DLD-1 cells. Two 3-hydroxyquinazoline derivatives induced levels of lipid peroxidation in DLD-1 cells that exceeded those of erastin. The preliminary results obtained suggest that three new compounds can be considered as an antitumor agent for the treatment of colon cancer, and also indicate the prospects of further searching for ferroptosis inducers among 3-hydroxyquinazoline derivatives.

Keywords: quinazoline' derivatives synthesis, colorectal cancer, cytotoxic activity, ferroptosis induction



УДК 54.057;577.325

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ БЕЛОК-ПОЛИСАХАРИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕАЗ И ГИДРОФИЛЬНО МОДИФИЦИРОВАННОГО ХИТОЗАНА

© 2024 г. М. С. Лавлинская*, А. В. Сорокин*, С. С. Гончарова*, М. Г. Холявка*, **, #,
М. С. Кондратьев*, ***, В. Г. Артюхов*

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

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

*** Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований” РАН,

Россия, 142290 Пущино, ул. Институтская, 3

Поступила в редакцию 15.11.2023 г.

После доработки 20.11.2023 г.

Принята к публикации 21.11.2023 г.

Получены комплексы цистеиновых протеаз – бромелина, папаина и фицина – с привитым сополимером хитозана и поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилата. В ходе исследования установлено, что каталитическая активность ферментов в комплексах снижается по сравнению с их нативными формами. Результаты молекулярного докинга показали, что модифицированный полисахарид располагается в каталитическом кармане глобул цистеиновых протеаз. Полученные комплексы обладают повышенной стабильностью при хранении в физиологических условиях, что делает их перспективными кандидатами для использования в разработке средств терапии раневых поражений мягких тканей.

Ключевые слова: бромелин, папаин, фицин, комплексообразование, каталитическая активность, стабильность ферментов

DOI: 10.31857/S0132342324050047, **EDN:** LRRAID

ВВЕДЕНИЕ

Белок-полисахаридные комплексы – структуры, образуемые путем нековалентного связывания соответствующих типов макромолекул, которые играют важную роль в функционировании живых организмов, а также представляют собой интересные объекты исследования для фундаментальной химии и биологии, позволяющие понять особенности функционирования ферментов в условиях *in vivo*. В результате взаимодействия биомacroмолекул формируется уникальная среда, обладающая свойствами, отличными от параметров, присущих индивидуальным компонентам. Таким образом, получая комплексы белок–полисахарид, можно модулировать практически значимые характеристики обоих компонентов,

что увеличивает не только возможности применения получаемых структур, но и расширяет представления об особенностях их взаимодействий.

Бромелин (КФ 3.4.22.32/33), папаин (КФ 3.4.22.2) и фицин (КФ 3.4.22.3) – растительные цистеиновые (папаиноподобные) протеиназы с высокой каталитической активностью и широкой субстратной специфичностью. Эти ферменты используются в медицине для терапии ожоговых и раневых повреждений мягких тканей [1, 2], профилактики и лечения кариеса [3, 4], обладают антибиопленочной [5, 6] и антибактериальной активностью [7, 8], что делает их перспективными кандидатами для разработки инновационных антибактериальных препаратов, в том числе

Сокращения: ХТЗ-ДМАЭМА – привитой сополимер хитозана и поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилата.

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

эффективных против микроорганизмов, устойчивых к традиционным антибиотикам.

Практически значимые свойства и широкое применение названных ферментов обусловлено особенностями их строения. Бромелин, папаин и фицин представляют собой глобулярные мономерные белки, молекулы которых состоят из двух доменов: L-домена, содержащего α -спиральные фрагменты, и R-домена, включающего в себя преимущественно β -складчатые области. На их стыке образуется углубление, содержащее активный центр – “каталитический карман”. Активный центр этих ферментов представляет собой триаду Cys-His-Asp, совершающую акт катализа путем нуклеофильной атаки на субстрат посредством тиольной группы цистеина, в депротонировании которой принимает участие имидазольное кольцо гистидина. Положение азольного цикла относительно SH-группы регулируется путем образования водородной связи с остатком Asp, однако значимость аспарагиновой кислоты в процессе катализа меняется для различных представителей цистеиновых протеаз [9]. Из-за наличия в активном центре остатка Cys, содержащего тиольную группу, а также процесса автолиза, свойственного для всех протеаз, эти ферменты характеризуются низкой стабильностью и достаточно быстро инактивируются под действием кислорода воздуха.

Учитывая специфику применения бромелина, папаина и фицина, перспективным способом повышения их стабильности является комплексообразование с нетоксичными и биосовместимыми полисахаридами, например, хитозаном. Хитозан представляет собой статистический сополимер *N*-ацетил-D-глюкозамина и D-глюкозамина, соединенных между собой 1,4- β -гликозидными связями. За счет наличия большого количества доступных первичных аминогрупп он проявляет поликатионные свойства и растворим в водных средах при pH < 6.5 при содержании звеньев *N*-ацетил-D-глюкозамина не более 55% масс. [10]. Однако ограниченная растворимость и малое количество типов функциональных групп делают хитозан практически не пригодным для получения водорастворимых комплексов ферментов, используемых, например, в терапии ран [6]. В связи с этим представляется необходимым осуществить модификацию хитозана, повышающую его способность к растворению в воде, а также вносящую новые функциональные группы в структуру макромолекул для повышения эффективности его взаимодействия с цистеиновыми протеазами.

Перспективный метод модификации полисахаридов – их прививочная сополимеризация с различными синтетическими полимерами. Подход позволяет вводить в состав намного большее количество функциональных групп по сравнению с полимер-аналогичными превращениями (например, карбоксиметилированием, этерификацией и т.д.), при этом для привитых сополимеров с относительно невысокой частотой прививки сохраняется стерическая доступность и реакционная способность большей части групп исходного полисахарида [11, 12].

В настоящей работе мы получили привитой сополимер хитозана и поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилата – нетоксичного водорастворимого полимера с высокой комплексообразующей способностью, обладающего также термо- и pH-чувствительными свойствами в физиологических диапазонах, способствующими контролируемому и пролонгированному высвобождению целевого компонента, например, фермента при терапии ран. Архитектура привитого сополимера позволяет обеспечить стерическую доступность синтетических цепей для взаимодействия с молекулами фермента. Кроме того, известно, что прививка звеньев поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилата может повысить сорбционную емкость полисахарида по отношению к сложным молекулам природного происхождения, таким как паклитаксел [12].

Таким образом, целью настоящей работы было исследование структурно-функциональных особенностей комплексов цистеиновых протеаз – бромелина, папаина и фицина – с привитым сополимером хитозана и поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилата (ХТЗ-ДМАЭМА), включающее в себя оценку влияния процессов комплексообразования на протеазную активность и стабильность молекул рассматриваемых ферментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Привитой сополимер хитозана и поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилата (ХТЗ-ДМАЭМА) получали растворной радикальной полимеризацией в 2%-ном растворе уксусной кислоты при 40°C в течение 18 ч. В качестве инициатора реакции использовали смесь персульфата калия и метабисульфита натрия в мольном соотношении 1 : 1. Значение pH итоговой реакционной смеси составляло 4.9 ± 0.2 . Согласно имеющимся литературным данным, условия протекания сополимеризации винилового мономера и полисахарида, в особенности температура и значения

pH реакционной среды, оказывают значительное влияние на архитектуру образующейся структуры. В жестких условиях ($\text{pH} < 2$, $T > 60^\circ\text{C}$) формируется преимущественно блок-сополимер полисахарида и выбранного мономера. В случае осуществления процесса в мягких условиях ($\text{pH} > 5$, $T > 30\text{--}50^\circ\text{C}$) основным продуктом реакции – это привитой сополимер [11–13]. Кроме того, в таких условиях наблюдается меньшее количество побочных реакций, в том числе окисления полисахаридов до токсичных соединений, что повышает выход целевого продукта и чрезвычайно важно для полимеров биомедицинского назначения. Механизм образования целевого продукта – привитого сополимера – представлен на схеме 1.

Важнейшие параметры, характеризующие привитой сополимер, – это эффективность и частота прививки боковых звеньев. В табл. 1 представлены эти данные, а также величина

молекулярной массы привитых боковых цепей, выделенных путем деструкции полигликозидного остова макромолекул. Как видно из представленных данных, привитые цепи поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилата характеризуются довольно высокими значениями эффективности и частоты прививки и небольшой величиной молекулярных масс, что увеличивает их стерическую доступность, а также комплексообразующую способность [15, 16]. В свою очередь, невысокие значения молекулярных масс привитых цепей могут указывать на протекание побочных процессов, таких как реакции передачи цепи и образование гомополимера [11, 12]. На основании этого можно предположить, что синтезированный привитой сополимер позволит получать устойчивые комплексы с цистеиновыми протеазами, стабилизированными за счет раз-

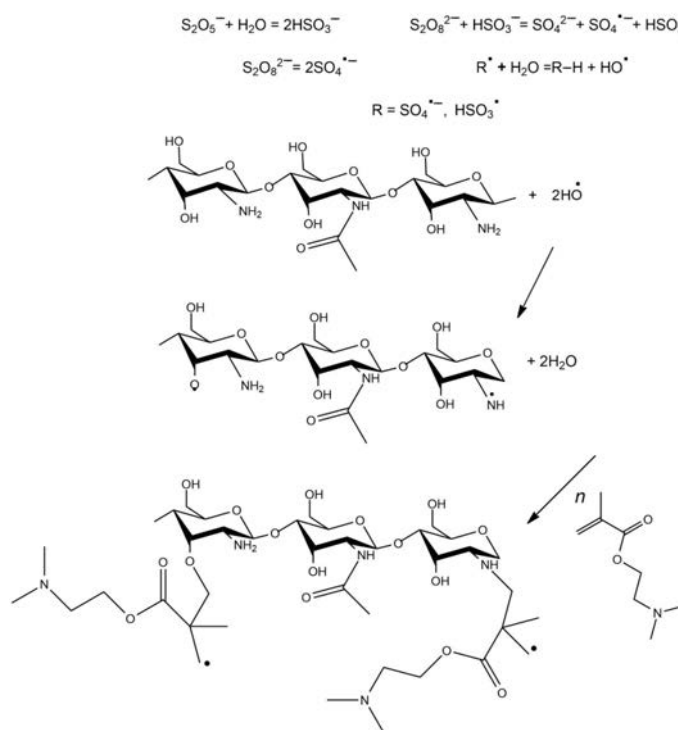


Схема 1. Процесс образования целевого продукта – привитого сополимера хитозана и поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилата.

Таблица 1. Характеристики привитого сополимера хитозана и поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилата

Конверсия, %	Привитый полимер в сополимере, % мол.	ЭП, %	ЧП $\times 10^2$	M_w привитых цепей
55	35	23	2.7	7000

Примечание: ЭП – эффективность прививки, ЧП – частота прививки.

личных типов взаимодействий, в том числе с привитыми цепями.

В результате определения содержания белка в полученных комплексах по методу Лоури выявлено, что наибольший выход комплексообразования по белку достигается для папаина (93%, 37.37 ± 1.69 мг/г), а наименьший – для фицина (37%, 14.95 ± 0.66 мг/г) (рис. 1). Эта же тенденция сохраняется для общей протеолитической активности комплексов: их активность ниже по сравнению со свободными ферментами, для папаина она составляет 70% (66.81 ± 2.22 ед./мл), для бромелина – 31% (30.06 ± 1.57 ед./мл), для фицина – 29% (27.87 ± 1.79 ед./мл) (рис. 2).

Для того чтобы установить причины снижения каталитической активности ферментов в комплексах с привитым сополимером, нами были проведены соответствующие расчеты методом молекулярного докинга. На рис. 3 представлена топология образующихся комплексов ХТЗ-ДМАЭМА–цистеиновая протеаза. Как видно из представленных данных, во всех случаях лиганды располагаются непосредственно в каталитическом кармане глобул фермента, при этом из-за объемности полисахарида он выходит за пределы щели между доменами. Особенно ярко это проявляется в случае фицина (рис. 3в): в его глобуле пространство между доменами более узкое и вытянутое по сравнению с бромелином и папаином. В результате этого над активным центром ферментов образуется плотное “покрытие” из модифицированного полисахарида, создающее диффузионные затруднения для продвижения высокомолекулярного субстрата – азоказеина – к активному центру цистеиновой протеазы, что приводит к снижению ее каталитической активности.

Кроме того, для всех ферментов наблюдается непосредственное связывание каталитически значимых аминокислотных остатков с молекулой сополимера: в случае папаина и фицина происходит образование водородных связей с аминокислотами активного центра – Cys25 и His162 соответственно; для бромелина наблюдаются лишь слабые физические взаимодействия с His158 (рис. 4, табл. 2). Однако при этом папаин в комплексе сохраняет наибольшую каталитическую активность по сравнению с другими исследуемыми ферментами (см. рис. 2). По-видимому, это связано со способностью папаина депротонировать SH-группу активного центра еще до начала катализа без участия прочих аминокислот каталитической триады [17].

Несмотря на то, что, согласно результатам расчетов молекулярного докинга, все ферменты образуют сопоставимое количество связей и взаимодействий с полисахаридом, для фицина наблюдается наименьший выход комплексообразования по белку. Это можно объяснить тем, что расчет *in silico* проводили без учета внешних условий, таких как наличие молекул растворителя или других лигандов, pH или ионная сила среды. Комплексообразование осуществляли в глициновом буфере с pH 9.0, это значение соответствует изоэлектрической точке фицина, в

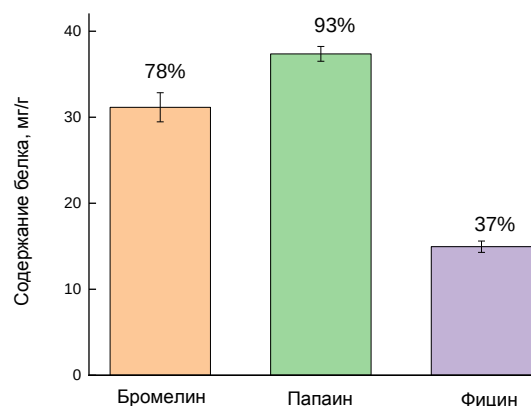


Рис. 1. Содержание белка (мг/г носителя) в комплексах бромелина, папаина и фицина с привитым сополимером хитозана и поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилата. Указан выход комплексообразования по белку, выраженный в процентах сорбированного фермента от его количества в растворе в процессе взаимодействия, принятого за 100%.

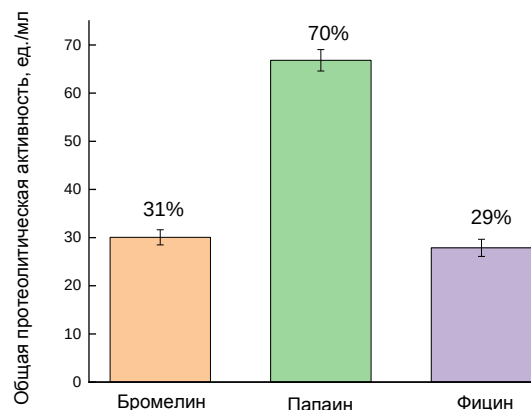


Рис. 2. Общая каталитическая активность (ед./мл раствора) комплексов бромелина, папаина и фицина с привитым сополимером хитозана и поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилата. Указана также эффективность комплексообразования ферментов (по общей каталитической активности), выраженная в процентах сохранения протеолитической активности фермента после иммобилизации по отношению к активности ферментов в растворе, принятой за 100%.

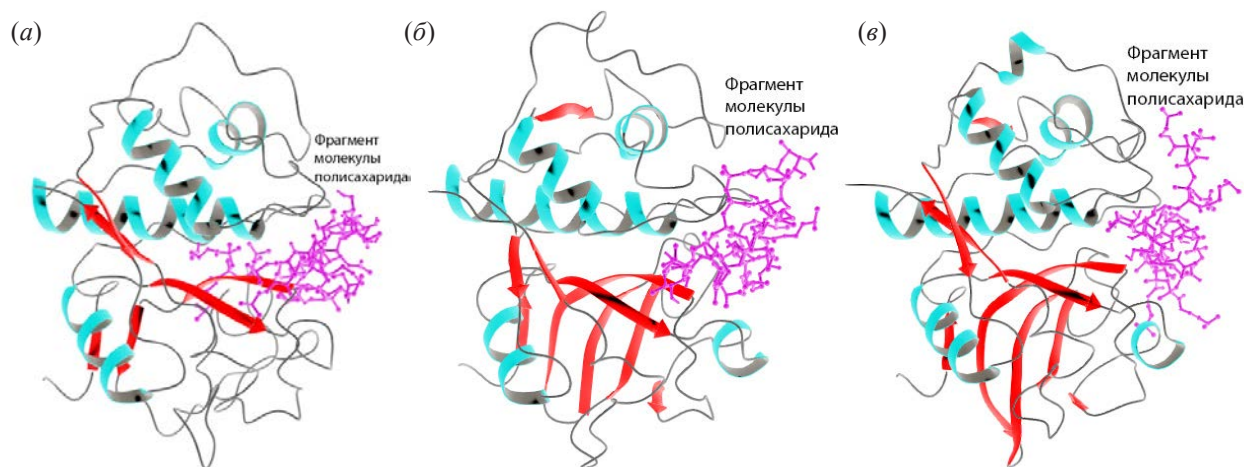


Рис. 3. Топология комплексов бромелина (а), папаина (б) и фицина (в) с привитым сополимером хитозана и поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилата, рассчитанная методом гибкого молекулярного докинга. Фрагмент молекулы привитого сополимера хитозана и поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилата обозначен розовым цветом. α -Спиральные фрагменты молекулы фермента, входящие в состав преимущественно L-домена, обозначены бирюзовым цветом. Красным цветом выделены β -складчатые области, преобладающие в составе R-домена. На стыке L- и R-доменов образуется углубление (каталитический карман), содержащее активный центр фермента.

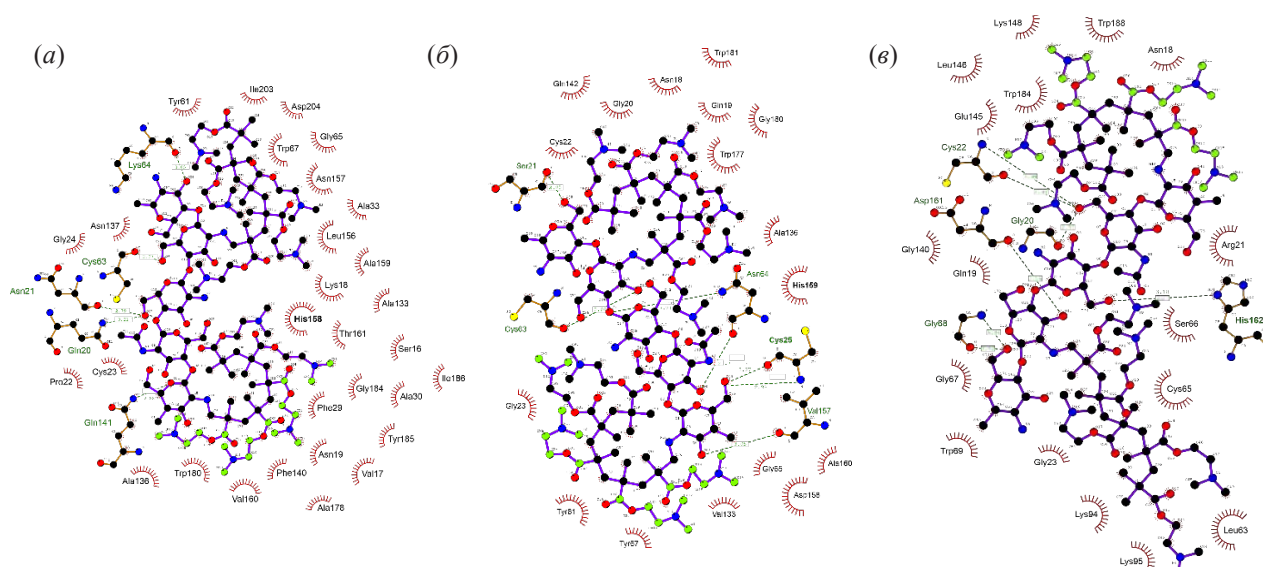


Рис. 4. Связи и взаимодействия между бромелином (а), папаином (б) и фицином (в) и привитым сополимером хитозана и поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилата (пунктирными линиями обозначены водородные связи, длина связей приведена в ангстремах). Каталитически значимые остатки выделены полужирным шрифтом.

то время как для бромелина и папаина эти значения ниже – 8.43 и 8.75 соответственно [18]. Таким образом, в случае комплексообразования в среде со значением pH, равным изоэлектрической точке фицина, снижается вклад электростатических сил во взаимодействие между ферментом и полисахаридом, что отражается на итоговом содержании белка в комплексе.

Хорошо известно, что комплексообразование способствует стабилизации каталитической активности ферментов. Поэтому на заключительном

этапе исследования мы оценили сохранение каталитической активности полученных продуктов при инкубации при 37°C в Tris-HCl-буфере (pH 7.5) в течение 21 сут. Выбор параметров инкубации был обусловлен тем, что они соответствуют физиологическим условиям раневого поражения мягких тканей – одной из самых вероятных сфер применения полученных комплексов. На рис. 5 представлены зависимости степени сохранения каталитической активности комплексов и растворов ферментов от времени. Как ожидалось,

Таблица 2. Аминокислотные остатки ферментов, формирующие связи и взаимодействия с привитым сополимером хитозана и поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилата

Аффинность, ккал/моль	Аминокислотные остатки, образующие	
	Н-связи (длина, Å)	прочие взаимодействия
Бромелин		
–6.3	Gln20 (3.31) Asn21 (2.79) Cys63 (2.97) Lys64 (3.05) Gln141 (2.88)	Ser16, Val17, Lys18, Asn19, Asn21, Pro22, Cys23, Gly24, Phe29, Ala30, Ala33, Tyr61, Cys63, Lys64, Gly65, Trp67, Ala133, Ala136, Asn137, Phe140, Gln141, Leu156, Asn157, His158 , Ala159, Val160, Thr161, Ala178, Trp180, Gly184, Tyr185, Ile203, Asp204
Папаин		
–4.5	Ser21 (2.93) Cys25 (2.98 и 3.27) Cys63 (3.09) Asn64 (3.21 и 2.77) Val157 (3.05)	Asn18, Gln19, Gly20, Ser21, Cys22, Gly23, Cys25, Tyr61, Cys63, Asn64, Gly65, Tyr67, Val133, Ala136, Gln142, Asp158, Val157, His159 , Ala160, Gly180, Trp177, Trp181
Фицин		
–4.5	Gly20 (2.75) Cys22 (2.91 и 3.09) Gly68 (3.26 и 2.92) Asp161 (2.89) His162 (3.18)	Asn18, Gln19, Gly20, Asn18, Arg21, Cys22, Gly23, Leu63, Cys65, Ser66, Gly67, Gly68, Trp69, Lys94, Lys95, Gly140, Glu145, Leu146, Lys148, Asp161, His162 , Trp184, Trp188

Примечание: полужирным шрифтом выделены каталитически значимые аминокислотные остатки.

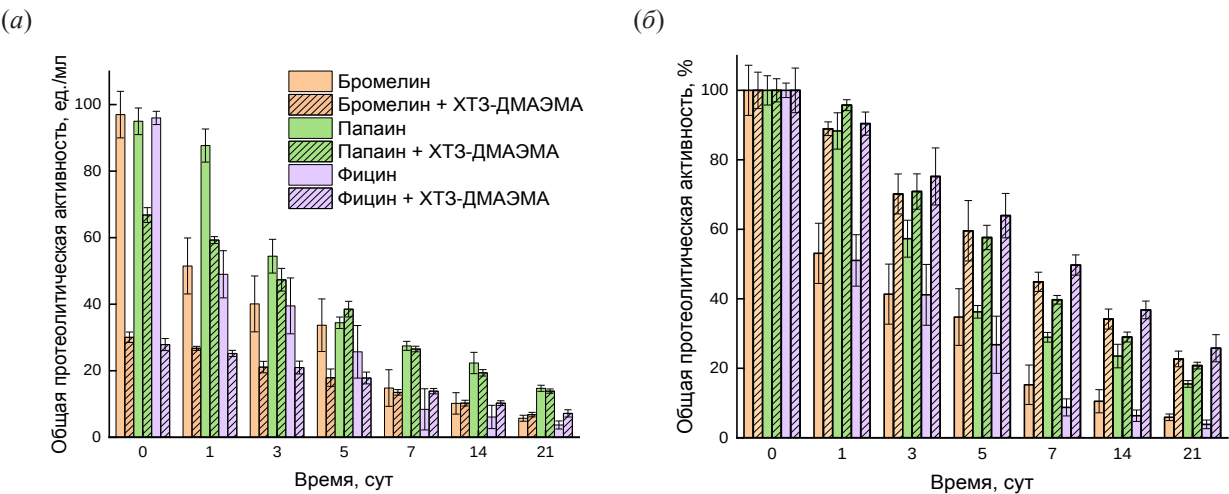


Рис. 5. Остаточная каталитическая активность ферментов после инкубации образцов при 37°C: в ед./мл раствора (а) и в процентах от первоначального уровня (б). Легенда для обеих диаграмм приведена на рис. 5а.

стабильность комплексов ферментов превышает стабильность их нативной формы: уже на первые сутки инкубации активность свободных фицина и бромелина не превышает 53%, а для комплексов эта величина достигает 90%. На третьи сутки активность комплекса папаина составляет 71%, а фермента в растворе – 57%. На пятые сутки

инкубации активность свободных цистеиновых протеаз не превышает 36% от начальной, в то время как комплексы с привитым сополимером сохраняют до 64% активности. На 21-е сутки активность свободных бромелина, папаина и фицина составляет не более 16%, для комплексов эта величина достигает 26%.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования и материалы. В работе использовали коммерческие ферменты бромелин (B4882), папаин (P4762) и фицин (F4165), в качестве субстрата для гидролиза – азоказеин (A2765), все производства Sigma Aldrich (Германия). Для синтеза привитого сополимера ХТЗ-ДМАЭМА применяли хитозан с молекулярной массой 350 кДа и степенью деацетилирования 0.85 (Биопрогресс, Россия) и мономер *N,N*-диметиламиноэтилметакрилат (Sigma Aldrich, Германия). Мономер очищали вакуумной дистилляцией непосредственно перед синтезом и характеризовали следующими параметрами: $T_{\text{кип}} = 62\text{--}65^\circ\text{C}/11$ мм рт. ст., $n_D^{20} = 1.4395$.

Синтез ХТЗ-ДМАЭМА и анализ его характеристик. Гraft-сополимер хитозана и поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилата получали по следующей методике: навеску хитозана массой 0.5 г вносили в термостатируемый реактор, снабженный перемешивающим устройством, и растворяли в 85 мл 2%-ного раствора уксусной кислоты, после чего добавляли 2.67 мл *N,N*-диметиламиноэтилметакрилата. Полученную смесь дегазировали трехкратным повторением циклов замораживание–вакуумирование–оттаивание, затем вносили под током аргона иницирующую смесь, состоящую из 0.05 г персульфата калия и 0.04 г метабисульфата натрия. Синтез проводили в течение 18 ч при 40°C . По завершении времени процесса реакцию массу нейтрализовали 10%-ным водным раствором NaOH (Вектон, Россия) до pH ~ 7 , продукт осаждали в ацетон (Вектон, Россия), после чего центрифугировали, осадок собирали, растворяли в 50 мл дистиллированной воды и диализовали против дистиллированной воды через мембрану из регенерированной целлюлозы (размер пор 10 кДа) в течение трех суток для очистки продуктов от гомополимера и прочих примесей. Выделяли полимер путем лиофильной сушки до постоянной массы.

Конверсия мономера (K) была определена как разность масс продукта реакции до очистки m_1 (г) и исходного хитозана m_{cht} (г), отнесенная к массе исходного мономера m_{mon} (г):

$$K = \frac{m_1 - m_{\text{cht}}}{m_{\text{mon}}} \times 100. \quad (1)$$

Эффективность прививки (ЭП) определяли как разность масс очищенного продукта реакции (m_2 , г) и используемого хитозана (m_{cht} , г), отнесенную к массе загруженного *N,N*-диметиламиноэтилметакрилата (m_{mon} , г) [11, 13]:

$$\text{ЭП} = \frac{m_2 - m_{\text{cht}}}{m_{\text{mon}}}. \quad (2)$$

Состав сополимера для последующего расчета частоты прививки определяли из данных ИК-спектроскопии путем соотнесения площадей под полосами поглощения при 1730 см^{-1} ($\nu\text{C=O}$ остатков ДМАЭМА) и при 1153 см^{-1} , отвечающей колебаниям гликозидной связи хитозана. ИК-спектр образца, представляющего собой сухой тонкодисперсный порошок, регистрировали на ИК-спектрометре IRAffinity1 (Shimadzu Scientific Instruments, Япония), оснащенном приставкой НПВО с призмой из селенида цинка, спектральное разрешение – 4 см^{-1} . Твердый образец помещали на поверхность призмы НПВО и термостатировали при 25°C . Регистрировали 128 спектров в диапазоне от 4000 до 700 см^{-1} с последующим усреднением.

Частоту прививки (ЧП), выраженную как число привитых полимерных цепей (ППЦ) на одно гликозидное кольцо (ГК) основной цепи, рассчитывали по формуле [11, 13]:

$$\text{ЧП} = \frac{\text{ППЦ, \% масс.}}{M_w \text{ ППЦ}} \times \frac{M \text{ ГК}}{\text{ПС, \% масс.}}, \quad (3)$$

где ППЦ, % масс. – содержание привитых цепей в сополимере; M_w ППЦ – средневесовая молекулярная масса привитых цепей; M ГК – молярная масса гликозидного кольца хитозана с учетом степени деацетилирования; ПС, % масс. – содержание полисахарида в сополимере.

Для определения молекулярной массы привитых цепей поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилата привитой сополимер растворяли в 250 мл 0.1 N раствора NaNO_2 , добавляли эквимольное количество 0.1 N раствора HCl, выдерживали в течение суток при комнатной температуре. Затем смесь осаждали в ацетон, осадок выделяли центрифугированием и сушили в вакуумном сушильном шкафу при $50 \pm 2^\circ\text{C}$ до постоянной массы.

Молекулярную массу (M_w) определяли методом гель-проникающей хроматографии на хроматографе Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, США), оснащенном изократическим насосом, рефрактометрическим детектором и колонкой PLmixC. Для этого готовили раствор выделенного полимера в *N*-метилпирролидоне с концентрацией 1 мл/г. В качестве элюента использовали 0.03 M LiCl в *N*-метилпирролидоне при 50°C , скорость потока составляла 0.5 мл/мин, объем вводимой пробы – 20 мкл. Калибровку проводили по узкодисперсным образцам полистирола.

Получение комплексов белок–полисахарид. Комплексообразование ферментов с полученным

сополимером осуществляли по следующей методике: к 0.5 г сополимера добавляли 10 мл раствора фермента (в концентрации 2 мг/мл в глициновом буфере, pH 9.0), инкубировали в течение 2 ч. После окончания инкубации образовавшийся осадок (в виде геля) промывали 50 mM Tris-HCl-буфером (pH 7.5) до отсутствия в промывных водах белка, контроль осуществляли на спектрофотометре СФ-2000 (Спектр, Россия) при $\lambda = 280$ нм [19].

Содержание белка в комплексах белок–полисахарид и их протеолитическая активность. Содержание белка в полученных комплексах определяли методом Лоури [20] со следующей модификацией: на первом этапе анализа разрушали связи между полисахаридом и молекулами ферментов [21, 22]. Для этого комплексы обрабатывали раствором K₂Na-тартрата (в концентрации 20 мг/мл или 0.7 М), приготовленным на 1 М NaOH, при 50°C в течение 10 мин. Отсутствие процессов разрушения фермента контролировали путем регистрации и анализа его спектра поглощения на спектрофотометре UV-2550PC (Shimadzu Scientific Instruments, Япония).

Протеолитическую активность фермента оценивали на субстрате азоказеине [23]. К 50 мг образца добавляли 200 мкл Tris-HCl-буфера (pH 7.5), 800 мкл азоказеина (0.5% в 50 mM Tris-HCl-буфере, pH 7.5) и инкубировали 2 ч при 37°C. Далее добавляли 800 мкл 5%-ного водного раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ), 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 10-мм 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 азоказеина (в мг белка), которое в условиях эксперимента гидролизует 1 мкмоль комплекса за 1 мин.

Статистическую значимость различий величин контрольных и опытных показателей определяли по *t*-критерию Стьюдента (при $p < 0.05$), поскольку все показатели характеризовались нормальным распределением.

Молекулярный докинг. Гибкий молекулярный докинг цистеиновых протеаз и сополимера ХТЗ-ДМАЭМА проводили в программном пакете AutoDock Vina (<https://sourceforge.net/projects/autodock-vina-1-1-2-64-bit/>) с использованием трехмерных структур бромелина (PDB ID: 1W0Q,

<https://www.rcsb.org/structure/1W0Q>), папаина (PDB ID: 9PAP, <https://www.rcsb.org/structure/9PAP>) и фицина (PDB ID: 4YYW, <https://www.rcsb.org/structure/4YYW>). Подготовку модели структуры фермента и оптимизацию матрицы полимера-носителя проводили, как описано нами ранее [24]. Структурную модель привитого сополимера строили в молекулярном конструкторе HyperChem (<http://www.hypercubeusa.com/>), после чего ее последовательно оптимизировали сначала в силовом поле AMBER, а затем квантово-химически параметрическим методом РМ3. Лиганд в расчетах обладал максимальной конформационной свободой: допускалось вращение функциональных групп вокруг всех одинарных связей. Расстановку заряда на молекуле носителя и его протонирование/депротонирование осуществляли автоматически в программном пакете MGLTools 1.5.6 (<https://ccsb.scripps.edu/mgltools/1-5-6/>).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены комплексы бромелина, папаина и фицина с привитым сополимером хитозана и поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилата. Установлено, что эти объекты характеризуются меньшей протеазной активностью по сравнению с нативными формами ферментов. Причина этого заключается в расположении молекул полисахаридов в каталитическом кармане глобул ферментов и взаимодействии с каталитически значимыми аминокислотными остатками. В результате комплексообразования активный центр цистеиновых протеаз экранируется от субстрата, что затрудняет процесс катализа. Полученные комплексы более стабильны по сравнению с нативными ферментами и сохраняют до 26% протеазной активности после 21 сут инкубации при 37°C в Tris-HCl-буфере (pH 7.5).

Таким образом, полученные комплексы – перспективные кандидаты для разработки средств по уходу за раневыми поражениями мягких тканей ввиду своей повышенной стабильности в физиологических условиях.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-20053).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sharaf A., Muthayya P. // *Burns*. 2022. V. 48. P. 1618–1625.
<https://doi.org/10.1016/j.burns.2021.12.004>
2. Wen J., Johnson K., O'Boyle C. // *Burns*. 2022. V. 48. P. 1706–1709.
<https://doi.org/10.1016/j.burns.2022.02.008>
3. Kusumasari C., Abdou A., Nakajima M., Tagami J. // *J. Dent*. 2021. V. 109. P. 103665.
<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2021.103665>
4. Maashi M.S., Elkhodary H.M., Alamoudi N.M., Bamashmous N.O. // *Saudi Dent. J.* 2023. V. 35. P. 233–243.
<https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2023.01.010>
5. Baidamshina D.R., Koroleva V.A., Trizina E. Yu., Pankova S.M., Agafonova M.N., Chirkova M.N., Vasileva O.S., Akhmetov N., Shubina V.V., Porfiryev A.G., Semenova E.V., Sachenkov O.A., Bogachev M.I., Artyukhov V.G., Baltina T.V., Holyavka M.G., Kayumov A.R. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 164. P. 4205–4217.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.030>
6. Holyavka M.G., Goncharova S.S., Sorokin A.V., Lavlinskaya M.S., Redko Y.A., Faizullin D.A., Baidamshina D.R., Zuev Y.F., Kondratyev M.S., Kayumov A.R., Artyukhov V.G. // *Polymers*. 2022. V. 14. P. 5110.
<https://doi.org/10.3390/polym14235110>
7. dos Anjos M.M., da Silva A.A., de Pascoli I.C., Graton Mikcha J.M., Machinski M., Peralta R.M., de Abreu Filho B.A. // *Int. J. Food Microbiol.* 2016. V. 216. P. 121–126.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.007>
8. Hasannasab M., Nourmohammadi J., Dehghan M.M., Ghaee A. // *Int. J. Pharm.* 2021. V. 610. P. 121227.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121227>
9. Fernandez-Lucas J., Castaneda D., Hormigo D. // *Trends Food Sci. Technol.* 2017. V. 68. P. 91–101.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.017>
10. Liu H., Wang C., Zou S., Wei Z., Tong Z. // *Langmuir*. 2012. V. 28. P. 11017–11024.
<https://doi.org/10.1021/la3021113>
11. Bhattacharya A., Misra B.N. // *Progress Polym. Sci.* 2004. V. 2009. P. 767–814.
<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2004.05.00>
12. Messina M., Bhattacharya A., Montgomery H., Maynard H. // *Progress Polym. Sci.* 2020. V. 100. P. 10186.
<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2019.101186>
13. Sorokin A.V., Kuznetsov V.A., Lavlinskaya M.S. // *Polymer Bulletin*. 2021. V. 78. P. 2975–2992.
<https://doi.org/10.1007/s00289-020-03250-z>
14. Kuznetsov V.A., Sorokin A.V., Lavlinskaya M.S., Sinelnikov A.A., Bykovskiy D.V. // *Polymer Bulletin*. 2019. V. 76. P. 4929–4949.
<https://doi.org/10.1007/s00289-018-2635-0>
15. Shatalov G.V., Lavlinskaya M.S., Pakhomova O.A., Mokshina N.Ya., Kuznetsov V.A. // *Russ. J. Appl. Chem.* 2016. V. 89. P. 140–146.
<https://doi.org/10.1134/S1070427216010225>
16. Kuznetsov V.A., Lavlinskaya M.S., Ostankova I.V., Shatalov G.V., Shikhaliev Kh.S., Ryzhkova E.A. // *Polymer Bulletin*. 2018. V. 75. P. 1237–1251.
<https://doi.org/10.1007/s00289-017-2091-2>
17. Beveridge A.J. // *Protein Sci.* 1996. V. 5. P. 1355–1365.
<https://doi.org/10.1002/pro.5560050714>
18. Handbook of Proteolytic Enzymes. 3rd Edn. / Eds. Rawlings N.D., Salvesen G. New York: Acad. Press, 2013. 3932 p.
19. Sorokin A.V., Olshannikova S.S., Lavlinskaya M.S., Holyavka M.G., Faizullin, D.A., Zuev Y.F., Artukhov V.G. // *Polymers*. 2022. V. 14. P. 2279.
<https://doi.org/10.3390/polym14112279>
20. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Faar A.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265–275.
21. Sorokin A.V., Goncharova S.S., Lavlinskaya M.S., Holyavka M.G., Faizullin, D.A., Zuev Y.F., Kondratyev M.S., Artyukhov V.G. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 11246.
<https://doi.org/10.3390/ijms241411246>
22. Sorokin A.V., Goncharova S.S., Lavlinskaya M.S., Holyavka M.G., Faizullin D.A., Kondratyev M.S., Kannykin S.V., Zuev Y.F., Artyukhov V.G. // *Polymers*. 2023. V. 15. P. 649.
<https://doi.org/10.3390/polym15030649>
23. 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>
24. Абдуллатыпов А.В., Кондратьев М.С., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. // *Биофизика*. 2016. Т. 61. № 4. С. 669–676.

Structural and Functional Features of Protein-Polysaccharide Complexes Based on Cysteine Proteases and Hydrophilically Modified Chitosan

**M. S. Lavlinskaya*, A. V. Sorokin*, S. S. Goncharova*,
M. G. Holyavka*, **, #, M. S. Kondratyev*, ***, and V. G. Artyukhov***

Phone: +7 (473) 220-85-86; e-mail: holyavka@rambler.ru

** Voronezh State University, Universitetskaya Ploshchad 1, Voronezh, 394018 Russia*

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

**** Institute of Cell Biophysics of the RAS, Institutskaya ul. 3, Pushchino, 142290 Russia*

In this work, complexes of cysteine proteases, namely bromelain, papain and ficin, with a graft copolymer of chitosan and poly(*N,N*-dimethyl amino ethyl methacrylate) were obtained. It was determined that the enzyme catalytic activity in the complexes is reduced compared to their native forms. The results of molecular docking showed that modified polysaccharide located in the catalytic pocket of cysteine proteases globules. The resulting complexes have increased stability when stored under physiological conditions, which makes them promising candidates for use in the development of treatments for wounds.

Keywords: bromelain, papain, ficin, complexation, catalytic activity, enzyme stability



УДК 577.113.4

ПОДХОД К ПОЛУЧЕНИЮ ЦИКЛИЧЕСКИХ ФОТОРАСЩЕПЛЯЕМЫХ РНК ДЛЯ ФОТОАКТИВИРУЕМОЙ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9

© 2024 г. Е. В. Иванская*, **, М. И. Мещанинова*, М. А. Воробьева*,
Д. О. Жарков*, **, Д. С. Новопашина *, **, #

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

** Новосибирский государственный университет, Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 1

Поступила в редакцию 15.11.2023 г.

После доработки 20.11.2023 г.

Принята к публикации 21.11.2023 г.

Создание управляемых систем редактирования генома на основе технологии CRISPR/Cas – актуальная задача современной молекулярной биологии и генетической инженерии. Интересный вариант ее решения – модификация направляющих РНК путем введения фоточувствительных групп. Мы разработали подход к получению циклических фоторасщепляемых направляющих CRISPR РНК (сгРНК) для системы CRISPR/Cas9, содержащих линкеры на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола (PL). В циклизованном состоянии такие направляющие РНК нефункциональны, а при облучении УФ-светом они линейризуются, индуцируя активацию системы CRISPR/Cas9. Опробованы два химических подхода к образованию циклической РНК на основе реакции Михаэля (тиол-малеимидная конденсация) и медь-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения (реакция “клик”-химии). Для этого получены 5',3'-модифицированные РНК, содержащие соответствующие реакционные группы. Продемонстрировано преимущество реакции азид-алкинового циклоприсоединения для получения циклических РНК. Эффективность образования циклических РНК зависит от их вторичной структуры и возможности сближения реакционных групп в пространстве. Получены серии фоторасщепляемых циклических сгРНК и их контрольных нерасщепляемых аналогов. Показано, что циклические направляющие сгРНК менее эффективно направляют нуклеазу Cas9 для расщепления плазмиды, при этом линейризация фоторасщепляемых циклических сгРНК значительно увеличивает эффективность расщепления плазмиды. Разработанный подход позволяет получать циклические фоторасщепляемые РНК, в том числе направляющие РНК для активации геномного редактирования CRISPR/Cas9 в заданный момент времени в определенном месте. Фоторегуляция геномного редактирования позволит снизить нежелательные нецелевые эффекты и проводить редактирование более прицельно.

Ключевые слова: циклические РНК, регулируемая система CRISPR/Cas9, УФ-облучение, направляющие сгРНК, фоторасщепляемый линкер

DOI: 10.31857/S0132342324050051, **EDN:** LRJNBW

ВВЕДЕНИЕ

Система CRISPR/Cas9 за последние годы превратилась в мощный инструмент для редактирования генов *in vivo* [1–3]. Эффекторные комплексы нуклеазы Cas9 с единой направляющей РНК

(сгРНК) или парой CRISPR-РНК и *транс*-активирующей CRISPR-РНК (сгРНК/*trans*сгРНК) вносят двуцепочечные разрывы в определенные последовательности ДНК. Разработка подходов к контролируемому редактированию генов, в частности к контролируемому включению и

Сокращения: CRISPR – регулярно расположенные кластеры коротких палиндромных повторов (clustered regularly interspaced short palindromic repeats); сгРНК – CRISPR РНК; PAM – мотив, прилегающий к протоспейсеру (protospacer adjacent motif); PL – 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиол; сгРНК – единая направляющая рибонуклеиновая кислота (single guide RNA); *trans*сгРНК – *транс*-активирующая сгРНК (*trans*-activating crRNA); CuAAC – азид-алкиновое циклоприсоединение, катализируемое медью; SPAAC – азид-алкиновое циклоприсоединение, промотируемое напряжением цикла (strain-promoted azide-alkyne cycloaddition).

Автор для связи: (тел.: +7 (383) 363-51-29; эл. почта: danov@niboch.nsc.ru).

выключению системы CRISPR/Cas9, входит в число самых актуальных задач синтетической биологии и биоорганической химии [4].

Введение фотоактивируемых структур в состав олигонуклеотидных конструкций дает возможность контроля их активности [5, 6]. Развитие химического синтеза модифицированных фоточувствительными группами олигонуклеотидов стимулировало создание и интенсивное изучение молекулярно-биологических систем с использованием так называемых фотоблокированных (caged, photocaged) конструкций, которые могут быть активированы путем облучения светом [7–10].

Цель данной работы заключалась в получении циклических (замкнутых) направляющих РНК для системы CRISPR/Cas9, содержащих фоторасщепляемый линкер. Такие направляющие РНК должны быть неактивны вплоть до облучения, а в результате облучения расщепление фотолинкера должно вызывать переход направляющей РНК в линейную форму и активацию системы геномного редактирования (рис. 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время в литературе описаны как химические, так и ферментативные подходы к получению циклических (замкнутых) нуклеиновых кислот (НК) [11, 12], возможно также применение комбинированных химико-ферментативных подходов. Для ферментативной циклизации часто используют реакции лигирования [13] или сплайсинга с применением каталитически

активных интронов группы I [14]. Однако такие ферментативные методы дорогостоящи и неприменимы для крупномасштабного синтеза кольцевых НК. Химические методы используют в основном для синтеза малых и средних циклических НК (до 80 нт). Для получения циклических нуклеиновых кислот химическими методами применяют медь-катализируемое азид-алкиновое циклоприсоединение (CuAAC, метод “клик”-химии) [3, 15, 16], в том числе стимулированное напряжением цикла (strain-promoted azide-alkyne cycloaddition) [17], тиол-малеимидную конденсацию (реакция Михаэля) [18], реакцию взаимодействия галогенов с тиольными группировками [19–21] и другие методы [11, 22].

Для осуществления циклизации олигонуклеотидов нами были выбраны два метода химического лигирования: тиол-малеимидная конденсация и медь-катализируемое азид-алкиновое циклоприсоединение (CuAAC).

Получение исходных 3',5'-модифицированных олигорибонуклеотидов для циклизации. На первом этапе проводили синтез серий crРНК длиной 42, 46 и 48 нт, содержащих 20-звенный фрагмент, комплементарный протоспейсеру в ДНК-мишени. Дизайн crРНК длиной 46 и 48 нт был осуществлен путем удлинения исходной последовательности crРНК с добавлением, соответственно, 4 и 6 дополнительных нуклеотидов на 3'-конец для формирования внутримолекулярной шпильки. Для химического лигирования концов РНК методом CuAAC необходимо было получить

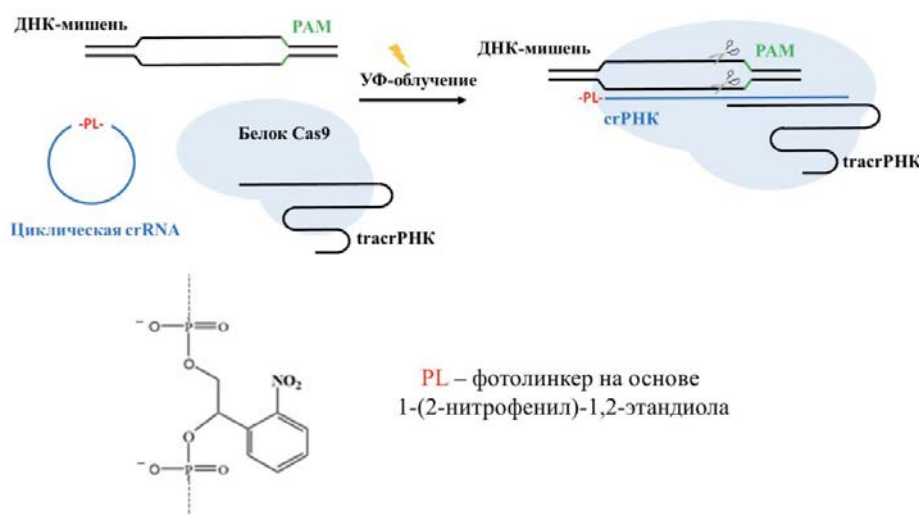


Рис. 1. Предлагаемая в работе стратегия функционирования фоторегулируемой системы CRISPR/Cas9 с использованием циклических фотоблокированных crРНК. PAM – мотив, прилегающий к протоспейсеру (protospacer adjacent motif).

РНК, содержащие алкиновую и азидную группы на противоположных концах олигонуклеотидной цепи.

Введение алкиновой группы на 3'-конец олигорибонуклеотида во время твердофазного синтеза осуществляли с использованием специального полимерного носителя. На последней стадии твердофазного синтеза на 5'-конец олигонуклеотида вводили аминогексанольный линкер. После деблокирования получали линейные олигорибонуклеотиды с алкиновыми группами на 3'-конце и амиолинкером на 5'-конце для последующего введения азидной группы (табл. 1).

Для получения фотомодифицированных олигорибонуклеотидов в ходе твердофазного синтеза вводили один или два фоторасщепляемых линкера (PL) с использованием специально синтезированного амидофосфита на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола, полученного по аналогии с работами [23, 24]. Необходимо отметить, что введение второго фотолинкера в олигонуклеотиды длиной 46 и 48 нт между

добавленными нуклеотидами и основной последовательностью сгРНК дает возможность удалить введенные в сгРНК дополнительные нуклеотиды с образованием исходной 42-звенной сгРНК.

Введение азидогруппы на 5'-конец аминомодифицированных олигорибонуклеотидов проводили путем взаимодействия 5'-концевой аминогруппы с *N*-оксисукцинимидным эфиром азидбутановой кислоты (схема 1).

Таким образом получили серию олигорибонуклеотидов, содержащих азидогруппу на 5'-конце и алкиновую группировку на 3'-конце. Во всех случаях реакция проходила количественно, и для циклизации на следующей стадии использовали 5',3'-модифицированные олигорибонуклеотиды без предварительного выделения.

Для циклизации методом тиол-малеимидной конденсации были получены РНК, содержащие тиольную и малеимидную группы на 3'- и 5'-концах олигонуклеотидной цепи. Синтез таких РНК осуществляли, используя иммобилизованную на полимерном носителе 3'-аминомодифи-

Таблица 1. Последовательности модифицированных сгРНК, использованных в работе

Шифр РНК*	Последовательность (5'→3')
C-42	5'-NH ₂ -(CH ₂) ₆ -AUAACUCAAUUUGUAAAAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG-3'-Alkyne
C-46	5'-NH ₂ -(CH ₂) ₆ -AUAACUCAAUUUGUAAAAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUGUUAU-3'-Alkyne
C-48	5'-NH ₂ -(CH ₂) ₆ -AUAACUCAAUUUGUAAAAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUGAGUUAU-3'-Alkyne
C-42-P1	5'-NH ₂ -(CH ₂) ₆ -PL-AUAACUCAAUUUGUAAAAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG-3'-Alkyne
C-46-P1	5'-NH ₂ -(CH ₂) ₆ -PL-AUAACUCAAUUUGUAAAAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUGUUAU-3'-Alkyne
C-46-P2	5'-NH ₂ -(CH ₂) ₆ -PL-AUAACUCAAUUUGUAAAAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG-PL-UUAU-3'-Alkyne
C-48-P1	5'-NH ₂ -(CH ₂) ₆ -PL-AUAACUCAAUUUGUAAAAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUGAGUUAU-3'-Alkyne
C-48-P2	5'-NH ₂ -(CH ₂) ₆ -PL-AUAACUCAAUUUGUAAAAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG-PL-AGUUAU-3'-Alkyne
C-42-SS-NH ₂	5'-NH ₂ -(CH ₂) ₂ -S-S-(CH ₂) ₂ -NH-PL-AUAACUCAAUUUGUAAAAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG-(CH ₂) ₆ NH ₂ -3'
сгРНК (контроль)	5'-AUAACUCAAUUUGUAAAAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG-3'
tracrРНК	5'-AACAGCAUAGCAAGUUAUAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG-GCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU-3'

Примечание: PL – фоторасщепляемый линкер на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола; Alkyne – 3'-концевая модификация, содержащая алкиновую группировку (схема 1).

* Цифровые коды 42, 46 и 48 соответствуют числу нуклеотидов в олигонуклеотидной последовательности; P1 – один PL-линкер; P2 – два PL-линкера в последовательности.

цированную, полностью защищенную РНК, которая содержала на 5'-конце фоторасщепляемый линкер и свободную гидроксильную группу. На первом этапе с использованием разработанного нами ранее подхода [25] вводили остаток цистамина на 5'-конец олигорибонуклеотида на твердой фазе путем активации гидроксильной группы N,N' -дисулцинимидилкарбонатом (ДСК) и последующего взаимодействия с аминогруппой цистамина (схема 2). В качестве основания в ходе реакции использовали пиридин. После проведения реакции носитель промывали и проводили де-

блокирование олигорибонуклеотида C-42-SS-NH₂ в стандартных условиях (табл. 1).

На втором этапе присоединяли остатки 3-малеимидопропановой кислоты по обеим аминогруппам олигорибонуклеотида C-42-SS-NH₂. Для этого в водно-органической среде проводили реакцию с пентафторфеноловым эфиром 3-малеимидопропановой кислоты по аналогии с работами [26, 27] (схема 3).

Затем дисульфидную связь восстанавливали с образованием сульфгидрильной группы (–SH) путем обработки 0.5 М раствором дитиотреитола (DTT). В результате получали олигорибонукле-

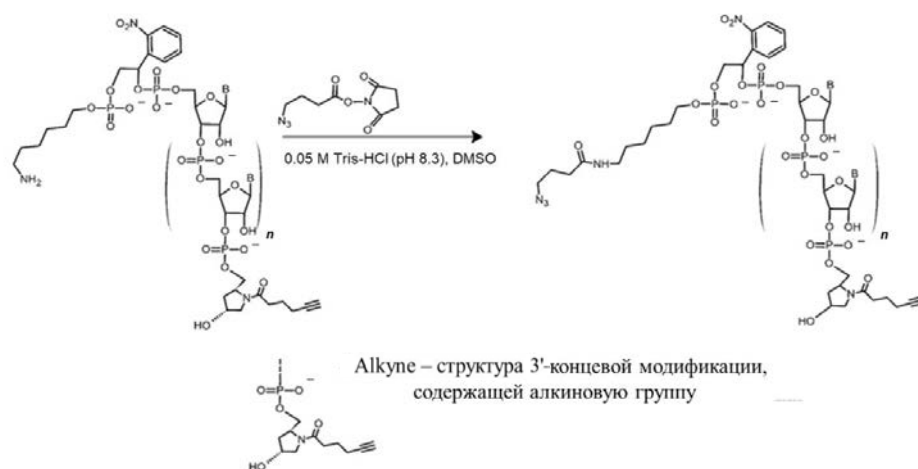


Схема 1. Введение азидогруппы на 5'-конец 3'-алкинмодифицированного олигорибонуклеотида.

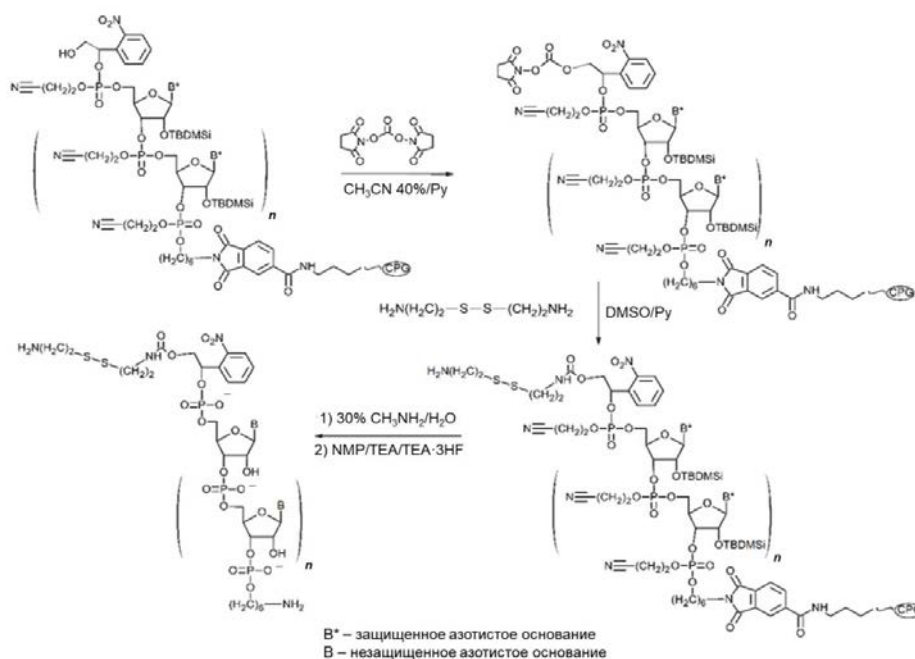


Схема 2. Получение олигорибонуклеотида, содержащего аминогруппу на 3'-конце и остаток цистамина на 5'-конце.

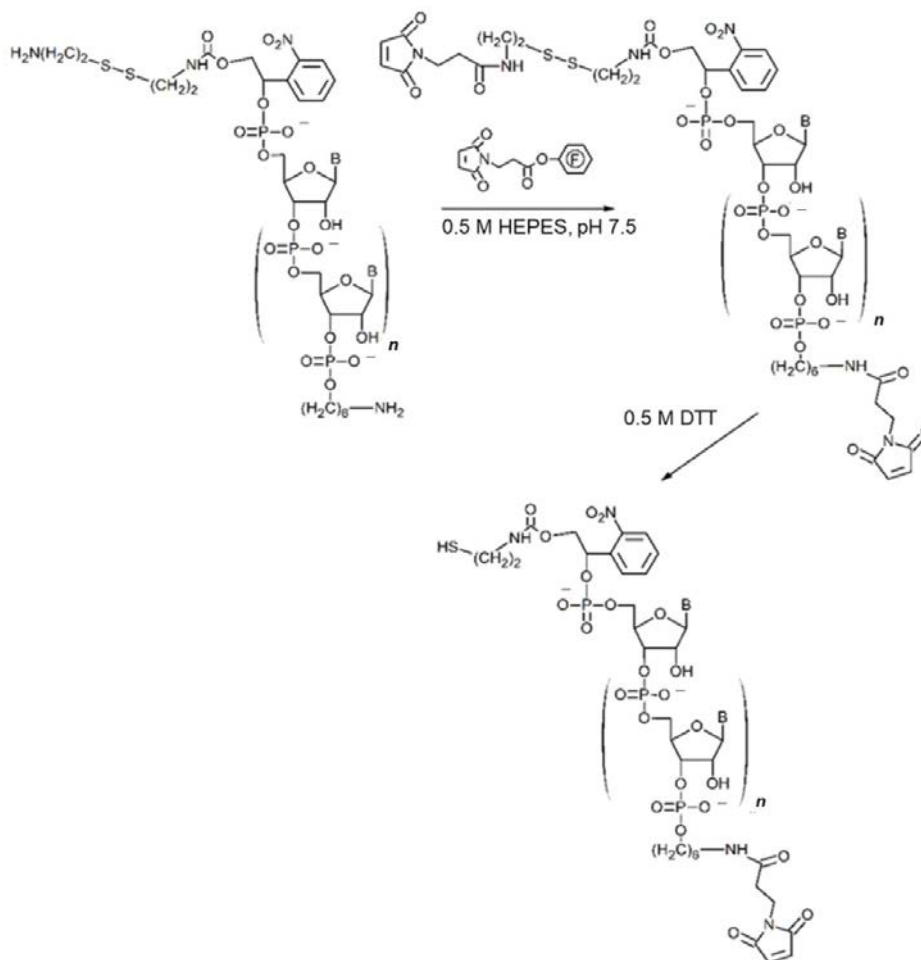


Схема 3. Получение олигорибонуклеотида, содержащего тиольную группу на 3'-конце и малеимидную группировку на 5'-конце.

отид, который содержал SH-группу на 5'-конце и малеимидную группу на 3'-конце. Реакционную смесь использовали для циклизации без проведения дополнительной очистки, т.к. в ней присутствовал единственный основной продукт реакции.

Получение циклических олигорибонуклеотидов. Для получения циклической РНК методом CuAAC использовали олигорибонуклеотиды, содержащие 3'-алкиновую и 5'-азидную группы. Реакцию проводили в водно-органической среде в присутствии Cu(I) (схема 4). Ход реакции контролировали с помощью аналитического электрофореза в денатурирующем ПААГ.

В результате реакции во всех случаях наблюдали образование продукта, обладающего меньшей электрофоретической подвижностью по сравнению с исходным олигорибонуклеотидом, который выделяли методом препаративного гелелектрофореза в денатурирующих условиях.

Циклизацию олигорибонуклеотида, содержащего 5'-тиольную группу и 3'-малеимидную группировку, проводили методом тиол-малеимидной конденсации. Реакцию осуществляли в буферных условиях при pH 7.5 (схема 5).

В результате реакции образовывался циклический продукт, обладающий меньшей подвижностью при электрофоретическом анализе реакционной смеси по сравнению с исходным олигорибонуклеотидом, а также побочный продукт, который по данным масс-спектрометрии соответствовал димеризации cгРНК с образованием дисульфидной связи. Образование аналогичного продукта наблюдали и при хранении 3',5'-модифицированного олигорибонуклеотида, содержащего 3'-SH-группу, в растворе в течение по крайней мере трех суток.

Для дальнейшей работы был выбран метод CuAAC, т.к. он включает меньшее количество

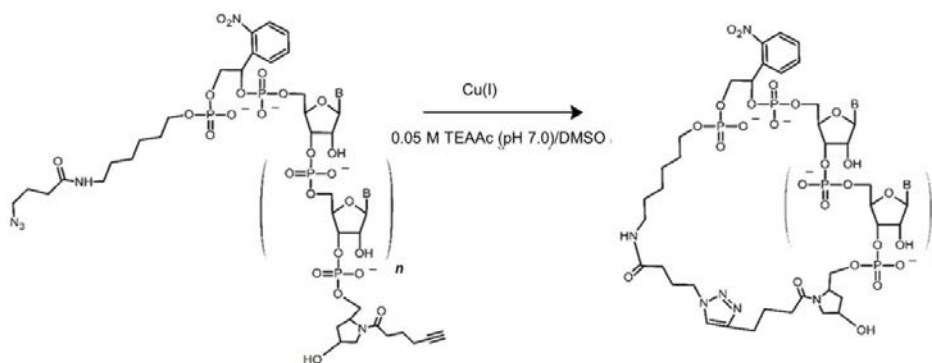


Схема 4. Синтез циклического олигорибонуклеотида методом азид-алкинового циклоприсоединения.

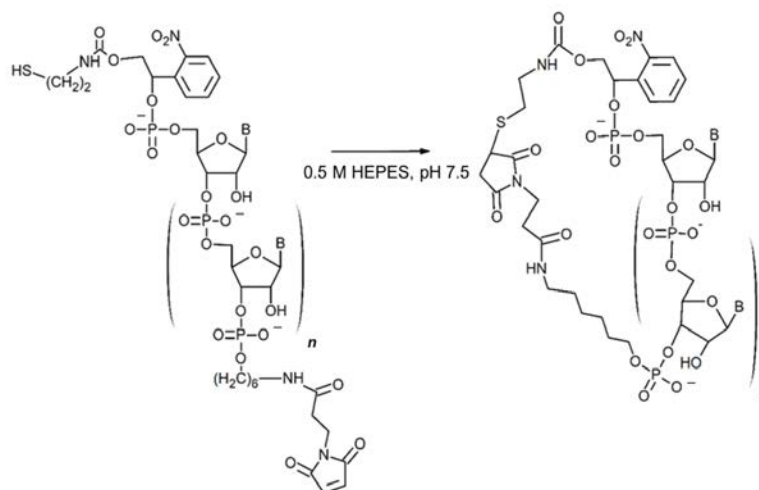


Схема 5. Синтез циклического олигорибонуклеотида методом тиол-малеимидной конденсации.

стадий и не приводит к образованию димеров сгРНК за счет формирования дисульфидной связи. Для получения циклических РНК использовали 42-звенную РНК, а также ее аналоги, содержащие на 3'-конце 4 или 6 дополнительных нуклеотидов для формирования шпильки со сближением 5'- и 3'-концов сгРНК (табл. 1, рис. 2).

Локализация фоторасщепляемых линкеров в молекуле РНК была выбрана таким образом, чтобы происходили линейаризация циклической РНК и выщепление дополнительных нуклеотидов с 3'-конца (только в варианте с двумя РL-линкерами) при облучении УФ-светом.

Анализ циклических РНК. Проводили анализ всех выделенных продуктов циклизации РНК с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (офВЭЖХ). Время удержания циклических продуктов при офВЭЖХ было больше, чем время

удержания исходных линейных олигонуклеотидов (рис. 3, табл. 2).

Таким образом, продукты циклизации сгРНК обладают меньшей электрофоретической подвижностью и демонстрируют большее время удерживания при офВЭЖХ. При анализе продуктов, образующихся в результате облучения циклических фоторасщепляемых РНК, методом денатурирующего гель-электрофореза наблюдали исчезновение полноразмерной циклической РНК и образование одного или двух фрагментов с более высокой электрофоретической подвижностью для РНК с одним или двумя фотолинкерами соответственно (рис. 4).

Эффективность системы CRISPR/Cas9 с участием синтезированных циклических сгРНК. Синтезированные циклические направляющие сгРНК исследовали в отношении способности направлять расщепление ДНК нуклеазой

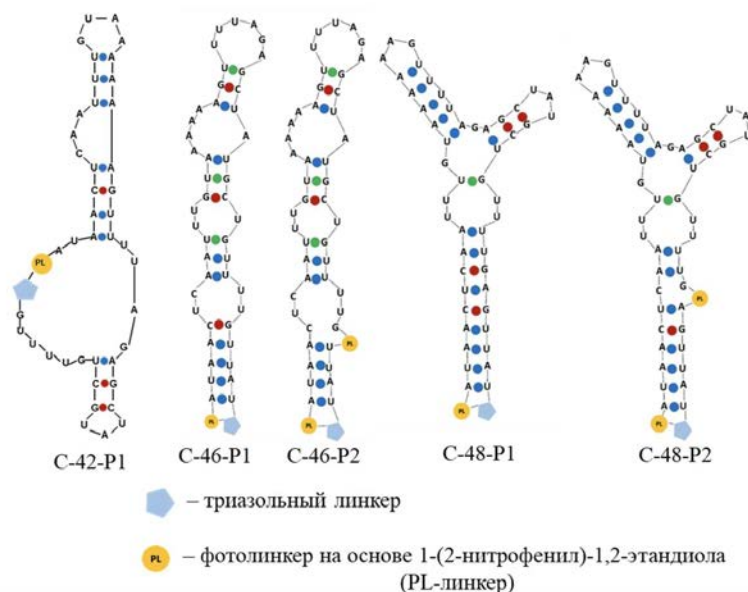


Рис. 2. Наиболее вероятные вторичные структуры циклических crРНК: C-42-P1, C-46-P1, C-46-P2, C-48-P1 и C-48-P2, полученные с помощью программы OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>).

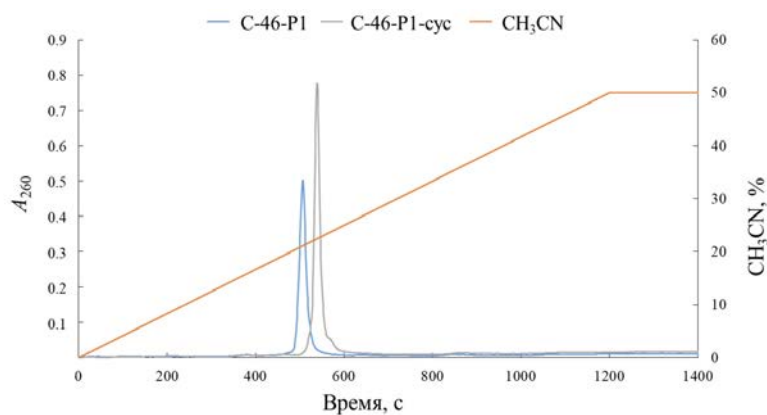


Рис. 3. Профиль офВЭЖХ выделенных продуктов циклизации, соответствующих исходному линейному олигонуклеотиду (голубой) и циклической crРНК (серый). Хроматографию проводили в градиенте концентрации 0–50% CH_3CN в 0.02 М триэтиламмонийацетате (pH 7.0). Время выхода пика циклического продукта C-46-P1-сус составило 571 с, исходного линейного 5',3'-модифицированного олигорибонуклеотида C-46-P1 – 539 с.

Cas9 *Streptococcus pyogenes* до и после облучения УФ-светом. Время облучения 30 мин было выбрано на основе ранее полученных результатов [23]. В качестве модельной последовательности ДНК-мишени использовали хорошо охарактеризованный спейсер Sp2, происходящий из CRISPR-области штамма *S. pyogenes* SF370, с примыкающим к протоспейсеру мотивом (PAM) TGG, необходимым для узнавания мишени [1, 28]. Проводили сравнение расщепления ДНК нуклеазой Cas9 в присутствии облученных и необлученных циклических РНК. Роль ДНК-мишени выполняла плазмида pBluescript II SK(–), в которую по

сайтам XhoI–EcoRI был клонирован 23-звенный фрагмент, состоящий из последовательности Sp2 и PAM. Собирали эффекторный комплекс из исследуемой облученной или необлученной циклической crРНК, химически синтезированной 74-звенной tracrРНК и белка Cas9, добавляли его к плазмиде (рис. 5).

Реакционные смеси анализировали в 1%-ном агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием. После облучения циклических фотомодифицированных crРНК регистрировали повышение степени расщепления модельной плазмиды (рис. 6). В присутствии необлученных

Таблица 2. Время удерживания линейных и циклических РНК при офВЭЖХ

Шифр РНК	Время удерживания при офВЭЖХ*, мин	
	циклическая форма	линейная форма (до циклизации)
C-42-P1	8.0	7.0
C-46-P1	9.5	9.0
C-46-P2	9.2	9.1
C-48-P1	9.5	8.9
C-48-P2	9.4	9.0

* Условия см. в разделе “Эксперим. часть”.

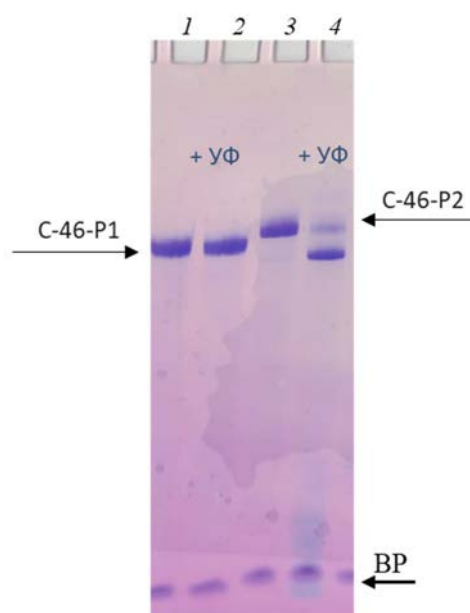


Рис. 4. Расщепление циклических РНК C-46-P1 и C-46-P2 под действием УФ-облучения. Электрофоретический анализ в 15%-ном денатурирующем ПААГ: 1 – циклический C-46-P1, 2 – УФ-облученный циклический C-46-P1, 3 – циклический C-46-P2, 4 – УФ-облученный циклический C-46-P2. Длина волны облучения – 365 нм, время облучения – 30 мин. Визуализацию РНК в геле проводили окрашиванием раствором красителя Stains-all. BP – бромфеноловый синий.

циклических sgРНК (C-46 и C-48) нуклеаза Cas9 была способна расщеплять ДНК-мишени, но глубина реакции при этом была значительно ниже, чем в присутствии контрольной линейной sgРНК.

До облучения циклических фоторасщепляемых sgРНК степень расщепления плазмиды нуклеазой Cas9 была значительно ниже, чем после линеаризации путем облучения светом. Эффективность расщепления плазмиды в присутствии линеаризованных sgРНК была близка к эффективности расщепления в присутствии немодифицированных sgРНК/tracrРНК. Отно-

сительно высокая эффективность расщепления плазмиды нуклеазой Cas9 в присутствии циклических фоторасщепляемых sgРНК до облучения может быть результатом необходимости использования в реакции достаточно высоких концентраций нуклеопротеинового комплекса Cas9/sРНК/tracrРНК в связи с низким числом оборотов фермента [29, 30]. С другой стороны, это может свидетельствовать о способности циклических sgРНК взаимодействовать с tracrРНК и белком Cas9 [5]. Эта возможность требует дальнейшего изучения.

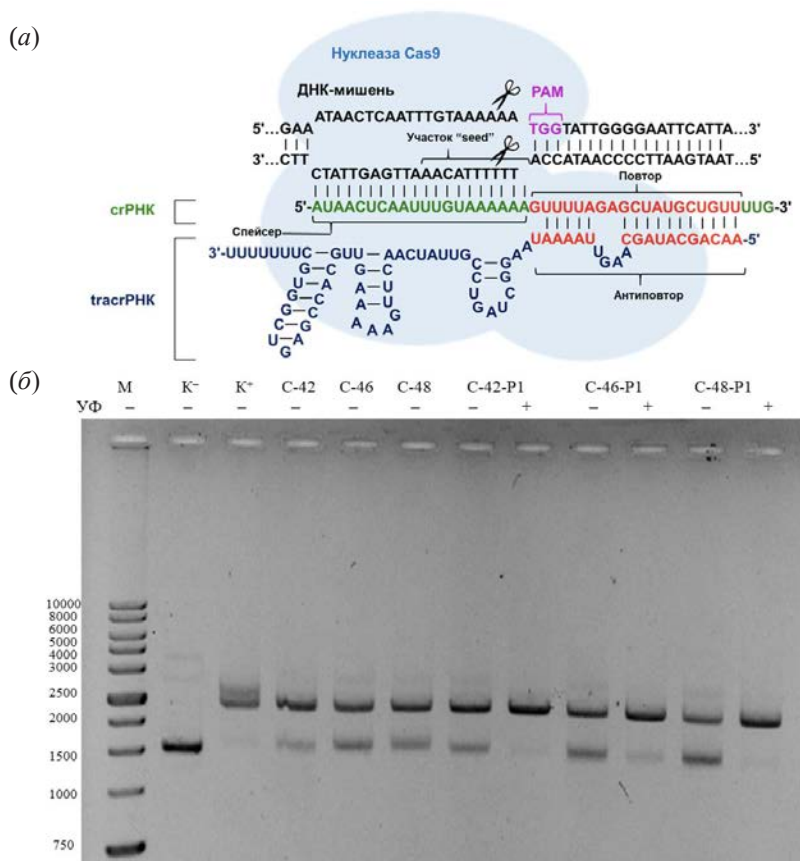


Рис. 5. (a) – Схематическое изображение активного комплекса CRISPR/Cas9; (б) – электрофоретический анализ расщепления плазмидного субстрата. М – набор маркеров длины дцДНК, К⁻ – контроль, содержащий плазмиду без фермента, К⁺ – плазида после расщепления нуклеазой Cas9 с немодифицированной crPHK. УФ: знак “–” означает отсутствие облучения, знак “+” – облучение УФ-светом в течение 30 мин при 365 нм.

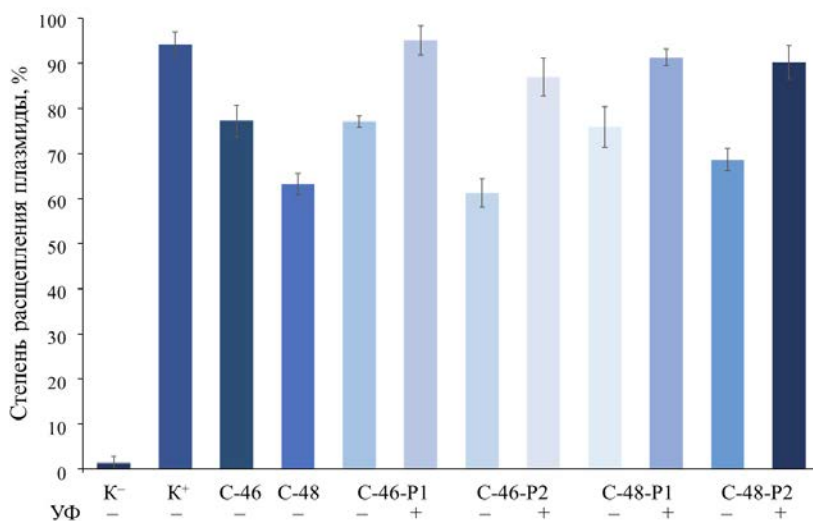


Рис. 6. Эффективность расщепления ДНК плазмиды с использованием облученных и необлученных циклических фоторасщепляемых crPHK и их нерасщепляемых аналогов. К⁻ – интактная плазида; К⁺ – расщепление плазмиды нуклеазой Cas9 в присутствии пары немодифицированных направляющих РНК crPHK/tracrRNA; УФ: знак “–” означает отсутствие облучения, знак “+” – облучение УФ-светом в течение 30 мин при 365 нм.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. В работе были использованы следующие реактивы: *N,N'*-дисулцинимидил-карбонат, *N*-метилимидазол, пропионовый ангидрид, дитиотреитол (Acros Organics, США); 2-цианоэтил-*N,N,N',N'*-тетраизопропилфосфитамид, 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-дезоксирибозимидин, 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-*N*-ацетилзащитные 2'-*O*-*трет*-бутилдиметилсилил-рибонуклеозид-3'-фосфитамида, а также твердофазные носители с присоединенным первым нуклеозидным звеном: 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2'-*O*-*трет*-бутилдиметилсилил-*N*²-изопропилфеноксиацетилгуанозин-CPG и 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2'-*O*-*трет*-бутилдиметилсилил-лигуридин-CPG (ChemGenes, США); полимерный носитель с присоединенным *N*-(6-(*O*-диметокситритил)-гексил)-(2-карбоксамид)-фтальмид-CPG (3'-PT-Amino-Modifier C6 CPG), 6-(2*N*-метил-1*N*-фтальмидил)-гексил-1-[(2-цианоэтил)-(N,N'-диизопропил)]фосфитамида (5'-Amino-Modifier C6-PDA) (Glen Research, США); краситель Stains-all, персульфат аммония, дихлоруксусная кислота, акриламид, *N,N'*-метиленбисакриламид, 2,6-лутидин, бромистый этидий, солянокислый цистеин, трисгидроксиметиламинометан, диметилсульфоксид (Fluka, Швейцария); мочевиная, 40%-ный водный раствор метиламина (Merck, Германия); агароза (MP Biomedicals, США); пиридин, ацетон, тетрагидрофуран (PanReac, Испания); ксиленианол FF, бромфеноловый синий, *N,N,N',N'*-этилендиаминтетрауксусная кислота (Serva, Германия); *бис*-(2,2'-аминоэтил)-дисульфид (цистамин) (Alfa Aesar, США); 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиол, триэтиламин, триэтиламинтригидрофторид, этокситриметилсилан, 5-[3,5-*бис*(трифторметил)фенил]-1*H*-тетразол (Активатор 42TM), хлористый метилен, ацетонитрил (Sigma-Aldrich, США); *N*-оксисулцинимидный эфир азидбутановой кислоты, алкин-CPG, Cu(II)-TBTA комплекс (Lumiprobe, Россия); иод кристаллический, формамид, гексан, концентрированная серная кислота (Реахим, Россия); ацетонитрил (Криохром, Россия), а также другие реактивы и растворители отечественного и зарубежного производства. Линкер PL получали, как описано ранее [23]. Пентафторфениловый эфир 3-малеимидопропановой кислоты получен и любезно предоставлен н.с. ЛЮРС ИХБФМ СО РАН Л.С. Королевой по аналогии с методикой Kida et al. [31].

Рекомбинантная эндонуклеаза Cas9 и плазида на основе вектора pBluescript II SK(–) со вставкой

протоспейсерной последовательности Sp2 и РАМ 5'-TGG-3' получены по стандартным протоколам [23, 32].

Синтез фоторасщепляемых олигорибонуклеотидов. Олигонуклеотиды были получены на автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе ASM-800 (Биоссет, Россия) твердофазным фосфитамидным методом синтеза в масштабе 0.4 мкмоль согласно оптимизированному для данного прибора синтетическому протоколу. Фосфитамида рибонуклеотидов использовали в концентрации 0.1 М в абсолютном ацетонитриле, время конденсации составило 5 мин. Фосфитамида фоторасщепляемого линкера (PL) и фосфитамида аминогексанола (5'-Amino-Modifier C6-PDA) использовали в концентрации 0.1 М в абсолютном ацетонитриле, время конденсации составило 30 мин. В качестве конденсирующего реагента использовали 0.25 М раствор 5-[3,5-*бис*(трифторметил)фенил]-1*H*-тетразола (Активатор 42TM) в абсолютном ацетонитриле. С ростом олигонуклеотидной цепи время конденсации и объемы растворов фосфитамида и конденсирующего реагента увеличивали на 15% после 50 синтетических циклов. Смеси (v/v) пропионовый ангидрид/2,6-лутидин/тетрагидрофуран (10 : 10 : 80) и *N*-метилимидазол/тетрагидрофуран (16 : 84) были использованы в качестве кэпирующих реагентов. Окисление проводили 0.02 М иодом в смеси пиридин/вода/тетрагидрофуран (1 : 9 : 90). В качестве детритилирующего реагента использовали дихлоруксусную кислоту (3%) в хлористом метиле.

Для деблокирования гетероциклических оснований, удаления цианоэтильных защитных групп с межнуклеотидных фосфатных групп и отделения олигорибонуклеотидов от твердофазного носителя использовали обработку 30%-ным раствором аммиака (16 ч при комнатной температуре и постоянном перемешивании). Охлаждали в течение 10 мин при –20°C. Полимерный носитель промывали раствором ацетонитрил–этанол–вода (1 : 1 : 1, v/v/v). Растворы объединяли и упаривали досуха.

Для удаления 2'-OTBDMS защитных групп с олигорибонуклеотида к сухому остатку сразу после упаривания добавляли 200 мкл свежеприготовленного раствора NMP–Et₃N–Et₃N·3HF (1.5 : 0.75 : 1, v/v/v) и выдерживали в течение 2 ч при 65°C и перемешивании. Далее к полученному раствору добавляли 300 мкл этокситриметилсилана и перемешивали на термомиксере в течение 10 мин при 25°C. К полученной смеси добавляли 1 мл

серного эфира, перемешивали, центрифугировали, раствор декантировали, после чего осадок промывали серным эфиром и высушивали на воздухе.

Выделение целевых олигонуклеотидов проводили с использованием препаративного гель-электрофореза в денатурирующих условиях (12%-ный ПААГ, акриламид–*N,N'*-метиленабисакриламид 30 : 0.5, 7 М мочевины, 50 мМ Трис- H_3BO_3 , pH 8.3, 0.1 мМ $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$). Визуализацию олигонуклеотидов в геле проводили наложением геля на пластину DC-Alufohlen Kieselgel 60 F254 (Merck, Германия) в свете УФ-лампы ($\lambda = 254$ нм). В случае фоточувствительных олигонуклеотидов во избежание активации реакции расщепления под воздействием УФ-излучения закрывали стеклом основную часть геля, содержащую продукт, оставляя только небольшую его часть, достаточную для визуализации и аппроксимации. Измельченный гель, содержащий олигонуклеотидный материал, смешивали с 1 мл 0.3 М раствора ацетата натрия (pH 5.2) и встряхивали 16 ч при 25°C. Олигорибонуклеотиды после элюции осаждали четырехкратным объемом этилового спирта, выдерживая при –20°C в течение 2–12 ч. Супернатант после центрифугирования отбирали, осадок промывали охлажденным 80%-ным этиловым спиртом и высушивали досуха на воздухе.

Гомогенность полученных олигонуклеотидов подтверждали методом аналитического гель-электрофореза в 12%-ном ПААГ (условия см. выше). Для нанесения на гель использовали 5 мкл раствора 7 М мочевины с содержанием 0.025% ксиленианола. Для визуализации олигонуклеотидов использовали раствор красителя Stains-all, приготовленный из 50 мг красителя и 100 мл смеси вода–формамид (1 : 1, v/v). После окрашивания гели высушивали на приборе GelDryer 583 (Bio-Rad, США).

Синтез *сгРНК*, содержащих азидогруппу на 5'-конце и алкиновую группировку на 3'-конце. Для синтеза *сгРНК*, содержащих азидогруппу на 5'-конце и алкиновую группировку на 3'-конце, использовали деблокированные олигорибонуклеотиды, содержащие алкиновую группировку на 3'-конце и амиолинкер на 5'-конце. К раствору олигорибонуклеотида (15 ОЕ₂₆₀) в 16 мкл воды добавляли 4 мкл буфера 0.5 М Tris-HCl (pH 8.3) и 80 мкл раствора 0.5 мг *N*-оксисукцинимидного эфира азидбутановой кислоты в DMSO. Реакцию проводили при 37°C и постоянном перемешивании в течение 2 ч. По окончании реакции реакционную смесь осаждали 2%-ным раствором NaClO_4 в ацетоне, осадок

промывали ацетоном, высушивали и растворяли в 50 мкл воды. Реакционную смесь анализировали в 15%-ном денатурирующем ПААГ.

Синтез циклических *сгРНК* методом медь-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения. Олигорибонуклеотид (15 ОЕ₂₆₀), содержащий 5'-азид и 3'-алкин, в 10 мкл 200 мМ NaCl выдерживали 5 мин при 95°C и медленно охлаждали до 37°C. К раствору добавляли 100 мкл буфера (10 мМ комплекс Cu(II)–TBTA, ацетат триэтиламмония, pH 7.0, 55% DMSO), содержащего Cu(II) (Lumiprobe, Россия), и 20 мкл DMSO. Полученный раствор дегазировали аргонном. Затем добавляли 20 мкл свежеприготовленного 5 мМ раствора аскорбиновой кислоты, перемешивали и вновь дегазировали аргонном. Реакционную смесь оставляли на 4 ч с перемешиванием при 37°C. После прохождения реакции реакционную смесь осаждали 2%-ным раствором NaClO_4 в ацетоне. Осадок растворяли в 30 мкл воды. Продукты реакции анализировали и выделяли методом гель-электрофореза в 15%-ном ПААГ.

Синтез *сгРНК*, содержащей остаток цистамина на 5'-конце и амиолинкер на 3'-конце. Синтез проводили на основе иммобилизованного на полимерном носителе (CPG) полностью защищенного 42-звенного олигорибонуклеотида, содержащего амиолинкер на 3'-конце и фоторасщепляемый линкер на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола на 5'-конце. К носителю с иммобилизованным олигонуклеотидом добавляли раствор 9 мг *N,N'*-дисукуцинимидилкарбоната (ДСК) в 270 мкл ацетонитрила (абс.) и 30 мкл пиридина (абс.), реакцию проводили при перемешивании (37°C, 1 ч), затем раствор над полимером удаляли и добавляли свежую порцию раствора 6 мг ДСК в 270 мкл ацетонитрила (абс.) и 30 мкл пиридина (абс.), реакцию проводили еще 30 мин. Последнюю операцию повторяли еще 1 раз. Раствор над полимером удаляли, к полимеру добавляли свежеприготовленный раствор 17 мг гидрохлорида цистамина в 225 мкл DMSO и 25 мкл пиридина (абс.). Реакционную смесь оставляли на ночь при перемешивании при 37°C. Полимер промывали 2 раза DMSO и 3 раза ацетоном, переносили в новую пробирку на 0.6 мл и деблокировали модифицированный олигорибонуклеотид в стандартных условиях. Получившиеся продукты выделяли методом препаративного гель-электрофореза.

Синтез *сгРНК*, содержащей тиогруппу на 5'-конце и маленимидную группировку на

3'-конце. К раствору олигорибонуклеотида (2.5 о.е.) в 9 мкл воды добавляли 1 мкл 0.5 М HEPES-KOH (pH 7.2) и порциями по 20, 10 и 10 мкл через каждые 30 мин раствор пентафторфенолового эфира 3-малеимидопропановой кислоты 0.3 мг в 40 мкл DMSO. Реакцию проводили при 37°C и перемешивании в течение 2 ч. После реакции олигонуклеотид осаждали 2%-ным раствором NaClO₄ в ацетоне.

Реакционную смесь растворяли в 45 мкл воды и добавляли 5 мкл 0.5 М свежеприготовленного раствора DTT в воде. Реакцию проводили при перемешивании в течение 2 ч при 25°C. После реакции олигонуклеотид осаждали 2%-ным раствором NaClO₄ в ацетоне.

Синтез циклической crРНК методом малеимидной конденсации. К раствору олигорибонуклеотида, содержащего SH-группу на 5'-конце и малеимидную группировку на 3'-конце (2.5 о.е.) в 18 мкл воды, добавляли 1 мкл буфера 0.5 М HEPES-KOH (pH 7.2) и оставляли на ночь при 37°C при перемешивании. Продукты реакции выделяли препаративным гель-электрофорезом.

Расщепление плазмидной ДНК белком Cas9 в присутствии направляющих РНК. Реакцию проводили в 10 мкл раствора, содержащего 20 мМ HEPES-KOH (pH 7.5), 100 мМ KCl, 1 мМ дитиотреитол, 0.5 мМ Na₂ЭДТА, 2 мМ MgCl₂, 5%-ный глицерин, 1.35 нМ циклическую crРНК, 1.35 нМ tracrРНК, 1.35 нМ Cas9 и 50 нг плазмидной ДНК. Все реагенты, за исключением плазмиды, смешивали и инкубировали 15 мин при 37°C для сборки рибонуклеопротеинового комплекса Cas9/sgРНК/tracrРНК. Аналогичным образом готовили растворы, содержащие линеаризованные УФ-облучением в течение 30 мин ($\lambda = 365$ нм) crРНК. Затем в каждую пробирку добавляли 1 мкл раствора плазмидной ДНК и инкубировали в течение 1 ч при 37°C в темноте. Для остановки реакции к реакционной смеси добавляли 2.5 мкл раствора, содержащего 250 мМ Na₂ЭДТА, 1.2% SDS, 0.01% бромфенолового синего и 30% глицерина. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 1%-ном агарозном геле в ТАЕ-буфере (40 мМ Tris-ацетат, pH 8.3, 1 мМ Na₂ЭДТА) с добавлением 1 мкг/мл бромистого этидия. Гели визуализировали с использованием системы геле-документации E-Box (Vilber Lourmat, Франция) и обсчитывали при помощи программы Quantity One (Bio-Rad, США).

Долю расщепления плазмиды рассчитывали по формуле:

$$\frac{I_{\text{расщ.}}}{I_{\text{расщ.}} + kI_{\text{суперскруч.}}} \times 100\%,$$

где $I_{\text{расщ.}}$ – интенсивность полосы, соответствующей расщепленной плазмиде, $I_{\text{суперскруч.}}$ – интенсивность полосы, соответствующей суперскрученной форме плазмиды, $k = 1.14$ – коэффициент эффективности окрашивания бромистым этидием суперскрученной формы ДНК относительно линейной и релаксированной формы [33].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования был разработан синтетический подход к получению циклических фоторасщепляемых crРНК, позволяющих активировать систему CRISPR/Cas9 путем облучения светом в ближнем УФ-диапазоне. Подход к созданию циклических фоторасщепляемых crРНК для системы CRISPR/Cas9 предложен нами впервые. Разработанный подход расширяет арсенал способов фотоактивации систем геномного редактирования CRISPR/Cas9 и дает возможность активации системы в конкретном месте и в определенный момент времени.

Результаты, полученные в рамках данной работы, демонстрируют перспективность использования разработанной фотоактивируемой системы CRISPR/Cas9 для регулируемого светом редактирования генов. Значительное увеличение степени расщепления модельной ДНК после облучения мягким УФ-светом, не вызывающим значительного повреждения биологических молекул, позволяет надеяться на возможность создания таких фотоактивируемых конструкций для использования в биологических системах. Анализ данных по расщеплению модельной ДНК-мишени указывает на необходимость более полной дезактивации необлученной crРНК в “выключенном” состоянии системы. Перспективным подходом представляется дополнительное затруднение взаимодействия циклической crРНК с ДНК до облучения, например, путем создания би- или трициклической конструкции [5]. Полученные результаты демонстрируют потенциал предлагаемого подхода для создания фотоактивируемых систем геномного редактирования.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.х.н. Л.С. Королевой (ИХБФМ СО РАН) за предоставленный пентафторфениловый эфир 3-малеимидопропановой кислоты, Л.М. Кулишовой (ИХБФМ СО РАН) за конструирование плазмиды pBluescript II SK(–) со вставкой целевой последовательности, а также Л.В. Саковиной и И.П. Вохтанцеву (ИХБФМ) за

наработку и выделение рекомбинантной эндонуклеазы Cas9 и плазмидного субстрата.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-14-00294) и базового бюджетного финансирования в рамках проекта государственного задания Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (2021–2024 гг.) № 121031300042-1.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. // *Science*. 2012. V. 337. P. 816–821.
<https://doi.org/10.1126/science.1225829>
2. Wang, J.Y., Pausch, P., Doudna, J.A. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2022. V. 20. P. 641–656.
<https://doi.org/10.1038/s41579-022-00739-4>
3. Makarova K.S., Wolf Y.I., Iranzo J., Shmakov S.A., Alkhnbashi O.S., Brouns S.J.J., Charpentier E., Cheng D., Haft D.H., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J.M., Scott D., Shah S.A., Siksnyš V., Terns M.P., Venclovas Č., White M.F., Yakunin A.F., Yan W., Zhang F., Garrett R.A., Backofen R., van der Oost J., Barrangou R., Koonin E.V. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2020. V. 18. P. 67–83.
<https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>
4. Brown W., Zhou W., Deiters A. // *ChemBioChem*. 2021. V. 22. P. 63–72.
<https://doi.org/10.1002/cbic.202000423>
5. Sun Y.-J., Chen W.-D., Liu J., Li J.-J., Zhang Y., Cai W.-Q., Liu L., Tang X.-J., Hou J., Wang M., Cheng L. // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2023. V. 62. P. e202212413.
<https://doi.org/10.1002/anie.202212413>
6. Zhang Y., Ling X., Su X., Zhang S., Wang J., Zhang P., Feng W., Zhu Y.Y., Liu T., Tang X. // *Angew. Chemie*. 2020. V. 132. P. 21081–21085.
<https://doi.org/10.1002/anie.202009890>
7. Hartmann D., Booth M.J. // *Commun. Chem.* 2023. V. 6. P. 59.
<https://doi.org/10.1038/s42004-023-00860-2>
8. Darrah K.E., Deiters A. // *Chem. Soc. Rev.* 2021. V. 50. P. 13253–13267.
<https://doi.org/10.1039/d1cs00257k>
9. Wu Y., Yang Z., Lu Y. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2020. V. 57. P. 95–104.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.05.003>
10. Casey J.P., Blidner R.A., Monroe W.T. // *Mol. Pharm.* 2009. V. 6. P. 669–685.
<https://doi.org/10.1021/mp900082q>
11. Petkovic S., Müller S. // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43. P. 2454–2465.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv045>
12. Obi P., Chen Y.G. // *Methods*. 2021. V. 196. P. 85–103.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2021.02.020>
13. Lietard J., Meyer A., Vasseur J.-J., Morvan F. // *J. Org. Chem.* 2008. V. 73. P. 191–200.
<https://doi.org/10.1021/jo702177c>
14. Wesselhoeft R.A., Kowalski P.S., Anderson D.G. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. P. 2629.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-05096-6>
15. Ji D., Lyu K., Zhao H., Kwok C.R. // *Nucleic Acids Res.* 2021. V. 49. P. 7280–7291.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkab593>
16. Riccardi C., Meyer A., Vasseur J.-J., Krauss I.R., Paduano L., Morvan F., Montesarchio D. // *Bioorg. Chem.* 2020. V. 94. P. 103379.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103379>
17. Zhang X.-J., Zhao Z., Wang X., Su M.-H., Ai L., Li Y., Yuan Q., Wang X.-Q., Tan W. // *Natl. Sci. Rev.* 2022. V. 10. P. nwac107.
<https://doi.org/10.1093/nsr/nwac107>
18. Sánchez A., Pedrosa E., Grandas A. // *Chem. Commun.* 2013. V. 49. P. 309–311.
<https://doi.org/10.1039/c2cc35357a>
19. Yamazoe S., Liu Q., McQuade L.E., Deiters A., Chen J.K. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014. V. 53. P. 10114–10118.
<https://doi.org/10.1002/anie.201405355>
20. Brown W., Bardhan A., Darrah K., Tsang M., Deiters A. // *J. Am. Chem. Soc.* 2022. V. 144. P. 16819–16826.
<https://doi.org/10.1021/jacs.2c04479>
21. Klimek R., Wang M., McKenney V.R., Schuman E.M., Heckel A. // *Chem. Commun.* 2021. V. 57. P. 615–618.
<https://doi.org/10.1039/d0cc06704k>
22. Yang L., Kim H.B., Sul J.-Y., Yeldell S.B., Eberwine J.H., Dmochowski I.J. // *ChemBioChem*. 2018. V. 19. P. 1250–1254.
<https://doi.org/10.1002/cbic.201800012>
23. Akhmetova E.A., Golyshev V.M., Vokhtantsev I.P., Meschaninova M.I., Venyaminova A.G., Novopashina D.S. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2021. V. 47. P. 496–504.
<https://doi.org/10.1134/S1068162021020023>
24. Semikolenova O., Sakovina L., Akhmetova E., Kim D., Vokhtantsev I., Golyshev V., Vorobyeva M., Novopashina S., Novopashina D. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 10919.
<https://doi.org/10.3390/ijms222010919>

25. Meschaninova M.I., Novopashina D.S., Semikolenova O.A., Silnikov V.N., Venyaminova A.G. // *Molecules*. 2019. V. 24. P. 4266.
<https://doi.org/10.3390/molecules24234266>
26. Novopashina D., Vorobyeva M., Nazarov A., Davydova A., Danilin N., Koroleva L., Matveev A., Bardasheva A., Tikunova N., Kupryushkin M., Pyshnyi D., Altman S., Venyaminova A. // *Front. Pharmacol.* 2019. V. 10. P. 813.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00813>
27. Danilin N.A., Koroleva L.S., Novopashina D.S., Venyaminova A.G. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 825–832.
<https://doi.org/10.1134/S106816201906013X>
28. Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E. // *Nature*. 2011. V. 471. P. 602–607.
<https://doi.org/10.1038/nature09886>
29. Sternberg S.H., Redding S., Jinek M., Greene E.C., Doudna J.A. // *Nature*. 2014. V. 507. P. 62–67.
<https://doi.org/10.1038/nature13011>
30. Shibata M., Nishimasu H., Kodera N., Hirano S., Ando T., Uchihashi T., Nureki O. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 1430.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-01466-8>
31. Kida S., Maeda M., Hojo K., Eto Y., Nakagawa S., Kawasaki K. // *Chem. Pharm. Bull.* 2007. V. 55. P. 685–687.
<https://doi.org/10.1248/cpb.55.685>
32. Anders C., Jinek M. // *Methods Enzymol.* 2014. V. 546. P. 1–20.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801185-0.00001-5>
33. Shubbs M.F., Goodisman J., Dabrowiak J.C. // *J. Biochem. Biophys. Methods*. 1997. V. 34. P. 73–79.
[https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(96\)01204-3](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(96)01204-3)

The Approach to the Preparation of Cyclic Photocleavable RNA for Photoactivatable CRISPR/Cas9 System

E. V. Ivanskaya*, **, M. I. Meschaninova*, M. A. Vorobyeva*,
D. O. Zharkov*, **, and D.S. Novopashina*, **

Phone: +7(383)363-51-29; e-mail: danov@niboch.nsc.ru

* Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS,
prosp. Acad. Lavrentjeva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

** Novosibirsk State University, ul. Pirogova 1, Novosibirsk, 630090 Russia

The development of controllable gene editing systems on the base of CRISPR/Cas is an actually problem of modern molecular biology and genetic engineering. Interesting variant of solution of this problem is modification of guide RNA by introduction of photocleavable linkers. We developed the approach to the synthesis of cyclic photocleavable guide crRNA for the CRISPR/Cas9 system with photolinker on the base of 1-(2-nitrophenyl)-1,2-ethanediol (PL). Upon irradiation by UV-light these guide RNA are linearized and CRISPR/Cas9 system is activated. Two chemical methods to the cyclization of RNA were tested: Michael reaction (thiol-maleimide condensation) and Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC, click-chemistry reaction). For this purpose 5',3'-modified RNA containing reactive groups were prepared. The advantages of CuAAC reaction for cyclic RNA preparation was demonstrated. Effectivity of cyclic RNAs is depends from their secondary structure and ability of reactive groups to draw together. Series of photocleavable and control non-cleavable cyclic crRNA were obtained. It was shown that cyclic crRNAs guide nuclease Cas9 for plasmid cleavage less effective but linearization of photocleavable cyclic crRNA increases extent of plasmid cleavage. Developed approach permits prepare cyclic photocleavable RNA including spatiotemporal activation of guide RNA for gene editing. Photoregulation of gene editing will permit to lower the off-target effects and to carry out the editing more targeting.

Keywords: cyclic RNA, controllable CRISPR/Cas9 system, UV-irradiation, guide crRNA, photocleavable linker



УДК 577.112.6+615.074

СИНТЕЗ ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ ГЛИКОПРОТЕИНА Spike SARS-CoV-2 И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СВЯЗЫВАНИЯ С КЛЕТКАМИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. О. В. Грибовская*,#, В. В. Янченко**, А. М. Цыганков**, В. П. Мартинович*

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

** Витебский государственный медицинский университет, Беларусь, 210023, Витебск, пр. Фрунзе, 27

Поступила в редакцию 21.12.2023 г.

После доработки 29.12.2023 г.

Принята к публикации 30.12.2023 г.

Апробирован новый метод, позволяющий оценивать активацию лейкоцитов крови синтетическими пептидами, которые представляют собой фрагменты поверхностного гликопротеина Spike SARS-CoV-2 – Lys-Ile-Ala-Asp-Tyr-Asn-Tyr-Lys-Leu (417–425 а.о.) и Val-Arg-Gln-Ala-Pro-Asn-Gly-Gln-Thr (407–415 а.о.). Установлено, что данные пептиды, вне зависимости от HLA-A-фенотипа обследуемых добровольцев, могли связываться с лейкоцитами, что говорит об универсальности реакции клеток врожденного иммунитета на эти пептиды. Пептид Lys-Ile-Ala-Asp-Tyr-Asn-Tyr-Lys-Leu связывался с лейкоцитами крови, активировал лимфоциты и базофилы, что подтверждено увеличением уровня IFN- γ по сравнению с пептидом Val-Arg-Gln-Ala-Pro-Asn-Gly-Gln-Thr. Таким образом, данная работа демонстрирует подход к разработке новой пептидной вакцины против COVID-19 на этапе исследований *in vitro*.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, пептидный синтез, гамма-интерферон, клеточный иммунитет

DOI: 10.31857/S0132342324050062, **EDN:** LRAMGQ

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия коронавируса вызвала повышенный интерес ученых разных стран к поиску новых безопасных вакцин. С 2020 г. только против COVID-19 исследуется >800 вакцин. Всего 13 вакцин включены в список ВОЗ для использования в чрезвычайных ситуациях. Эти вакцины одобрены, разрешены, лицензированы, им выдано разрешение на использование в чрезвычайных ситуациях или предоставлено право использования вне клинических испытаний каким-либо образом регулирующим органом, национальным органом или другой организацией. По состоянию на март 2023 г. 50 вакцин получили одобрение ВОЗ, 183 вакцины – кандидаты, из них около трети (59 или 32%) – белковые субъединичные

вакцины. Из 199 вакцин, находящихся на стадии доклинических исследований, 76 (38%) – белковые субъединичные. Таким образом, в настоящее время разработка вакцин на основе белковых платформ представляется перспективной.

Традиционная разработка вакцины может занимать до 15 лет, начиная с фазы открытия, во время которой разрабатываются вакцины и проводятся предварительные доклинические исследования. Доклиническая стадия длится от 1.5 до 2.5 лет и довольно избирательна. Клинические испытания проходят менее 20% вакцин-кандидатов. Некоторые исследования терпят неудачу вследствие неэффективности продукта, другие прекращаются из-за отсутствия финансирования. Следующий этап испытаний

Сокращения: Вос – трет-бутилоксикарбонил; Z – карбобензоксид; DCC – *N,N'*-дициклогексилкарбодимид; DMF – *N,N*-диметилформамид; HOBT – *N*-гидроксисбензотриазол; Bzl – бензил; TEA – триэтиламин; ONp – *n*-нитрофениловый эфир; OSu – суццинимидный эфир; DIPEA – диизопропилэтиламин; FITC – изотиоцианат флуоресцеина; PE – R-фикоэритрин; ESI – ионизация распылением в электрическом поле.

Автор для связи: (тел.: +3 (751) 737-387-53; эл. почта: olymelnik@yandex.ru).

вакцины – тестирование на людях, включающее получение одобрения FDA (США) и ЕМА (Европа), эти испытания проводят на десятках (I фаза), сотнях (II фаза) и тысячах добровольцев (III и IV фазы). Поскольку цель состоит в том, чтобы определить эффективную дозу вакцины и, что более важно, минимизировать побочные эффекты, всегда предпочтительнее проводить испытания на небольших выборках. Если вакцина-кандидат успешно проходит III фазу испытаний, подается заявление на получение лицензии на вакцину, которое рассматривается регулирующими органами, и вакцина лицензируется. После этого начинается серийное производство лицензированной вакцины и проводится серия постмаркетинговых исследований [1, 2]. Кроме того, подходы *in silico* могут быть использованы для разработки вакцин за счет более быстрого скрининга и более точного прогнозирования последовательностей аминокислот с высокой иммуногенностью и аффинностью к молекулам HLA I и II классов. Эти вычислительные подходы могут предсказать аффинность специфических пептидных последовательностей к молекулам HLA I и II классов, к рецепторам В-клеток. Антигенность, аллергенность, физико-химические параметры, а также вторичная и третичная структура этих белков точно предсказываются *in silico*.

Вакцины на основе пептидов в настоящее время разрабатываются для использования как в качестве терапевтического, так и профилактического средства при множестве заболеваний, начиная от рака и вирусных инфекций, заканчивая аллергией и болезнью Альцгеймера. Учитывая, что только специфические аминокислотные последовательности полноразмерных белковых антигенов ответственны за эффективные иммунные ответы, для вакцин предлагаются иммуногенные пептиды, имитирующие В- и Т-клеточные эпитопы [3].

Можно выделить четыре основных преимущества вакцин на основе пептидов: 1) крупномасштабный синтез пептидов относительно недорог, а технология хорошо отработана; 2) пептиды могут складываться в трехмерные эпитопы, способные индуцировать гуморальный ответ на линейные и конформационные структуры; 3) уникальные эпитопы могут быть выбраны, чтобы избежать аутоиммунных ответов, которые могут быть вызваны полноразмерным белком; 4) новые эпитопы могут быть легко добавлены к смеси пептидов по мере выявления новых вирусных мутаций [4].

Антитела после введения белковой субъединичной (пептидной) вакцины могут вообще не появиться. Вакцинация только эпитопами Т-клеток подходит как для профилактической, так и для терапевтической вакцинации – может помочь быстрее выздороветь. Не следует ожидать, что вакцина из Т-клеточных эпитопов предотвратит инфицирование, как традиционные вакцины, которые стимулируют появление нейтрализующих антител. Индукция Т-клеток против нескольких разных белков обеспечивает защиту от вирусных мутаций, как обсуждалось применительно к вирусу гриппа. В случае еще неизвестных вариантов SARS-CoV-2 этот тип вакцины также может быть эффективным [5–8].

До пандемии COVID-19 ~500 пептидных вакцин против различных заболеваний не достигли IV фазы испытаний. Большинство пептидных вакцин в клинических испытаниях были направлены против различных видов рака, далее следуют вирусные инфекции, аллергии и аутоиммунные заболевания. Конечной их целью заявлялась разработка безопасной, воспроизводимой и генетически стабильной вакцины, которая способна вызывать соответствующий иммунный ответ. Стоит отметить, что существует несколько вакцин против COVID-19 на основе пептидов: ЭпиВакКорона (ФБНУ “Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”, Россия; одобрена ВОЗ и разрешена для применения в других странах), UB-612 (United Biomedical Inc., США; III фаза испытаний), CoVepiT (OSE Immunotherapeutics, Франция; I фаза испытаний), B-pVAC-SARS-CoV-2 (University Hospital Tuebingen, Германия; II фаза испытаний). Эксперименты для проверки активности пептидов *in vivo* проводились как непосредственно после биоинформационных исследований, так и с лабораторным этапом *in vitro*.

В связи с вышесказанным, разработка новых белковых вакцин против COVID-19 представляется актуальной задачей.

Целью данной работы был синтез пептидов Lys-Ile-Ala-Asp-Tyr-Asn-Tyr-Lys-Leu (IX) (417–425 а.о.) и Val-Arg-Gln-Ala-Pro-Asn-Gly-Gln-Thr (XVIII) (407–415 а.о.) – фрагментов поверхностного гликопротеина Spike коронавируса SARS-CoV-2 – как потенциальных компонентов вакцины против COVID-19 и изучение их связывания с клетками крови человека.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез пептидов (IX) и (XVIII). Синтез пептида (IX) осуществляли по схеме 1, используя



Схема 1. Синтез пептида (IX).

тактику максимальной защиты боковых функциональных групп аминокислот.

Гексапептид (V) получали последовательным наращиванием пептидной цепи, начиная с C-конца, лейцин вводили в реакцию в виде *n*-нитрофенилового эфира, который конденсировали с Boc-Lys(N^E-Z)-OH. В качестве основного конденсирующего агента использовали DIPIC с добавлением HOBt. Для блокирования α-аминогрупп применяли Boc-защитную группу. Ее отщепление

проводили обработкой 4.5 М раствором HCl в этилацетате. Гидрохлориды пептидов после отщепления Boc-защитной группы, которое протекало с выходами, близким к количественным (93–98%), использовали в синтезе после определения их однородности методом тонкослойной хроматографии. Полной характеристики гидрохлоридов не проводили, т.к. кислотный гидролиз Boc-группы протекает, как правило, без рацемизации и изменения структуры пептидной цепи [9].

N-Концевой трипептид (**VII**) получали методом активированных эфиров, причем Boc-Lys(N^{ϵ} -Z)-OSu и Boc-Ile-OSu вводили в реакцию, отфильтровав осадок дициклогексилмочевины, что позволило сократить время и количество растворителей на выделение эфиров. Нанопептид (**VIII**) получали с использованием карбодиимидного метода. Защиту с боковых функциональных групп аминокислот удаляли гидрированием пептида над катализатором (палладиевой чернью) в растворе уксусной кислоты.

Для синтеза пептида (**XVIII**) была предложена схема 2. *C*-Концевой пентапептид (**XIII**) получали конденсацией трипептида (**XI**) и дипептида Boc-Ala-Pro-OH (**XII**). Последний получали методом активированных эфиров с использованием Boc-Ala-OSu, который вводили в реакцию без выделения. *N*-Концевой тетрапептид (**XVI**) получали путем сшивки двух дипептидов, Boc-Val-Arg(NO_2)-OH и HCl·H-Gln-Ile-OH, также полученных с использованием активированных эфиров.

Целевые пептиды до снятия защит боковых функциональных групп подвергали очистке ме-

тодом колоночной хроматографии на сефадексе G-10. Как видно из схемы 2, для защиты боковой гуанидиновой группы аргинина использовали водородолабильную нитрогруппу, которую также удаляли пропусканием тока водорода через раствор пептида в уксусной кислоте в присутствии палладиевого катализатора в течение 8 ч.

Идентификацию соединений на всех стадиях синтеза выполняли методом масс-спектрометрии, гомогенность подтверждали хроматографическими методами.

Пептиды, меченные FITC (FITC-Val-Arg-Gln-Ile-Ala-Pro-Gly-Gln-Thr-OMe, FITC-Lys-Ile-Ala-Asp-Tyr-Asn-Tyr-Lys-Leu-OH), получали путем биоконъюгации одной молекулы FITC с молекулой пептида DMF в течение 4 ч.

Влияние пептидов (IX) и (XVIII) на лейкоциты. Влияние пептидов (IX) и (XVIII) на лейкоциты крови исследовали методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител против молекул, которые экспрессируются на лейкоцитах (CD45), отвечают за раннюю активацию лимфоцитов (CD69) и базофилов (CD203c, CD63), на 80 образцах венозной крови

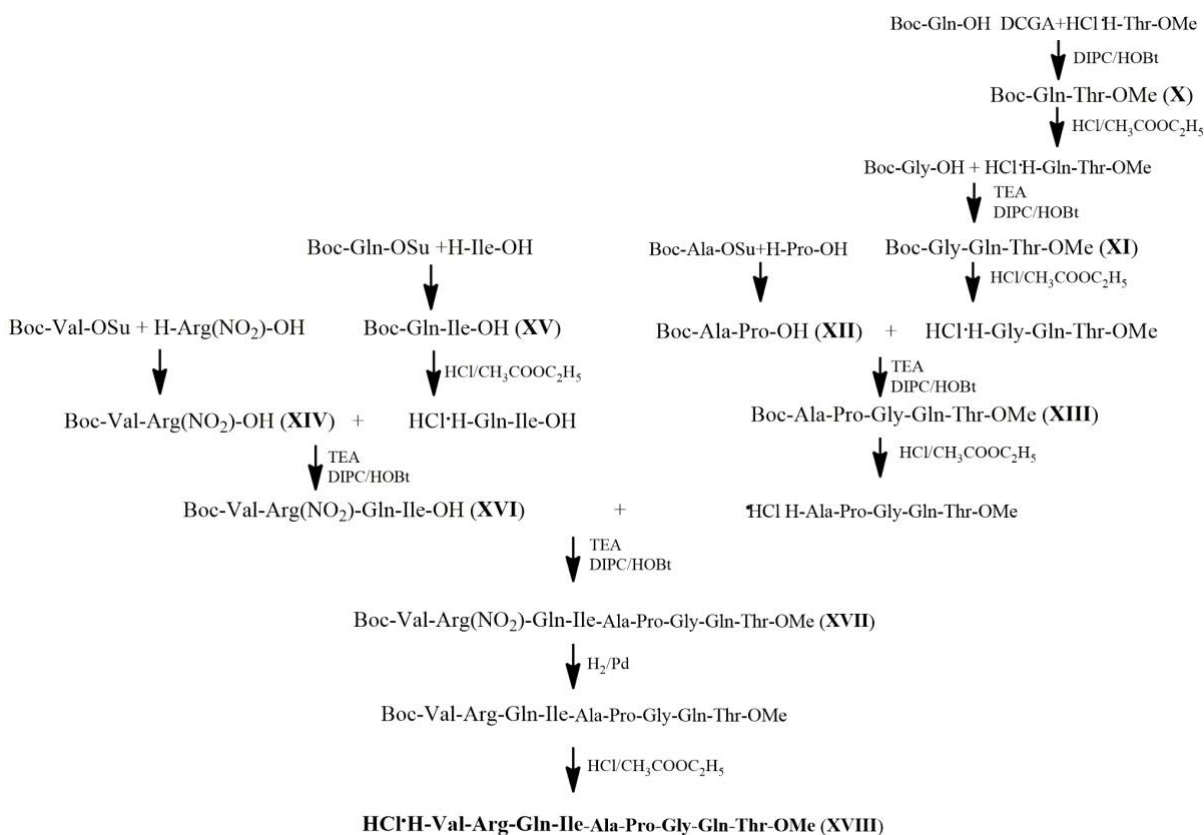


Схема 2. Синтез пептида (**XVIII**).

добровольцев, средний возраст которых составил 26.9 ± 9.4 года. Для пептида (IX) концентрация полуингибирования (IC_{50}) для HLA 02 : 01 составила 16.0 нМ, а для пептида (XVIII) – 4.5 мкМ.

Трансмембранная протеинтирозинфосфатаза CD45 – ключевой регулятор передачи сигналов антигенных рецепторов в Т- и В-клетках. CD45 имеет высокий уровень экспрессии во всех клонах кроветворных клеток на всех стадиях развития. Функционально CD45 подавляет клеточную пролиферацию, опосредованную IL-3, эритропоэтин-зависимый гемопоэз и противовирусные ответы *in vitro* и *in vivo* [10].

CD69 – антиген очень ранней активации, экспрессия которого на поверхности лейкоцитов и тромбоцитов быстро повышается при активации вирусами. CD69 вовлечен в передачу сигнала на начальных этапах активации, может быть использован для характеристики напряженности иммунитета. CD69 – интегральный мембранный белок II типа с внеклеточным лектиновым доменом С-типа. Это самый ранний гликопротеин, экспрессируемый на поверхности клеток при активации Т-, В- и NK-клеток *in vitro*. CD69 конститутивно экспрессируется на субпопуляциях тимоцитов и тромбоцитов, плазматоидных дендритных клеток и клеток-предшественников [11], его активация запускает каскад внутриклеточных процессов, связанных с представленными ниже молекулами.

CD203с (ENPP3, эктонуклеотидпирофосфатаза/фосфодиэстераза) экспрессируется на клетках многих органов, в том числе на эпителии, особенно на базофилах и тучных клетках. Функция этого фермента состоит в подавлении АТФ-зависимого воспаления. Базофилы и тучные клетки участвуют в реакции на определенные патогены, а также на острые и хронические воспалительные и аллергические процессы. CD203с можно использовать как для идентификации, так и в качестве активационного маркера. Его экспрессия на базофилах быстро увеличивается при манипуляциях с клетками или во время стимуляции базофилов без дегрануляции [12].

Антиген CD63 обнаруживается на поверхности моноцитов/макрофагов и слабо экспрессируется покоящимися гранулоцитами, Т-лимфоцитами и В-лимфоцитами. Антиген CD63 присутствует в азурофильных гранулах нестимулированных нейтрофилов, экспрессируется на поверхности нейтрофилов и базофилов после активации [13].

Для подтверждения активации лимфоцитов синтезированными пептидами (IX) и (XVIII) было взято за основу определение содержания гамма-

интерферона (IFN- γ), который применяется в различных вариациях [14, 15]. IFN- γ представляет собой цитокин, играющий важную роль в различных биологических реакциях, включая защиту от инфекций, противоопухолевое действие и регуляцию эффекторных клеток как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Он способствует усилению презентации антигена молекулами главного комплекса гистосовместимости, дифференцировке клеток, стимуляции фагоцитов, координации взаимодействий лейкоцитов и эндотелия, влияет на клеточную пролиферацию и апоптоз, а также на стимуляцию и подавление различных генов. IFN- γ регулирует дифференцировку, активацию и гомеостаз лимфоцитов, активацию M1-подтипа макрофагов, индуцирует рекрутирование эффекторных клеток при различных видах воспаления. Он рассматривается как ключевое звено между врожденным и адаптивным иммунным ответом и как главный переключатель каскада цитокинов [16].

Анализ полученных данных показал, что большее количество нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов после суточной инкубации реагировало на пептид (XVIII), нежели на пептид (IX). Напротив, лейкоциты в целом и эозинофилы в частности реагировали на пептид (IX) в большей степени за короткое время в сравнении с пептидом (XVIII). Следует учесть, что за сутки инкубирования часть клеток становилась нежизнеспособной, и пептид (XVIII) активировал большее количество базофилов и лимфоцитов на 35.00 и 25.92% соответственно. Анализ показал, что количество лимфоцитов (CD45), моноцитов (CD45), эозинофилов (CD45) и активированных базофилов (CD203с⁺) достоверно отличалось ($p < 0.05$) при взаимодействии с данными пептидами. Для нейтрофилов (CD45) и активированных лимфоцитов (CD69⁺) достоверных отличий при активации пептидами (IX) и (XVIII) не выявлено ($p < 0.05$). Таким образом, мы выяснили, что существуют достоверные различия между ответом лейкоцитов на пептиды: лимфоциты (CD45) и моноциты (CD45) прореагировали с пептидом (XVIII) в большем количестве, чем с пептидом (IX). В случае эозинофилов (CD45) пептид (XVIII) активировал достоверно большее количество базофилов (CD203с⁺), в отличие от пептида (IX). В табл. 1 отражены медианные значения количества клеток, отмечены достоверные отличия.

При анализе методом ИФА содержания IFN- γ , который был секретируем лимфоцитами в ответ на пептиды, был выявлен рост значений при

Таблица 1. Количество клеток, отреагировавших на пептиды (IX) и (XVIII) (в расчете на 30 000 клеток)

Тип клеток и количество наблюдений (n) для пептидов (IX)/(XVIII)	Количество клеток, ответивших на пептиды (IX)/(XVIII) соответственно
Лейкоциты всего (CD45), n = 70/54, из них:	233.0 (71.0–761.0)/175.0 (80.0–380.0)
лимфоциты (CD45), n = 20/51	1.0 (1.0–2.5)/12.0 (6.0–22.0)*
моноциты (CD45), n = 37/50	2.0 (1.0–4.0)/6.0 (3.0–11.8)*
нейтрофилы (CD45), n = 70/54	32.0 (21.0–100.0)/75.0 (20.0–141.5)
эозинофилы (CD45), n = 70/54	25.0 (8.0–85.0)/15.0 (6.0–29.0)*
Активированные лимфоциты CD69 ⁺ , n = 78	65.0 (31.5–117.5)/92.0 (35.3–145.0)
Активированные базофилы CD203c ⁺ , n = 77	9.0 (3.0–25.5)/16.0 (5.0–32.0)*

Примечание: данные представлены в виде средних значений, в скобках указан интерквартильный размах в виде 25 и 75 процентилей.
* Статистически значимые отличия ($p < 0.05$).

использовании пептида (IX) в отличие от пептида (XVIII) (табл. 2). Таким образом, показано, что пептид (IX) достоверно активировал лимфоциты посредством секреции ими IFN- γ .

Всесторонние исследования *in vivo* показали, что длинные пептиды способствуют более качественному Т-клеточному ответу, но, с другой стороны, они сильно зависят от процессинга и могут быть представлены только профессиональными антиген-презентирующими клетками. При анализе информации о вакцинах-кандидатах и вакцинах, одобренных к применению, отмечено, что не менее трети из них представляют собой белковые субъединичные (в т.ч. пептидные) препараты, что поддерживает идею создания пептидной вакцины. Первый шаг в этом направлении – подтверждение гипотезы об активации лимфоцитов короткими пептидами.

Показано, что используемые в данной работе пептиды достоверно взаимодействуют с лейкоцитами. Пептид (IX) продемонстрировал досто-

верное влияние на эозинофилы, в отличие от пептида (XVIII). Нами показана достоверная активация базофилов (CD203c⁺), а также лимфоцитов (CD69⁺) пептидом (XVIII) в большей степени, чем пептидом (IX) (табл. 3), причем рост содержания IFN- γ у активированных лимфоцитов характерен для последнего соединения. Вне зависимости от HLA-A-фенотипа добровольцев, пептиды могли взаимодействовать с лейкоцитами, что говорит об их универсальности. Стоит отметить, что отсутствие ответа или слабый ответ на пептид мог быть обусловлен иным HLA-A-фенотипом добровольцев. Пептид (XVIII) после суточной инкубации активировал клетки врожденного иммунитета (базофилы) и клетки адаптивного иммунитета (лимфоциты) чаще, чем пептид (IX), за короткий срок инкубации. Наличие хронических заболеваний достоверно повлияло на активацию лимфоцитов. Для усовершенствования протокола исследований стоит уменьшить время инкубации с пептидами до 2 ч.

Таблица 2. Анализ содержания IFN- γ , секретированного лимфоцитами в ответ на активацию пептидами (IX) и (XVIII)

Активация пептидами	Средняя концентрация IFN- γ , пг/мл (n = 51)
(IX)	7.98*
(XVIII)	5.54*

* Статистически значимые отличия ($p < 0.05$).

Таблица 3. Результаты анкетирования и связь с активированными лейкоцитами

Категории	Количество респондентов (<i>n</i>), ответивших утвердительно, %	Активированные лимфоциты (CD69 ⁺) и базофилы (CD203c ⁺)
Хронические заболевания	<i>n</i> = 15 или 18.8% (95% ДИ: 10.2–27.3%)	Статистически значимо ($p < 0.05$) для лимфоцитов, активированных пептидом (IX)
В течение 14 дней до забора крови		
Стресс	<i>n</i> = 27 или 33.8% (95% ДИ: 23.4–44.1%)	Статистически не значимо ($p > 0.05$) для лимфоцитов и базофилов, активированных пептидом (IX)
Физические нагрузки выше среднего	<i>n</i> = 26 или 32.5% (95% ДИ: 22.2–42.8%)	
Прием лекарственных средств	<i>n</i> = 12 или 15.0% (ДИ: 7.2–22.8%)	
Двухразовое питание	<i>n</i> = 23 или 28.8% (ДИ: 18.8–38.7%)	
Трёхразовое питание и более 3 раз в день	<i>n</i> = 57 или 71.3% (ДИ: 61.3–81.2%)	
Контакт с инфекционными больными	<i>n</i> = 15 или 18.8% (ДИ: 10.2–27.3%)	

Примечание: данные представлены в виде количества и процента респондентов, ответивших утвердительно, в скобках указан доверительный интервал (ДИ).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез пептидов. В работе были использованы аминокислоты, реагенты и растворители (Novabiochem, Германия; Tokyo Chemical Industry, Япония, США; Экос-1, Россия). Процессы синтеза соединений, удаления защитных групп контролировали методом ТСХ на пластинках с закрепленным слоем силикагеля (Sorbfil, Россия) в системах растворителей: этилацетат/пиридин/уксусная кислота/вода (5 : 3 : 2 : 1) (А); хлороформ/метанол/25%-ный раствор аммиака (6 : 4 : 1) (Б); бутанол/уксусная кислота/вода (4 : 1 : 1) (В). Вещества обнаруживали на пластинках с помощью хлор-бензидинового реагента.

N-Концевую *трет*-бутильную защиту удаляли 4.5 н. раствором хлороводорода в этилацетате. Выходы в реакциях деблокирования были близки к количественным.

Аналитическую ВЭЖХ и масс-спектрометрию (ионизация распылением в электрическом поле (ESI MS) в режиме сканирования положительных ионов) проводили на хроматографе Agilent 1200 с масс-селективным детектором типа тройной квадруполь Agilent 6140 (США), колонка Agilent ZorbaxSBC18 RR (2.1 × 30 мм), размер частиц 3.5 мкм. Использовали градиент концентраций ацетонитрила 10–95% в 0.05%-ном растворе муравьиной кислоты в деионизированной воде.

Температуры плавления определяли на приборе Кофлера и не корректировали. Удельное вращение соединений измеряли на автоматическом поляриметре Nanon P850 Pro (Китай) при $\lambda = 589.3$ нм, длина кюветы 100 мм.

Вос-Lys(N^ε-Z)-Leu-ONp (I). К раствору 1.23 г (2.8 ммоль) *n*-толуолсульфоната *n*-нитрофенилового эфира лейцина в 3.5 мл DMF добавляли 0.55 мл (3.3 ммоль) DIPEA. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин, затем добавляли 1.07 г (2.8 ммоль) Вос-Lys(N^ε-Z)-ОН. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд последовательно добавляли 0.4 г (3.0 ммоль) НОВт и 0.7 г (3.4 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при 0°C и 4 ч при комнатной температуре, осадок отфильтровывали, промывали на фильтре 1 мл DMF. В фильтрат добавляли 10 мл этилацетата, полученный раствор промывали 9%-ным раствором лимонной кислоты, 5%-ным раствором NaHCO₃, насыщенным раствором NaCl, водой, затем сушили над Na₂SO₄. После сушки этилацетат упаривали, а образовавшийся остаток растирали с петролевым эфиром и сушили над P₂O₅. После сушки в эксикаторе получили 1.4 г (81%) пептида (**I**) с т. пл. 96–98°C; $[\alpha]_D^{25} -21.877 \pm 0.225^\circ$ (*c* 0.00308 г/мл, MeOH), R_f 0.82 (А), 0.78 (В). ESI MS, m/z : 615.7 [$M + H$]⁺, 637.7 [$M + Na$]⁺, 659.7 [$M - H + 2Na$]⁺.

Вос-Tyr(OBzl)-Lys(N^ε-Z)-Leu-ONp (II). К раствору 1.2 г (2.2 ммоль) HCl·H-Lys(N^ε-Z)-Leu-ONp (получен обработкой соединения (I) HCl в этилацетате) в 4.5 мл DMF добавляли 0.39 г (2.8 ммоль) TEA. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин и вносили 0.82 г (2.2 ммоль) Вос-Tyr(OBzl)-ОН. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд последовательно добавляли 0.31 г (2.3 ммоль) НОВт и 0.41 мл (2.6 ммоль) DIPС. Время прохождения реакции – 12 ч. Очистку и выделение трипептида проводили по методике, описанной для соединения (I). Выход соединения (II) составил 1.45 г (76%) с т. пл. 93°C; $[\alpha]_D^{25} -7.792 \pm 0.0^\circ$ (с 0.00308 г/мл, MeOH), R_f 0.90 (А). ESI MS, m/z : 868.9 $[M + H]^+$, 1758.8 $[2M + Na]^+$.

Вос-Asn-Tyr(OBzl)-Lys(N^ε-Z)-Leu-ONp (III). К раствору 1.21 г (1.5 ммоль) HCl·H-Tyr(OBzl)-Lys(N^ε-Z)-Leu-ONp (получен обработкой соединения (II) HCl в этилацетате) в 4 мл DMF добавляли 0.26 мл (1.9 ммоль) TEA. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин и вносили 0.4 г (1.7 ммоль) Вос-Asn-ОН. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд последовательно добавляли 0.22 г (1.6 ммоль) НОВт и 0.28 мл (1.8 ммоль) DIPС. Время прохождения реакции – 8 ч. Очистку и выделение тетрапептида проводили по методике, описанной для соединения (I). Выход соединения (III) составил 1.15 г (78%) с т. пл. 81–82°C; $[\alpha]_D^{25} -38.561 \pm 0.242^\circ$ (с 0.00196 г/мл, MeOH), R_f 0.88 (А), R_f 0.79 (Б). ESI MS, m/z : 983.1 $[M + H]^+$, 1005.1 $[M + Na]^+$, 2010.0 $[2M + 2Na]^+$.

Вос-Tyr(OBzl)-Asn-Tyr(OBzl)-Lys(N^ε-Z)-Leu-ONp (IV). К раствору 1.02 г (1.1 ммоль) HCl·H-Asn-Tyr(OBzl)-Lys(N^ε-Z)-Leu-ONp (получен обработкой соединения (II) HCl в этилацетате) в 4 мл DMF добавляли 0.26 мл (1.9 ммоль) TEA. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин и вносили 0.4 г (1.7 ммоль) Вос-Asn-ОН. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд добавляли последовательно 0.22 г (1.6 ммоль) НОВт и 0.28 мл (1.8 ммоль) DIPС. Время прохождения реакции – 8 ч. Очистку и выделение пентапептида проводили по методике, описанной для соединения (I). Выход соединения (IV) составил 1.15 г (78%) с т. пл. 97–102°C; $[\alpha]_D^{25} -5.069 \pm 0.537^\circ$ (с 0.0032, MeOH), R_f 0.88 (А), R_f 0.79 (Б). ESI MS, m/z : 1236.2 $[M + H]^+$, 1258.3 $[M + Na]^+$.

Вос-Asp(OBzl)-Tyr(OBzl)-Asn-Tyr(OBzl)-Lys(N^ε-Z)-Leu-ONp (V). К раствору 0.9 г (1 ммоль) HCl·Tyr(OBzl)-Asn-Tyr(OBzl)-Lys(N^ε-Z)-Leu-ONp (получен обработкой соединения (IV) HCl в этилацетате) в 3.5 мл DMF добавляли 0.18 мл (1.3 ммоль) TEA. Реакционную смесь

перемешивали в течение 20 мин и вносили 0.39 г (1.2 ммоль) Вос-Asp(OBzl)-ОН. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд последовательно добавляли 0.15 г (1.1 ммоль) НОВт и 0.19 мл (1.2 ммоль) DIPС. Время прохождения реакции – 8 ч. Обработку реакционной смеси проводили по методике, описанной для соединения (I). Выход соединения (V) составил 0.8 г (67%) с т. пл. 94–96°C; $[\alpha]_D^{25} -12.356 \pm 0.123^\circ$ (с 0.00467 г/мл, MeOH), R_f 0.63 (А). ESI MS, m/z : 1141.7 $[M + H]^+$, 1462.7 $[M - H + Na]^+$, 2927.2 $[2M + 2Na]^+$.

Вос-Ile-Ala-ОН (VI). К раствору 0.48 г (5 ммоль) аланина в 3 мл воды добавляли Вос-Ile-OSu, полученный без выделения в диоксане из 1.15 г (5.0 ммоль) Вос-Ile-ОН при добавлении 0.59 г (5.1 ммоль) НОСу и 1.07 г (5.2 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали в течение 5 ч, затем диоксан упаривали в вакууме, а остаток подкисляли 9%-ным раствором лимонной кислоты до pH 5. Продукт трижды экстрагировали этилацетатом, (3 × 5 мл), сушили этилацетатные вытяжки над Na₂SO₄. После сушки этилацетат упаривали, а образовавшийся остаток растирали с петролейным эфиром и сушили над P₂O₅. Получили 1.13 г (74%) маслообразного соединения (VI) с т. пл. 127–128°C; $[\alpha]_D^{25} -32.739 \pm 0.854^\circ$ (с 0.0092 г/мл, MeOH), R_f 0.93 (А). ESI MS, m/z : 303.3 $[M + H]^+$, 324.3 $[M - H + Na]^+$, 627.7 $[2M + Na]^+$.

Вос-Lys(N^ε-Z)-Ile-Ala-ОН (VII). К раствору 0.65 г (2.7 ммоль) HCl·H-Ile-Ala-ОН (получен обработкой соединения (VI) HCl в этилацетате) в 2 мл DMF добавляли 0.42 мл (3.5 ммоль) TEA. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин и вносили Вос-Lys(N^ε-Z)-OSu, полученный без выделения в диоксане из 1.22 г (3.2 ммоль) Вос-Ile-ОН при добавлении 0.44 г (3.8 ммоль) НОСу и 0.8 г (3.9 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали в течение 5 ч, затем диоксан упаривали в вакууме, а остаток подкисляли 9%-ным раствором лимонной кислоты до pH 5. Продукт трижды экстрагировали этилацетатом (3 × 5 мл), сушили этилацетатные вытяжки над Na₂SO₄. После сушки этилацетат упаривали, а образовавшийся остаток растирали с петролейным эфиром и сушили над P₂O₅. Получили 1.13 г (74%) маслообразного соединения (VII) с т. пл. 82–83°C $[\alpha]_D^{25} -6.545 \pm 0.17^\circ$ (с 0.0044 г/мл, MeOH), R_f 0.94 (А), R_f 0.83 (Б). ESI MS, m/z : 565.7 $[M + H]^+$, 587.7 $[M + Na]^+$.

Вос-Lys(N^ε-Z)-Ile-Ala-Asp(OBzl)-Tyr(OBzl)-Asn-Tyr(OBzl)-Lys(N^ε-Z)-Leu-ONp (VIII). К раствору 0.56 г (0.4 ммоль) HCl·H-Asp(OBzl)-Tyr(OBzl)-Asn-Tyr(OBzl)-Lys(N^ε-Z)-Leu-ONp (получен обработкой соединения (V) HCl в

этилацетате) в 3 мл смеси DMF/CH₂Cl₂ в соотношении 1 : 1 добавляли 0.06 мл (0.5 ммоль) ТЕА. Перемешивали реакционную смесь в течение 20 мин и вносили 0.23 г (0.4 ммоль) Boc-Lys(N^ε-Z)-Phe-Ala-OH. После охлаждения до 0 °С в реакционный сосуд прибавляли последовательно 0.05 г (0.4 ммоль) HOBt и 0.08 мл (0.5 ммоль) DIPIC. После окончания реакции (6 ч) осадок отфильтровывали, промывали на фильтре 0.5 мл DMF. В фильтрат добавляли 15 мл диэтилового эфира, выпавший осадок переосаждали из метанола эфиром. Очистку соединения проводили методом колоночной хроматографии на сефадексе G-10 (0.02–0.045 мм), используя в качестве элюента смесь хлороформ/метанол/вода в соотношении 20 : 24 : 1. Фракции, содержащие чистый пептид, объединяли и упаривали. После сушки в эксикаторе получили 0.39 г (60%) соединения (**VIII**) с т. пл. 121–122 °С; $[\alpha]_D^{25} -24.667 \pm 0.228^\circ$ (с 0.003 г/мл, уксусная кислота), R_f 0.85 (А), 0.80 (В). По данным ВЭЖХ содержание целевого соединения (**VIII**) составило 98%. ESI MS, m/z : 1942.8 $[M+H]^+$, 1964.7 $[M+Na]^+$, 1986.9 $[M-H+2Na]^+$.

HCl·H-Lys-Phe-Ala-Asp-Tyr-Asn-Tyr-Lys-Leu-OH (IX). Через раствор 0.16 г (0.1 ммоль) соединения (**VIII**) в смеси 1 мл уксусной кислоты и 2 мл метанола пропускали в течение 5 ч ток водорода в присутствии катализатора – 2.5 мг палладиевой черни – при постоянном перемешивании. После деблокирования пептида (контроль ТСХ) катализатор отделяли фильтрованием, фильтрат упаривали, а к остатку добавляли 1 мл этилацетата и 1.7 мл 4.5 М раствора HCl в этилацетате. Перемешивали взвесь в течение 45 мин, растворитель упаривали, а остаток промывали этилацетатом, эфиром, сушили в эксикаторе над NaOH. Выход соединения (**IX**) составил 0.109 г (94%), т. пл. 230–232 °С; $[\alpha]_D^{25} -2.043 \pm 0.138^\circ$ (с 0.0102 г/мл, вода), R_f 0.31 (Б). По данным ВЭЖХ содержание целевого пептида (**IX**) составило 96%. ESI MS, m/z : 1164.9 $[M+H]^+$, 1185.9 $[M-H+Na]^+$, 2291.3 $[2M-HCl]^+$.

Boc-Gln-Thr-OMe (X). К раствору 1.00 г (5.9 ммоль) хлоргидрата метилового эфира треонина в 4 мл DMF добавляли 2.5 г (5.9 ммоль) дициклогексиламмонийной соли Boc-Gln-OH. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин, после охлаждения до 0 °С в реакционный сосуд последовательно добавляли 0.84 г (6.2 ммоль) HOBt и 1.1 мл (7.1 ммоль) DIPIC. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при 0 °С и 6 ч при комнатной температуре, осадок отфильтровывали, промывали на фильтре 1 мл

DMF. В фильтрат добавляли 12 мл этилацетата и полученный раствор промывали 9%-ным раствором лимонной кислоты, 5%-ным раствором NaHCO₃, насыщенным раствором NaCl, водой, затем сушили над Na₂SO₄. После сушки этилацетат упаривали, а образовавшийся остаток растирали с петролейным эфиром и сушили над P₂O₅. После сушки в эксикаторе получили 1.81 г (85%) пептида (**I**) с т. пл. 65–67 °С; $[\alpha]_D^{25} -12.333 \pm 0.972^\circ$ (с 0.0012 г/мл, MeOH), R_f 0.98 (А), 0.88 (Б). Масс-спектр ESI, m/z : 362.22 $[M+H]^+$, 383.21 $[M-H+Na]^+$, 406.21 $[M-H+2Na]^+$.

Boc-Gly-Gln-Thr-OMe (XI). К раствору 1.34 г (4.5 ммоль) HCl·H-Gln-Thr-OMe (получен обработкой соединения (**X**) HCl в этилацетате) в 5.5 мл DMF добавляли 0.71 мл (5.8 ммоль) ТЕА. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин и вносили 0.85 г (4.5 ммоль) Boc-Gly-OH. После охлаждения до 0 °С в реакционный сосуд последовательно добавляли 0.63 г (4.7 ммоль) HOBt и 0.84 мл (5.4 ммоль) DIPIC. Время прохождения реакции – 6 ч. Обработку синтеза проводили по методике, описанной для соединения (**I**). Выход соединения (**XI**) составил 1.75 г (83%); $[\alpha]_D^{25} -10.386 \pm 0.653^\circ$ (с 0.0015 г/мл, MeOH), R_f 0.91 (Б), 0.95 (А). ESI MS, m/z : 469.8 $[M+H]^+$, 490.8 $[M-H+Na]^+$, 960.6 $[2M+Na]^+$.

Boc-Ala-Pro-OH (XII). К раствору 0.48 г (4.2 ммоль) пролина в 3 мл воды добавляли Boc-Ala-OSu, полученный без выделения в диоксане из 1 г (5.3 ммоль) Boc-Ala-OH при добавлении 0.72 г (6.3 ммоль) HOSu и 1.31 г (6.3 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали в течение 5 ч, затем диоксан упаривали в вакууме, а остаток подкисляли 9%-ным раствором лимонной кислоты до pH 5. Продукт трижды экстрагировали этилацетатом (3 × 5 мл), сушили этилацетатные вытяжки над Na₂SO₄. После сушки этилацетат упаривали, а образовавшийся остаток растирали с петролейным эфиром и сушили над P₂O₅. Получили 1.1 г (73%) соединения (**XII**) в виде масла $[\alpha]_D^{25} -16.160 \pm 0.196^\circ$ (с 0.00574 г/мл, MeOH), R_f 0.86 (А). ESI MS, m/z : 287.2 $[M+H]^+$, 574.4 $[2M+H]^+$.

Boc-Ala-Pro-Gly-Gln-Thr-OMe (XIII). К раствору 0.81 г (2.0 ммоль) HCl·H-Gly-Gln-Thr-OMe (получен обработкой соединения (**XI**) HCl в этилацетате) в 3.5 мл DMF вносили 0.43 мл (2.6 ммоль) DIPEA. Перемешивали реакционную смесь в течение 20 мин, поскольку добавление данного количества основания не привело к нужному значению pH 8–9 в реакционной смеси, добавляли еще 0.3 мл DIPEA, затем вносили 0.56 г (2.0 ммоль) Boc-Ala-Pro-OH. После охлаждения

до 0°C в реакционный сосуд последовательно добавляли 0.28 г (2.1 ммоль) HOBt и 0.37 мл (2.4 ммоль) DIPIC. После окончания реакции (8 ч) осадок отфильтровывали, промывали на фильтре 0.5 мл DMF. В фильтрат добавляли 12 мл этилацетата и полученный раствор промывали 9%-ным раствором лимонной кислоты, 5%-ным раствором NaHCO₃, насыщенным раствором NaCl, водой, затем сушили над Na₂SO₄. После сушки этилацетат упаривали, а образовавшийся остаток растирали с петролевым эфиром и сушили над P₂O₅. После сушки в эксикаторе получили 0.89 г (66%) пептида (XIII) с т. пл. 87–89°C; $[\alpha]_D^{25} -25.765 \pm 0.115^\circ$ (*c* 0.00345 г/мл, MeOH), *R_f* 0.86 (A), 0.73 (B). ESI MS, *m/z*: 674.1 [*M* + H]⁺, 696.2 [*M* + Na]⁺, 1347.1 [*2M* + H]⁺.

Boc-Val-Arg(NO₂)-OH (XIV). Нитроаргинин в количестве 0.83 г (3.8 ммоль) растворяли в 3 мл 1 н. NaOH, добавляли Boc-Val-OSu, полученный без выделения в диоксане из 1.01 г (5.0 ммоль) Boc-Val-OH при добавлении 0.63 г (5.5 ммоль) HOSu и 1.23 г (6.0 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали в течение 12 ч, затем диоксан упаривали в вакууме, а остаток подкисляли 9%-ным раствором лимонной кислоты до pH 5. Продукт трижды экстрагировали этилацетатом (3 × 5 мл), сушили этилацетатные вытяжки над Na₂SO₄. После сушки этилацетат упаривали, а образовавшийся остаток растирали с петролевым эфиром и сушили над P₂O₅. Получили 0.63 г (75%) соединения (XIV) с т. пл. 69–70°C; $[\alpha]_D^{25} -17.735 \pm 0.146^\circ$ (*c* 0.00642 г/мл, MeOH), *R_f* 0.78 (A). ESI MS, *m/z*: 464.5 [*M* + 2Na]⁺.

Boc-Gln-Ile-OH (XV). Изолейцин в количестве 0.43 г (3.3 ммоль) растворяли в 3 мл 1 н. NaOH, добавляли Boc-Gln-OSu, полученный без выделения в диоксане из 1 г (4.1 ммоль) Boc-Gln-OH при добавлении 0.56 г (4.9 ммоль) HOSu и 1.01 г (4.9 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали в течение 8 ч, затем диоксан упаривали в вакууме, а остаток подкисляли 9%-ным раствором лимонной кислоты до pH 5. Продукт трижды экстрагировали этилацетатом (3 × 5 мл), сушили этилацетатные вытяжки над Na₂SO₄. После сушки этилацетат упаривали, а образовавшийся остаток растирали с петролевым эфиром и сушили над P₂O₅. Получили 0.83 г (70%) соединения (XV) с т. пл. 123–129°C; $[\alpha]_D^{25} -16.224 \pm 0.383^\circ$ (*c* 0.00196 г/мл, MeOH), *R_f* 0.75 (A), *R_f* 0.82 (B). ESI MS, *m/z*: 381.3 [*M* – H + Na]⁺.

Boc-Val-Arg(NO₂)-Gln-Ile-OH (XVI). К раствору 0.6 г (2.0 ммоль) HCl·H-Gln-Ile-OH (получен обработкой соединения (XV) HCl в этилацетате) в 3 мл DMF приливали 0.36 мл

(2.6 ммоль) TEA. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин и добавляли Boc-Val-Arg(NO₂)-OSu (получен без выделения в DMF из 0.97 г (2.3 ммоль) соединения (XIV) при добавлении 0.31 г (2.7 ммоль) HOSu и 0.56 г (2.7 ммоль) DCC). Реакционную смесь перемешивали в течение 5 ч, осадок отфильтровывали. В фильтрат добавляли 20 мл диэтилового эфира. После двукратного переосаждения из метанола диэтиловым эфиром и сушки в вакууме над P₂O₅ получили 0.9 г (68%) (XVI) с т. пл. 120–122°C; $[\alpha]_D^{25} -10.569 \pm 0.087^\circ$ (*c* 0.00562 г/мл, MeOH), *R_f* 0.75 (A), *R_f* 0.86 (B). ESI MS, *m/z*: 682.3 [*M* – H + Na]⁺, 703.4 [*M* – 2H + 2Na]⁺.

Boc-Val-Arg(NO₂)-Gln-Ile-Ala-Pro-Gly-Gln-Thr-OMe (XVII). К раствору 0.42 г (0.7 ммоль) HCl·H-Ala-Pro-Gly-Gln-Tyr-OMe (получен обработкой соединения (XIII) HCl в этилацетате) в 2 мл DMF приливали 0.12 мл (0.9 ммоль) TEA. Перемешивали реакционную смесь в течение 20 мин и вносили 0.46 г (0.7 ммоль) Boc-Val-Arg(NO₂)-Gln-Ile-OH. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд добавляли последовательно 0.1 г (0.7 ммоль) HOBt и 0.12 мл (0.8 ммоль) DIPIC. После окончания реакции (8 ч) осадок отфильтровывали, промывали на фильтре 0.5 мл DMF. В фильтрат добавляли 15 мл диэтилового эфира, выпавший осадок переосаждали из метанола эфиром. Очистку соединения проводили методом колоночной хроматографии на сефадексе G-10 (0.02–0.045 мм), используя в качестве элюента смесь хлороформ/метанол/вода в соотношении 20 : 24 : 1. Фракции, содержащие чистый пептид, объединяли и упаривали. После сушки в эксикаторе получили 0.6 г (71%) соединения (XVII). *R_f* 0.82 (A). По данным ВЭЖХ содержание целевого соединения (XVII) составляло 98%. ESI MS, *m/z*: 1216.1 [*M* + H]⁺, 1237.2 [*M* – H + Na]⁺.

HCl·H-Val-Arg-Gln-Ile-Ala-Pro-Gly-Gln-Thr-OMe (XVIII). Через раствор 0.2 г (0.16 ммоль) соединения (XVII) в 2 мл уксусной кислоты пропускали в течение 8 ч ток водорода в присутствии катализатора (3 мг палладиевой черни) при постоянном перемешивании. После деблокирования пептида (контроль ТСХ) катализатор отделяли фильтрованием, фильтрат упаривали, а к остатку добавляли 1 мл этилацетата и 2.4 мл 4.5 М раствора HCl в этилацетате. Перемешивали взвесь в течение 45 мин, растворитель упаривали, а остаток промывали этилацетатом, эфиром, сушили в эксикаторе над NaOH. Выход соединения (XVIII) составил 0.145 г (81%), *R_f* 0.40 (B) с т. пл. 124–

126°C; $[\alpha]_D^{25} -9.659 \pm 0.180^\circ$ (c 0.00352 г/мл, вода). По данным ВЭЖХ содержание целевого пептида (XVIII) составляло 97%. ESI MS, m/z : 984.8 $[M+H-HCl]^+$, 1005.8 $[M-H+Na-HCl]^+$, 2013.5 $[2M+2Na-HCl]^+$.

FITC-Lys-Ile-Ala-Asp-Tyr-Asn-Tyr-Lys-Leu-OH. Соединение (IX) в количестве 0.09 г (0.08 ммоль) растворяли в 2 мл смеси DMF/ CH_2Cl_2 в соотношении 1 : 1, добавляли 13.3 мкл (0.1 ммоль) TEA, перемешивали в течение 15 мин и вносили 0.031 г (0.08 ммоль) FITC. После окончания реакции (4 ч) осадок отфильтровывали, а к фильтрату добавляли 10 мл диэтилового эфира. Выпавший осадок переосаждали из метанола эфиром, сушили в вакууме над P_2O_5 . Получили 0.12 г флуоресцентно меченого соединения (IX) с количественным выходом.

FITC-Val-Arg-Gln-Ile-Ala-Pro-Gly-Gln-Thr-OMe получали аналогичным способом. Соединение (XVIII) в количестве 0.12 г (0.11 ммоль) растворяли в 2 мл смеси DMF/ CH_2Cl_2 в соотношении 1 : 1, добавляли 20.9 мкл (0.15 ммоль) TEA, перемешивали в течение 15 мин и вносили 0.043 г (0.11 ммоль) FITC. После окончания реакции (4 ч) осадок отфильтровывали, а к фильтрату добавляли 10 мл диэтилового эфира. Выпавший осадок переосаждали из метанола эфиром, сушили в вакууме над P_2O_5 . Получили 0.15 г флуоресцентно меченого соединения (XVIII) с количественным выходом.

Добровольцы. Обследовали 80 добровольцев, чьи образцы венозной крови были собраны в период пандемии COVID-19 в 2020–2021 гг. Участники заполняли ретроспективную анкету, давали добровольное информированное согласие. Вопросы в анкетах касались анамнеза (в том числе по COVID-19), возраста, наличия хронических заболеваний. Переболевшими считались лица с подтвержденным наличием SARS-CoV-2 в мазках из носоглотки методом ПЦР, что не исключало обследуемых с бессимптомным носительством SARS-CoV-2 в анамнезе. При анализе 80 анкет выявили, что 28 человек переболели COVID-19 за 3–12 месяцев до исследования. Среди обследуемых оказалось 13 женщин (16.25%) и 67 мужчин (83.75%). Получивших две дозы инактивированной вакцины Vero Cell (Sinovac Life Sciences Co., КНР) было трое (3.75%), привитых вакциной Спутник V и Спутник Лайт (ФГБУ “НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи”, Россия) – четыре человека (5%). Среди переболевших COVID-19 вакцинированных не было, наблюдалось бессимптомное течение или острая респираторная инфекция легкой степени тяжести. Средний возраст участников составил

26.9 ± 9.4 года. Осуществляли забор 5 мл венозной крови из кубитальной вены в стеклянную пробирку со 100 мкл гепарина (100 ед.).

Показатели клеточного иммунитета определяли методом проточной цитометрии на приборе Cytomics FC 500 (Beckman Coulter Inc., США) и меченных FITC, R-фикоэритрином (PE), конъюгатом PE-Texas Red (PE-TR) моноклональных антител (Сорбент, Россия).

К 100 мкл цельной гепаринизированной крови добавляли 2.5 мкл водного раствора флуоресцентно меченого пептида в концентрации 1 мл/мл и моноклональные антитела CD45 PE-TR, содержимое перемешивали пипетированием и помещали в темное место при комнатной температуре на 15 мин. Добавляли 500 мкл лизирующего эритроциты раствора OptiLyse C (Beckman Coulter Inc., США) и помещали в термостат (37°C, 10 мин), после чего добавляли 500 мкл буферного раствора и исследовали на проточном цитометре клетки крови в количестве 30 000 клеток (лейкоциты, лимфоциты, моноциты, нейтрофилы и эозинофилы).

К 500 мкл крови добавляли 2.5 мкл водного раствора немеченого пептида в концентрации 1 мл/мл, встряхивали 5 с на шейкере, термостатировали в течение 15 мин при 37°C, добавляли по 2.5 мкл моноклональных антител CD63 FITC, CD203c PE, содержимое перемешивали пипетированием и помещали в темное место при комнатной температуре на 15 мин. Затем добавляли 500 мкл раствора OptiLyse C и помещали в термостат с температурой 37°C на 10 мин, добавляли 500 мкл буферного раствора и исследовали на проточном цитометре 30 000 клеток (активированные базофилы CD203c⁺).

К 100 мкл крови добавляли 2.5 мкл моноклональных антител CD69 FITC и CD45 PE-TR, содержимое перемешивали пипетированием и помещали в темное место при комнатной температуре на 15 мин. Добавляли 500 мкл раствора OptiLyse C и помещали в термостат с температурой 37°C на 10 мин, далее в пробирку вносили 500 мкл буферного раствора и исследовали на проточном цитометре 30 000 клеток (активированные лимфоциты CD69⁺).

К 500 мкл крови добавляли 2.5 мкл водного раствора немеченого пептида в концентрации 1 мл/мл, встряхивали в течение 5 с на шейкере и помещали в термостат на одни сутки. Затем добавляли моноклональные антитела CD45 PE-TR, содержимое перемешивали пипетированием и помещали в темное место при комнатной температуре на 15 мин. Вносили 500 мкл

раствора OptiLyse C и помещали в термостат при 37°C на 10 мин, после чего добавляли 500 мкл буферного раствора и исследовали клетки крови на проточном цитометре в количестве 30 000 клеток (лейкоциты, лимфоциты, моноциты, нейтрофилы и эозинофилы). После центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 мин получали для замораживания надосадочную жидкость, содержащую IFN-γ. В качестве стандартного раствора для определения IFN-γ использовали надосадочную жидкость, полученную при термостатировании в течение суток и центрифугировании при 3000 об/мин в течение 10 мин цельной гепаринизированной крови. Содержание IFN-γ определяли методом иммуноферментного анализа с использованием диагностических тест-систем ЗАО “Вектор-Бест” (Новосибирск, Россия).

Статистический анализ данных проводили с использованием непараметрических критериев Манна–Уитни с использованием программы Statistica 10 (StatSoft Inc., США).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенной работы осуществлен синтез фрагментов поверхностного Spike-белка коронавируса SARS-CoV-2 – Lys-Ile-Ala-Asp-Tyr-Asn-Tyr-Lys-Leu (417–425 а.о.) и Val-Arg-Gln-Ala-Pro-Asn-Gly-Gln-Thr (407–415 а.о.). На примере данных соединений апробирован метод, позволяющий оценивать влияние коротких пептидов на лейкоциты крови. Показано, что полученные пептиды достоверно взаимодействуют с лейкоцитами, активируя их посредством секреции IFN-γ. Предложенный нами метод оценки влияния коротких пептидов на клетки крови стал первым шагом в разработке новой пептидной вакцины против COVID-19.

В дальнейших исследованиях мы планируем увеличить количество участников исследования, использовать моноклональные антитела против биомаркера стволовых клеток CD34, исследовать другие синтезированные пептиды иных возбудителей инфекционных заболеваний, а также проанализировать возможный HLA-A-фенотип будущих участников исследования и сопоставить с имеющейся информацией в общедоступной базе биоинформационных данных.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты, выполненные в данном исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и

Хельсинской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Программа исследования одобрена Этическим комитетом Витебского государственного медицинского университета (протокол № 1 от 25.02.2021 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mathieu E., Ritchie H., Ortiz-Ospina E., Roser M., Hasell J., Appel C., Giattino Ch., Rodés-Guirao L. // *Nat. Hum. Behav.* 2021. V. 5. P. 947–953. <https://doi.org/10.1038/s41562-021-01122-8>
- Pollard A.J., Bijker E.M. // *Nat. Rev. Immunology.* 2021. V. 21. P. 83–100. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00479-7>
- Park J.H., Lee H.K. // *Vaccines.* 2021. V. 9. P. 524–539. <https://doi.org/10.3390/vaccines9050524>
- Yang H., Cao J., Lin X., Yue J., Zieneldien T., Kim J., Wang L., Fang J., Huang R.-P., Bai Yu., Sneed K., Cao Ch. // *Viruses.* 2022. V. 14. P. 449–463. <https://doi.org/10.3390/v14030449>
- Heidary M., Kariar V.H., Shirani M., Ghanavati R., Motahar M., Sholeh M., Ghahramanpour H., Khoshnood S. // *Front. Microbiol.* 2022. V. 13. P. 927306–927306. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.927306>
- Chiplunkar S., Baravkar A., Paricharak S., Masal A., Aher N. // *J. Young. Pharm.* 2022. V. 14. P. 133–139.
- Triccas J.A., Kint J., Wurm F.M. // *NPJ Vaccines.* 2022. V. 7. P. 1–2. <https://doi.org/10.1038/s41541-022-00507-8>
- Hanan N., Doud R.L., Jr., Park In-W., Jones H.P., Mathew S.O. // *Vaccines.* 2021. V. 9. P. 596–613. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060596>
- Крум Н.А., Филатова Н.П., Ковальчук О.В., Бесчастная Н.В. // *Биоорг. химия.* 1981. Т. 7. С. 965–970.
- Hermiston M.L., Xu Z., Weiss A. // *Annu. Rev. Immunol.* 2003. V. 21. P. 107–137. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.140946>
- Sancho D., Gomez M., Sanchez-Madrid F. // *Trends Immunol.* 2005. V. 26. P. 136–140. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.12.006>
- Gorelik A., Randriamihaja A., Illes K., Nagar B. // *FEBS J.* 2018. V. 285. P. 2481–2494. <https://doi.org/10.1111/febs.14489>
- Polis M.S., Klumperman J. // *Exp. Cell Res.* 2009. V. 315. P. 1584–1592. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.09.020>

14. Murugesan K., Jagannathan P., Pham Th.D., Pandey S., Bonilla H.F., Jacobson K., Parsonnet J., Andrews J.R., Weiskopf D., Sette A., Pinsky B.A., Singh U., Banaei N. // Clin. Infect. Dis. 2021. V. 73. P. 3130–3132.
<https://doi.org/doi: 10.1093/cid/ciaa1537>
15. Aiello A., Coppola A., Vanini V., Petrone L., Cuzzi G., Salmi A., Altera A.M.G., Tortorella C., Gualano G., Gasperini C., Scolieri P., Beccacece A., Vita S., Bruzese V., Lorenzetti R., Palmieri F., Nicastrì E., Goletti D. // Int. J. Infect. Dis. 2022. V. 122. P. 841–849.
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.07.049>
16. Todorovic-Rakovic N., Whitfield J.R. // Cytokine. 2021. V. 146. P. 1537–1556.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155637>

Synthesis of Peptide Fragments Spike Glycoprotein SARS-CoV-2 and Studying Their Binding with Human Blood Cells

O. V. Gribovskaya^{*,#}, V. V. Yanchenko^{}, A. M. Tsygankov^{**} and V. P. Martinovich**

[#] Phone: +375 17 373-87-53; e-mail: olymelnik@yandex.ru

^{*} Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
ul. Akad. Kuprevicha 5/2, Minsk, 220084 Belarus

^{**} Vitebsk State medical University, pr. Frunze 27, Vitebsk, 210023 Belarus

A new method was tested that allows to evaluate activation of the Spike surface protein of SARS-CoV-2 blood leukocytes by synthetic peptides, fragments Lys-Ile-Ala-Asp-Tyr-Asn-Tyr-Lys-Leu (417–425 aa) and Val-Arg-Gln-Ala-Pro-Asn-Gly-Gln-Thr (407–415 aa). It was found that these peptides, regardless of the HLA-A phenotype of the subjects, could bind to leukocytes, which indicates the universality of reactions to peptides, especially in innate immune cells. It was shown that the Lys-Ile-Ala-Asp-Tyr-Asn-Tyr-Lys-Leu peptide contacted the blood leukocytes of the subjects, activated the lymphocytes and basophils of the subjects (statistically significant), which was confirmed by an increase in gamma interferon compared to the Val-Arg-Gln-Ala-Pro-Asn-Gly-Gln-Thr. Thus, this work demonstrates an approach to creating a new peptide vaccine against COVID-19 at the stage of *in vitro* research.

Keywords: SARS-CoV-2, peptide synthesis, gamma interferon, cellular immunity



УДК 577.151.3;577.152.34

АТР-ЗАВИСИМЫЕ LonBA-ПРОТЕАЗЫ БАЦИЛЛ И КЛОСТРИДИЙ

© 2024 г. А. Г. Андрианова*, А. М. Куджаев*, И. В. Смирнов*, Т. В. Ротанова*, #

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

Поступила в редакцию 10.02.2024 г.

После доработки 21.02.2024 г.

Принята к публикации 22.02.2024 г.

Семейство Lon-протеаз относится к ключевым пептидгидролазам системы контроля качества белков (СКК), которая играет ведущую роль в поддержании сохранности клеточного протеома во всех природных царствах. При этом Lon-протеазы – единственное семейство АТР-зависимых протеаз СКК, которое объединяет целый ряд структурно различных подсемейств. Недавно было выдвинуто предположение о наличии в семействе Lon ранее неклассифицированного подсемейства LonBA, включающего ферменты бактерий классов Bacilli и Clostridia. С помощью биоинформатического анализа получены данные об особенностях строения ферментов предполагаемого нового подсемейства и о существовании двух различающихся групп Lon-протеаз в этом подсемействе.

Ключевые слова: контроль качества клеточного протеома, AAA⁺-белки, АТР-зависимый протеолиз, Lon-протеазы, подсемейства, бациллы, клостридии

DOI: 10.31857/S0132342324050073, EDN: LRAAQY

ВВЕДЕНИЕ

Семейство АТР-зависимых Lon-протеаз – один из наиболее значимых участников системы контроля качества (СКК) белков, играющей ведущую роль в поддержании сохранности клеточного протеома во всех доменах жизни (бактерии, археи, эукариоты). В недавно опубликованном обзоре [1] была дана развернутая характеристика Lon-протеаз и представлены сведения о строении и структурных особенностях представителей этого семейства. Практически одновременно нами были обнаружены бактериальные пептидгидролазы, относящиеся к семейству Lon, но имеющие значительные отличия от известных к тому времени Lon-протеаз. Результаты изучения ферментативных свойств и получение данных об уникальной кристаллической структуре протеазного домена Lon-протеазы из *Bacillus subtilis*, модельной для выявленного блока ферментов, позволили выдвинуть предположение о существовании ранее

неидентифицированного подсемейства LonBA-протеаз [2].

Цель данной работы – общая характеристика строения представителей предполагаемого нового LonBA-подсемейства, а также выявление индивидуальных особенностей структуры ферментов бактерий и клостридий, составляющих это подсемейство, с помощью биоинформатического анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подсемейства в семействе Lon-протеаз. В совокупности бифункциональных энергозависимых AAA⁺-протеаз, являющихся членами СКК, Lon-протеазы – это единственное семейство, которое состоит из ряда значительно различающихся подсемейств. Принятая в настоящее время классификация ферментов семейства Lon включает три основных подсемейства: LonA, LonB и LonC (рис. 1а) [1, 3–5]. В базе данных пептидгидролаз MEROPS

Сокращения: СКК – система контроля качества; AAA⁺ – АТРазы, ассоциированные с различными клеточными активностями.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 335-42-22; эл. почта: tatyana.rotanova@ibch.ru).

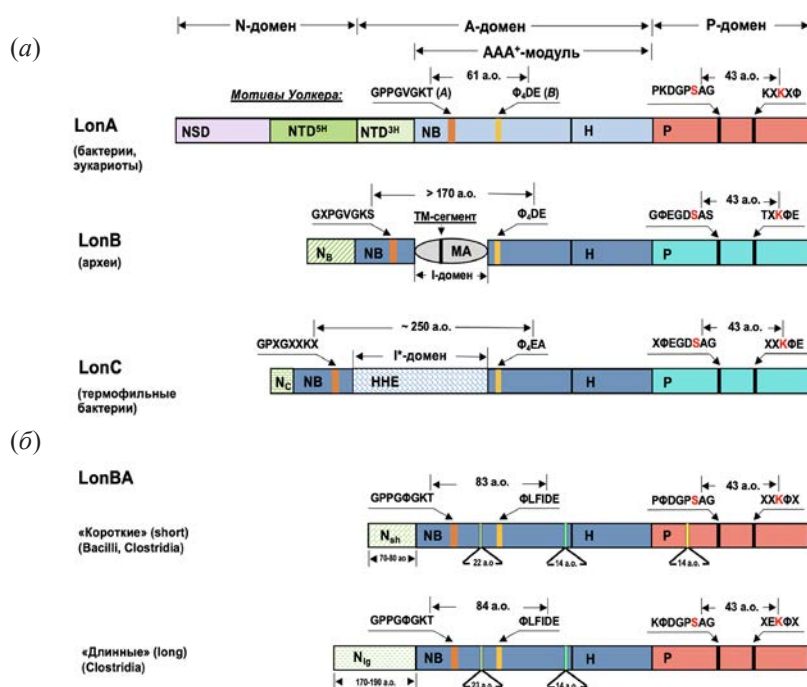


Рис. 1. Доменная организация и консенсусные элементы активных центров Lon-протеаз различных подсемейств. (а) – Lon-протеазы подсемейств А, В и С; (б) – Lon-протеазы подсемейства ВА. Субдомены NSD, NTD^{5H} и NTD^{3H} формируют N-концевую область LonA-протеаз. N_B, N_C, N_{sh} и N_{lg} – N-концевые фрагменты ферментов подсемейств В, С и ВА. Нуклеотид-связывающий (NB) и α-спирализованный (H) субдомены светло-голубого и синего цвета характеризуют AAA⁺-модули типов А и В соответственно. Мотивы Уолкера представляют АТРазный активный центр. I (MA, Membrane Anchoring) и I* (HNE, Helical Harpin Extension) – вставочные домены. Протеазные домены (P) кораллового цвета содержат активные центры А-типа, а бирюзового цвета – центры В-типа. Φ – остатки гидрофобных аминокислот, Х – остатки любых аминокислот. Каталитические остатки серина (S) и лизина (K) выделены красным цветом.

(<https://www.ebi.ac.uk/merops/>) [6] Lon-протеазы формируют семейство S16 клана SJ, разделенное на 25 идентификационных групп (ID). Каждое Lon-подсемейство объединяет представителей одной или нескольких ID-групп. При этом принадлежность той или иной Lon-протеазы к определенному подсемейству отражает не только различия их общей архитектуры, но и различия некоторых консенсусных элементов, а также природы источников ферментов. Так, Lon-протеазы, функционирующие в бактериях и эукариотах, образуют преобладающее подсемейство А (представители ID-групп S16.001, 002 и др.), ферменты подсемейства В (ID S16.005) – характеристические для архей, а немногочисленные LonC-протеазы (ID S16.007) обнаруживаются только в некоторых термофильных бактериях [1, 3–10].

Общей характеристикой для Lon-протеаз всех подсемейств служит локализация в центральной части их аминокислотных последовательностей АТРазного компонента (А-домен), а в С-концевой – пептидазного (серин-лизиновая пептидгидролаза,

Р-домен). Основные различия между членами подсемейств заключены в их N-концевых областях и во “вставочных” фрагментах (рис. 1а).

В Р-доменах ферментов семейства Lon выявлены два типа активных центров (А и В), которые различаются окружением остатков серина и лизина каталитической диады [11, 12]. При этом LonA-протеазы содержат центр типа А, а протеазы LonB и LonC – центры типа В (рис. 1а). Несмотря на отмеченные различия, кристаллические структуры Р-доменов ферментов разных подсемейств демонстрируют высокую степень топологического сходства [3, 13].

АТРазные А-домены Lon-протеаз состоят из характерных для белков AAA⁺-суперсемейства AAA⁺-модулей, сформированных нуклеотид-связывающими (NB или α/β) и α-спирализованными (H или α) субдоменами и дополнительными негомолотичными фрагментами (рис. 1а) [14–16]. Последние либо локализованы в N-концевой части А-домена (NTD^{3H}-субдомен у LonA-протеаз [3]), либо внедрены как вставочные домены в

NB-субдомены ферментов (домены I (MA) и I* (HNE) у LonB- и LonC-протеаз соответственно [17]) (рис. 1а). LonA-протеазы включают также протяженный N-концевой домен (N), состоящий из двух субдоменов: NSD и NTD^{SH} (рис. 1а) [3]. Следует заметить, что субдомены NTD^{SH} и NTD^{3H} в целом составляют фрагмент со вставочным coiled-coil-участком, который в работах [1, 18] рассматривается как индивидуальный α -спирализованный домен (HI(CC)).

В последнее время в ID-группе S16.005 произошли значительные изменения, обусловленные включением в эту группу блока бактериальных ферментов неархейного происхождения. Источники вновь включенных ферментов – исключительно бактерии классов Bacilli и Clostridia, относящихся к отряду Firmicutes. При этом общее количество бактериальных ферментов (168) намного превосходит количество “классических” архейных LonB-протеаз (22) группы S16.005 [6].

Анализ первичных структур бациллярных ферментов группы S16.005 показал, что их протеазные активные центры однозначно представляют тип А, а не В (рис. 1б), что противоречит первоначально принятой классификации Lon-протеаз. Вместе с тем у этих ферментов отсутствует характерная для LonA-протеаз пролонгированная N-концевая область, а их AAA⁺-модули содержат олигопептидные вставки, локализованные, как и у LonB-протеаз, между консенсусными мотивами Уолкера А и В. Однако размеры этих вставок (суммарно 22–23 а.о.) значительно отличаются от размеров крупных вставочных трансмембранных доменов истинных архейных LonB-протеаз (рис. 1б). Сочетание в бациллярных ферментах ID-группы S16.005 отдельных признаков LonA- и LonB-протеаз послужило основанием для предложения о выведении их в индивидуальное “гибридное” подсемейство Lon с наименованием “LonBA-протеазы” [2].

Новое “гибридное” подсемейство LonBA-протеаз. Изучение первого модельного фермента предполагаемого нового подсемейства – LonBA-протеазы из *Bacillus subtilis* (BsLonBA, MER0002228) – показало, что его базовые ферментативные свойства значительно отличаются от свойств как LonA-, так и LonB-протеаз. Более того, кристаллическая структура протеазного домена BsLonBA оказалась уникальной для семейства Lon-протеаз [2]. Тем самым была подтверждена корректность выделения бактериальных ферментов группы S16.005 в отдельное подсемейство.

При анализе членов ID-группы S16.005, представленных в бактериях класса Clostridia, выяснилось, что наряду с ферментами, подобными LonBA-протеазам, обнаруженным в бациллах, клостридии содержат ферменты LonBA-типа, N-концевая область которых более чем в 2 раза превышает N-концевой фрагмент LonBA-протеаз бацилл. Это означает, что вновь выявленное подсемейство LonBA сформировано двумя группами ферментов, различающихся размерами N-концевых фрагментов. К одной группе (LonBA-sh) относятся ферменты с “короткими” (short) N-фрагментами (N-sh, 70–80 а.о.), а к другой (LonBA-lg) – с “длинными” (long) N-фрагментами (N-lg, 170–190 а.о.) (рис. 1б). При этом следует подчеркнуть, что ферменты группы LonBA-sh представлены и в бациллах, и в клостридиях, а группы LonBA-lg – только в клостридиях. Исследованная нами [2] первая модельная BsLonBA-протеаза – член группы LonBA-sh.

Для выявления содержания Lon-протеаз различных подсемейств в бактериальных источниках был проведен скрининг ферментов семейства Lon у 58 бацилл и 110 клостридий, представленных в ID-группе S16.005. Установлено, что для большинства бацилл характерно наличие одной LonA- и одной LonBA-sh-протеазы (исключение составляет *Bacillus cereus*, у которой обнаружены две LonA- и три LonBA-sh-протеазы). У клостридий набор Lon-протеаз значительно шире. Все они содержат LonBA-протеазы (LonBA-sh либо LonBA-lg или одновременно оба варианта), а также (в большинстве случаев) протеазы подсемейства LonA. Кроме того, более чем у половины клостридий обнаружены еще и LonC-подобные протеазы. Наибольшее количество различных Lon-протеаз (24) было выявлено у хорошо изученного организма *Clostridium botulinum* [6].

В противоположность фирмикутам практически все архейные источники ферментов ID-группы S16.005 содержат исключительно “классические” LonB-протеазы, и только у трех организмов из двадцати двух обнаружены также протеазы LonA. Нужно заметить, что в *E. coli* единственный Lon-фермент – EcLonA-протеаза – основная модель для всего семейства. Представленность Lon-протеаз различных подсемейств в бактериях отряда Firmicutes в сравнении с протеобактериями и археями отражена в табл. 1 на примере четырех организмов: *B. subtilis*, *C. botulinum*, *E. coli* и *Archaeoglobus fulgidus*.

Для оценки консервативности структурных фрагментов, формирующих LonBA-протеазы,

Таблица 1. Содержание Lon-протеаз различных подсемейств в бактериях *B. subtilis*, *C. botulinum*, *E. coli* и *A. fulgidus* по данным базы MEROPS

Семейство Lon S16			Бактерии						Археи	
тип протеолитического центра	подсемейство		Proteobacteria		Firmicutes				Euryarchaeota	
					Bacilli		Clostridia			
			ID	<i>E. coli</i>	ID	<i>B. subtilis</i>	ID	<i>C. botulinum</i>	ID	<i>A. fulgidus</i>
A	LonA		001	0000485*	001 UPW	0000487 1037043	001	0078975 0113785 0245086 0360567 0476087	—	
	LonBA	short	—		005 UPW	0002228* 1030684 1037433	005 UPW	0078974* 0245087* 0361555 0475702 0475680* 1032601	—	
		long	—		—		005	0078953* 0114077* 0245321* 0475665 0475690 0475693	—	
	B	LonB		—		—		—		005
LonC- подобные		—		—		UPW	0079343 0114123 0245245 0472512 0472843 1030320 1035981	—		

Примечание: приведены номера ID-групп и индивидуальных ферментов (MERXXXXXXX). Прочерк – отсутствие ферментов указанной группы.

* Последовательности, сопоставленные на рис. 2.

было проведено выравнивание трех наборов последовательностей (по шесть представителей LonBA-протеаз бацилл, коротких и длинных LonBA-протеаз клостридий), результаты которого суммированы в табл. 2. Установлено, что наивысшую степень подобия (>80%) проявляют нуклеотид-связывающие (NB) субдомены всех групп ферментов (строки 1, 2 и 4 в табл. 2). Высокая степень подобия сохраняется и при

“перекрестном” сопоставлении NB-субдоменов всех коротких ферментов независимо от класса бактерий (строка 3). Однако подобие между NB-субдоменами коротких и длинных LonBA-протеаз клостридий заметно ниже (<70%) (строка 5).

Неожиданно оказалось, что у α-спирализованных субдоменов (H) степени подобия невысоки (~50%), и они еще больше снижаются в перекрестных группах (до 38 и 29%) (строки 1–5).

Таблица 2. Степени подобия фрагментов последовательностей “коротких” и “длинных” LonBA-протеаз бацилл и клостридий

№	Источники ферментов		Фрагменты ферментов							
	организмы	количество ферментов	N-концевой фрагмент		NB-субдомен		H-субдомен		P-домен	
			размер, а.о.	подобие, %	размер, а.о.	подобие, %	размер, а.о.	подобие, %	размер, а.о.	подобие, %
LonBAs-short										
1	Bacilli	6	73	67.1	190	89.5	92	51.1	185	66.5
2	Clostridia	6	80	46.3	190	86.3	90	55.6	184	63.0
3	Bacilli/Clostridia	12	80	35.0	190	81.6	92	38.0	185	53.0
LonBAs-long										
4	Clostridia	6	183	41.6	190	83.8	97	56.7	169	72.8
LonBAs-(short/long)										
5	Clostridia	12	80	17.5	191	67.5	97	28.9	185	42.2
EcLonA*/LonBAs (bac-clos)										
6	LonA/bac-LonBA	7	н.о.**	н.о.	201	41.8	118	21.2	195	41.5
7	LonA/clos-LonBA-sh	7	н.о.	н.о.	192	39.6	149	20.8	194	46.4
8	LonA/clos-LonBA-lg	7	н.о.	н.о.	203	42.4	123	23.6	180	52.2

Примечание: источники ферментов – класс Bacilli (LonBAs-short): *B. subtilis* (MER0002228), *Alicyclobacillus acidocaldarius* (MER0127779), *B. cereus* (MER0029009), *Brevibacillus brevis* (MER0166780), *Paenibacillus lactis* (MER0361527), *Sporolactobacillus inulinus* (MER0361592); класс Clostridia (LonBAs-short/long): *C. botulinum* (MER0078974/MER0078953), *C. cellulovorans* (MER0222493/MER0361471), *C. saccharoperbutylacetonicum* (MER0357376/MER0356900), *Desulfosporosinus acidiphilus* (MER0361501/MER0361560), *Syntrophomonas wolfei* (MER0080698/MER0051945), *Thermosinus carboxydvorans* (MER0088465/MER0088447).

* EcLonA – LonA-протеаза из *E. coli* (MER0000485).

** н.о. – не определяли.

Можно предположить, что значительная разница между субдоменами NB и H по консервативности может негативно отразиться на функциональной активности AAA⁺-модулей, которые они формируют. Относительно невысокое подобие демонстрируют также группы N-концевых фрагментов (особенно в своих перекрестных вариантах) (табл. 2).

Кардинальное различие между P-доменами коротких и длинных LonBA-протеаз было выявлено при выравнивании полноразмерных последовательностей этих групп ферментов. Оказалось, что в длинных LonBA-протеазах отсутствует фрагмент, соответствующий 14-членной β-структурированной вставке, обнаруженной в бациллярных LonBA-протеазах, наличие которой определяет уникальность укладки их P-доменов [2]. Видимо, это служит основной причиной невысокого подобия (~40%) доменов коротких и длинных LonBA-протеаз клостридий (табл. 2, строка 5).

На рис. 2 представлено сопоставление последовательностей BsLonBA, а также трех коротких и трех длинных LonBA-протеаз *C. botulinum* с последовательностью модельной EcLonA-протеазы, выполненное с учетом известных данных по 3D-структурам EcLonA и BsLonBA. При этом в отношении BsLonBA были использованы экспериментально определенная кристаллическая структура P-домена и предсказанная структура A-фрагмента этого фермента [2]. Вторичная структура CbLonBA-lg1 – одной из длинных LonBA-протеаз *C. botulinum* – предсказана с помощью программы PSSpred (<https://zhanggroup.org/PSSpred/>).

Как следует из рис. 2, вторичная структура CbLonBA-lg1 в целом соответствует структуре BsLonBA. При этом N-концевой фрагмент CbLonBA-lg1, предшествующий AAA⁺-модулю фермента, как и в случае BsLonBA и EcLonA, состоит из ряда крупных α-спиралей. Однако значительного подобия между этими

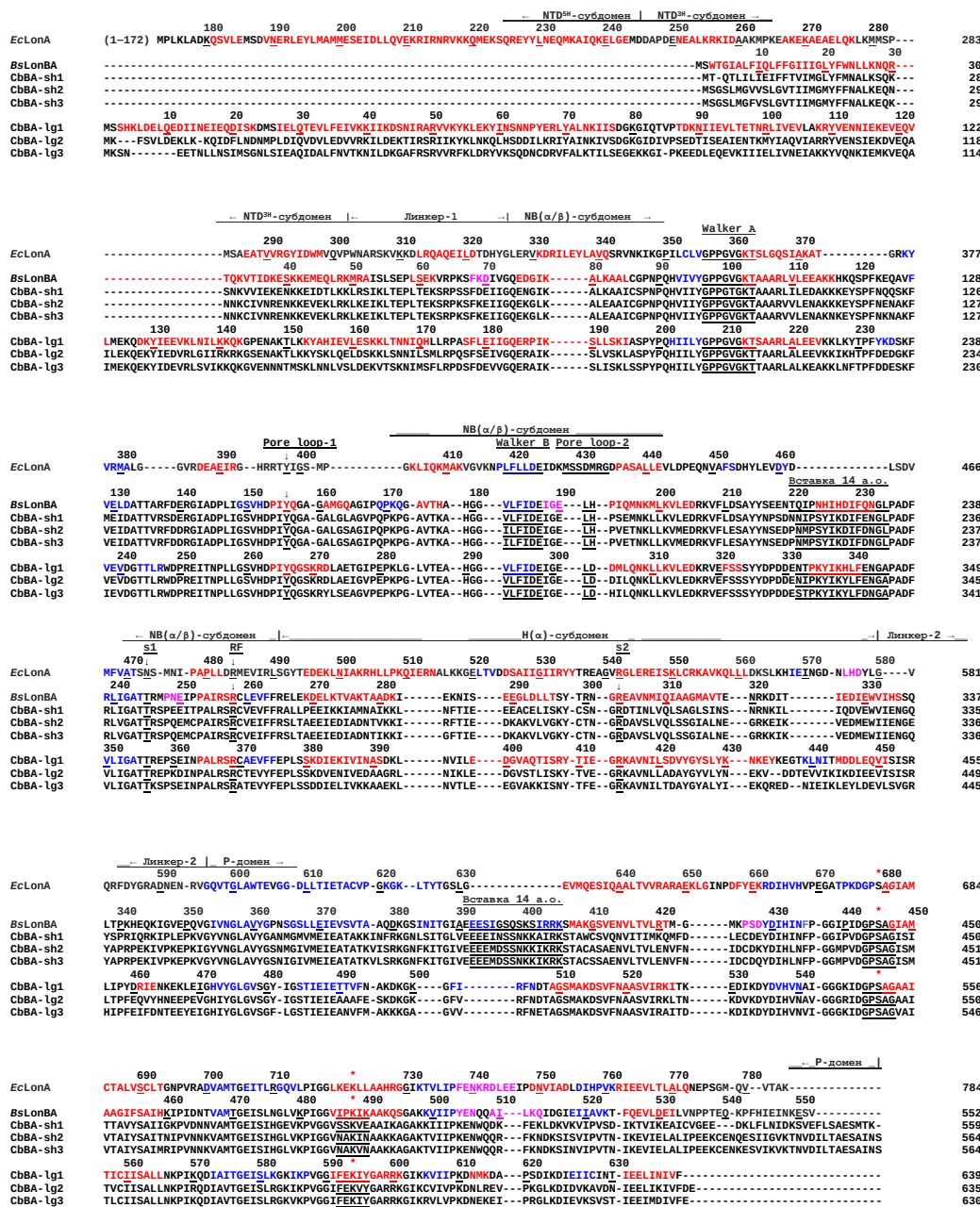


Рис. 2. Сопоставление последовательностей LonBA-протеаз из *Bacillus subtilis* и *Clostridium botulinum* с последовательностью модельной LonA-протеазы из *Escherichia coli* с учетом структурных данных, полученных для EcLonA и BsLonBA [2]. Источники Lon-протеаз: *E. coli* – EcLonA (MER0000485, PDB: 1RRE, 1RR9, 6U5Z); *B. subtilis* – BsLonBA (MER0002228, PDB: 8DVH); *C. botulinum* – CbBA-sh1 (MER0078974), CbBA-sh2 (MER0245087), CbBA-sh3 (MER0475680), CbBA-lg1 (MER0078953), CbBA-lg2 (MER0245321), CbBA-lg3 (MER0114077). Пометки “sh” и “lg” означают “короткие” и “длинные” LonBA-протеазы соответственно. Указана нумерация аминокислотных остатков для последовательностей EcLonA, BsLonBA и CbLonBA-lg1. Выравнивание первичных структур проведено с помощью программы <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>. Для EcLonA и BsLonBA элементы вторичных структур представлены согласно данным работы Gustchina et al. [2], а для CbLonBA-lg1 – согласно предсказанию (<https://zhanggroup.org/PSSpred/>). Красным цветом показаны α-спирали, розовым – 3_{10} -спирали, синим – β-тяжи, черным – фрагменты, не включенные в элементы вторичной структуры. Подчеркнуты консенсусные элементы: мотивы Уолкера (Walker A) и Walker B), ключевые остатки Y и LH/D петель Pore loop-1 и Pore loop-2 соответственно, остатки сенсор-1 и сенсор-2 (s1 и s2), “аргининовый палец” (RF), окружение каталитических остатков серина (S*) и лизина (K*). В последовательностях всех LonBA-протеаз подчеркнуты вставочные 14-членные фрагменты NB-субдоменов, а в коротких LonBA-протеазах – 14-членные фрагменты, соответствующие участку (E³⁹²–K⁴⁰⁵) BsLonBA, формирующему уникальный вставочный β-бочонок в структуре Р-домена.

фрагментами не обнаружено. Кроме того, в *N*-концевой последовательности *CbLonBA-Ig1* не выявлено ни coiled-coil-участка (как M¹⁷³–M²⁸⁰ у *EcLonA*), ни трансмембранного сегмента (как S²–L²⁶ у *BsLonBA*). Наиболее выраженное сходство обнаруживают протяженные α -спирали, локализованные в фрагментах D¹⁸⁸–D²⁴⁵ *EcLonA*-протеазы и D²⁴–G⁸¹ *CbLonBA-Ig1*, где степень подобия составляет 53.8%, а консервативность аминокислотных остатков – 18.5%.

Нуклеотид-связывающие и α -спирализованные субдомены LonBA-протеаз и бацилл, и клостридий, формирующие AAA⁺-модули ферментов, демонстрируют заметное и примерно равное подобие с соответствующими фрагментами *EcLonA*-протеазы (~40% для NB-субдоменов и 20% для H-субдоменов) (табл. 2, строки 6–8). Надо полагать, что низкое сходство AAA⁺-модулей *EcLonA* и LonBA-протеаз в большой степени обусловлено разницей размеров сопоставляемых субдоменов. Так, NB-субдомены LonBA-протеаз значительно крупнее NB-субдомена *EcLonA*, поскольку кроме вставочных фрагментов, заключенных между мотивами Уолкера (суммарно 22 или 23 а.о.), они имеют также вставки по 14 а.о. в своих *C*-концевых областях (рис. 2). H-Субдомены LonBA-протеаз, напротив, короче H-субдомена *EcLonA* на 16–23 а.о. (рис. 2). Отмеченные различия могут отразиться на пространственных структурах ферментов вновь выявленного LonBA-подсемейства.

Подобие Р-доменов *EcLonA* и LonBA-протеаз тоже невелико (табл. 2, строки 6–8). Но надо подчеркнуть, что в этом случае, как и следовало ожидать, большее сходство обнаружено между Р-доменами *EcLonA* и длинных LonBAs, не имеющих уникальной β -структурированной вставки, характерной для коротких LonBA-протеаз (рис. 2).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Аминокислотные последовательности анализируемых протеаз получали из баз данных MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>) и UniProt Knowledgebase (<https://www.uniprot.org/>).

Для предсказания вторичных структур белков использовали серверы PSSpred (<https://zhanggroup.org/PSSpred/>), Jpred 4 (<https://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred4/index.html>) и Porter 5.0 (<https://distilldeep.ucd.ie/porter/>).

Поиск трансмембранных фрагментов проводили с помощью серверов SMART (<https://smart.embl->

[heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1](https://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1)), TMHMM-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) и HMMTOP (<https://www.enzim.hu/hmmtop/html/submit.html>).

Наличие coiled-coil-областей в белках выявляли с использованием серверов CoCoPRED (<https://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/CoCoPRED/>), Prabi coiled-coil prediction (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_lupas.html) и Waggawagga coiled-coil prediction (<https://waggawagga.motorprotein.de/>).

Для выравнивания последовательностей использовали сервер <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено биоинформатическое исследование недавно выявленной в семействе Lon-протеаз группы ферментов из бацилл и клостридий, которые в базе данных MEROPS оказались отнесенными к подсемейству LonB. Охарактеризовано как общее строение вновь выявленных ферментов, так и индивидуальные особенности их структуры. Установлено, что существенные структурные отличия этих протеаз от ранее изученных ферментов Lon-семейства не позволяют в полной мере отнести их ни к одному из трех известных классических подсемейств, а скорее свидетельствуют об обнаружении отдельного четвертого подсемейства “гибридных” LonBA-протеаз.

Показано, что новое подсемейство LonBA состоит из двух сообществ ферментов, различающихся строением своих *N*-концевых фрагментов и протеазных доменов. Обнаружение в различных организмах бактерий отдела Firmicutes, к которому принадлежат бациллы и клостридии, большого разнообразия АТР-зависимых Lon-протеаз, не относящихся к “классическим” LonA-ферментам, позволяет предположить наличие у представителей во многом все еще загадочного семейства Lon новых невыявленных функций, которые требуют дальнейшего глубокого исследования.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-20154).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kudzhaev A.M., Andrianova A.G., Gustchina A.E., Smirnov I.V., Rotanova T.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2022. V. 48. P. 678–709.
<https://doi.org/10.1134/s1068162022040136>
2. Gustchina A., Li M., Andrianova A.G., Kudzhaev A.M., Lountos G.T., Sekula B., Cherry S., Tropea J.E., Smirnov I.V., Wlodawer A., Rotanova T.V. // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 11425.
<https://doi.org/10.3390/ijms231911425>
3. Wlodawer A., Sekula B., Gustchina A., Rotanova T.V. // J. Mol. Biol. 2022. V. 434. P. 167504.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2022.167504>
4. Liao J.H., Kuo C.I., Huang Y.Y., Lin Y.C., Lin Y.C., Yang C.Y., Wu W.L., Chang W.H., Liaw Y.C., Lin L.H., Chang C.I., Wu S.H. // PLoS One. 2012. V. 7. P. e40226.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040226>
5. Sauer R.T., Baker T.A. // Ann. Rev. Biochem. 2011. V. 80. P. 587–612.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060408-172623>
6. Rawlings N.D., Barrett A.J., Thomas P.D., Huang X., Bateman A., Finn R.D. // Nucleic Acids Res. 2018. V. 46. P. 624–632.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>
7. Gottesman S. // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2003. V. 19. P. 565–587.
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.110701.153228>
8. Pei J., Yan J., Jiang Y. // Hindawi Publishing Corporation. Archaea. 2016. Article ID 5759765.
<https://doi.org/10.1155/2016/5759765>
9. Cerletti M., Paggi R.A., Guevara C.R., Poetsch A., De Castro R.E. // J. Proteomics. 2015. V. 121. P. 1–14.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.03.016>
10. Maehara T., Hoshino T., Nakamura A. // Extremophiles. 2008. V. 12. P. 285–296.
<https://doi.org/10.1007/s00792-007-0129-3>
11. Rotanova T.V., Melnikov E.E., Tsirulnikov K.B. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2003. V. 29. P. 85–87.
12. Rotanova T.V., Melnikov E.E., Khalatova A.G., Makhovskaya O.V., Botos I., Wlodawer A., Gustchina A. // Eur. J. Biochem. 2004. V. 271. P. 4865–4871.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04452.x>
13. Rotanova T.V., Botos I., Melnikov E.E., Rasulova F., Gustchina A., Maurizi M.R., Wlodawer A. // Protein Sci. 2006. V. 15. P. 1815–1828.
<https://doi.org/10.1110/ps.052069306>
14. Iyer L.M., Leippe D.D., Koonin E.V., Aravind L. // J. Struct. Biol. 2004. V. 146. P. 11–31.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2003.10.010>
15. Lupas A.N., Martin J. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2002. V. 12. P. 746–753.
[https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(02\)00388-3](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(02)00388-3)
16. Bittner L.M., Arends J., Narberhaus F. // Biopolymers. 2016. V. 105. P. 505–517.
<https://doi.org/10.1002/bip.22831>
17. Liao J.H., Ihara K., Kuo C.I., Huang K.F., Wakatsuki S., Wu S.H., Chang C.I. // Acta Cryst. 2013. V. 69. P. 1395–1402.
<https://doi.org/10.1107/S0907444913008214>
18. Rotanova T.V., Andrianova A.G., Kudzhaev A.M., Li M., Botos I., Wlodawer A., Gustchina A. // FEBS Open Bio. 2019. V. 9. P. 1536–1551.
<https://doi.org/10.1002/2211-5463.12691>

ATP-Dependent LonBA Proteases of Bacilli and Clostridia

A. G. Andrianova*, A. M. Kudzhaev*, I. V. Smirnov*, and T. V. Rotanova*,#

Phone: +7 (495) 335-42-22; e-mail: tatyana.rotanova@ibch.ru

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

The Lon protease family belongs to the key peptide hydrolases of the protein quality control (PQC) system, which plays a leading role in maintaining the integrity of the cellular proteome in all natural kingdoms. Moreover, Lon proteases are the only family of ATP-dependent proteases of PQC which comprises a number of structurally distinct subfamilies. Recently, it has been suggested that the Lon family contains a previously unclassified LonBA subfamily, which includes enzymes from bacteria of the Bacilli and Clostridia classes. Using bioinformatics analysis, data were obtained on the structural features of enzymes of the putative new subfamily and on the existence of two different groups of Lon proteases in this subfamily.

Keywords: protein quality control system, AAA⁺ proteins, ATP-dependent proteolysis, Lon proteases, subfamilies, Bacilli, Clostridia



УДК 577.112.343

Вос/Bzl-ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ ПЕПТИДА ДЕЛЬТОРФИНА II И ЕГО АНАЛОГОВ БЕЗ ПРИМЕНЕНИЯ БЕЗВОДНОГО ФТОРИСТОГО ВОДОРОДА

© 2024 г. В. Н. Азев*,[#], Л. Г. Мустаева*, Е. Ю. Горбунова*, Л. К. Байдакова*,
А. Н. Чулин*, Л. Н. Маслов**, А. В. Мухомедзянов**,
М. В. Молчанов***, А. И. Мирошников****

* Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Россия, 142290 Пущино, просп. Науки, 6

** НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, Россия, 634012 Томск, ул. Киевская, 111-А

*** Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Россия, 142290 Пущино, ул. Институтская, 3

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

Поступила в редакцию 10.02.2024 г.

После доработки 21.02.2024 г.

Принята к публикации 22.02.2024 г.

Токсичность безводного фтористого водорода – ключевой фактор поиска альтернативных кислот Льюиса для проведения процессов глобального удаления защитных групп и снятия пептидов с полимерной подложки на последней стадии их Вос/Bzl-синтеза. В отличие от фтористого водорода, эти кислоты – высококипящие соединения, но благоприятные физико-химические свойства большинства пептидов позволяют отделить целевой продукт от избытка кислот посредством метода переосаждения. Мы обнаружили, что этот метод не применим для синтеза образцов пептида дельторфина II и его аналогов, в связи с чем были исследованы иные способы их выделения и очистки. В результате были разработаны альтернативные методы синтеза, выделения и эффективной очистки пептидов класса дельторфина II. Новые подходы могут найти применение в синтезе других гидрофобных пептидов.

Ключевые слова: Вос/Bzl-методология, дельторфин II, кислота Льюиса, твердофазный синтез пептидов

DOI: 10.31857/S0132342324050089, **EDN:** LQWVAU

ВВЕДЕНИЕ

Пептид дельторфин II (H-Tyr-(D)-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH₂) – высокоселективный агонист δ-опиоидного рецептора (δ-OP) [1]. Модуляторы опиоидных рецепторов проявляют биологическую активность не только в отношении ЦНС: в частности, в последнее время активно исследовалась кардиопротекторная активность

агонистов и антагонистов опиоидных рецепторов [2, 3], включая δ-OP [4].

Кардиопротекторный эффект дельторфина II изучен мало, хотя была продемонстрирована значительная инфаркт-лимитирующая активность этого пептида [5, 6], кроме того, проводились исследования, направленные на установление молекулярного механизма этой активности [7].

Сокращения: PhSMe – тиоанизол; TBTU – 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурион тетрафторборат; TFMSA – трифторметансульфокислота; TMSBr – триметилсилилбромид; TMSOTf – триметилсилилтрифлат; δ-OP – δ-опиоидный рецептор.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (4967) 73-54-42; эл. почта: viatcheslav.azev@bibch.ru).

Совокупность полученных данных позволила нам сделать вывод о перспективности продолжения работ по изучению кардиопротекторных свойств дельторфина II и его аналогов, что, в свою очередь, требовало разработки эффективных методов их химического синтеза.

Некоторые аналоги дельторфина II синтезировали в растворе по блочной схеме, в которой сборка целевых пептидов происходила с активацией трипептида, содержащего фенилаланин на C-конце [8]. Авторы не оценивали степень протекания побочной реакции рацемизации хирального центра фенилаланина, хотя известно, что на модельных пептидах такое осложнение протекает в значительной степени [9].

Описаны Fmoc/¹Bu-твердофазные синтезы дельторфина II и различных его аналогов. При применении этого подхода в общем случае могут образовываться побочные продукты удвоения аминокислот [10], а в одном из конкретных литературных примеров практической реализации этого метода для синтеза аналогов дельторфина II были описаны трудности в образовании амидных связей между остатками валинов и Glu-Val [11].

Boc/Bzl-методология твердофазного пептидного синтеза лишена этих недостатков, однако в ее практической реализации в классическом варианте применяется безводный фтористый водород – реагент для глобального деблокирования и снятия целевых соединений с полимерной подложки [12]. Это токсичный реагент, и, кроме того, для проведения экспериментальной работы с его использованием требуется специальное оборудование из фторуглеродных материалов [13]. Тем не менее в практике Boc/Bzl-методологии твердофазного пептидного синтеза используются другие кислоты Льюиса для осуществления тех же химических превращений, в том числе для синтеза C-концевых амидных форм пептидов: растворы триметилсилибромиды [14], триметилсилилтрифлата [15] и трифторметансульфо кислоты [16] в трифторуксусной кислоте в присутствии тиоанизола и других нуклеофильных добавок.

Целью данной работы был поиск альтернативного эффективного метода химического синтеза пептида дельторфина II (I) и его аналогов с использованием Boc/Bzl-методологии без применения безводного фтористого водорода. Помимо пептида (I) объектами исследования были следующие его аналоги: соединения H-Tyr-D-Ala-Phe(4-NO₂)-Glu-Val-Val-Gly-NH₂ (II), H-Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Ser-NH₂ (III) и H-Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-D-Ala-NH₂ (IV).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Используя в начале всей работы пептид (I) в качестве модельного соединения, изучали возможность применения ускоренного протокола пошагового наращивания пептидной цепи, в котором стадия конденсации оксипептида с аминокислотой с аминогруппой пептидил-полимера требует 10–20 мин [17]. Однако на стадии образования связи Val⁵–Val⁶ результаты качественного теста Кайзера [18] однозначно свидетельствовали о низкой конверсии реакции ацилирования в этих условиях, вероятно, из-за неблагоприятного стерического взаимодействия двух изопропильных групп. Тем не менее при использовании обычных условий осуществления синтеза по Boc/Bzl-методологии [19] (первая конденсация 2–3 ч, повторная до 18 ч) наращивание пептидной цепи проходило без осложнений в случае всех синтезируемых объектов.

Неожиданный результат был получен на последних стадиях синтеза целевых соединений – деблокирования и снятия с подложки – при попытке выделения пептида (I) и его аналогов с использованием стандартного метода пересадки. В данном методе раствор TFMSA и продуктов реакции в TFA добавляют к диэтиловому эфиру, при этом с той или иной скоростью образуется осадок, обогащенный пептидом, а избыток кислот находится в растворе. Именно таким образом выделяли, например, синтетическую рибонуклеазу А [20], и тот же метод использовали в работе, посвященной систематическому поиску условий снятия пептидов с полимерной подложки с использованием TFMSA [16]. Наконец, ранее мы аналогичным образом успешно выделяли другие пептиды [21].

При использовании указанного метода образование осадка пептида (I) не наблюдалось, и, насколько нам известно, такие прецеденты в литературе не описаны. Попытки разбавления раствора каким-либо еще малополярным растворителем или смена растворителя для пересадки были непродуктивны. Поскольку избыток сильных кислот мог привести к протеканию побочных реакций в растворе пептида (I), другим очевидным решением была нейтрализация кислот с использованием третичных аминов. Из ряда опробованных оснований только добавление пиридина привело к образованию кристаллической массы, содержащей пептид (тест Кайзера с аликвотой осадка) в количестве ~1 масс. %.

Нам не удалось разделить пептид (I) и соли с использованием диализа, поскольку все имею-

щиеся у нас мембраны, по-видимому, разрушались избытком органических солей. Пробное разделение смеси пептида (I) и солей пиридина проводили с применением гель-фильтрации на сорбенте Sephadex G-10 (метод 1). Такой стандартный подход себя не оправдал: по результатам нингидринового теста и масс-спектрометрического анализа во фракциях А и В (рис. 1а) находился целевой пептид, при этом основная по массе фракция А содержала значительное количество солей.

Однако мы обратили внимание на существенную разницу в массах нанесенной смеси (суммарно 1.5 г) и выделенных фракций (756 мг фракции А и 8 мг фракции В). Вероятно, значительное количество солей переходило в газовую фазу во время упаривания фракций и лиофилизации остатков после упаривания. Из литературы известно, например, что некоторые соли соединений азота настолько летучи, что могут использоваться как компоненты элюентов в ВЭЖХ-МС [22, 23].

В одном из последующих экспериментов (метод 2) по выделению смесь пептида (I) и его солей (также 1.5 г) многократно упаривали с большим объемом воды и лиофилизировали. Остаток (~270 мг) разделяли на сорбенте G-10 (рис. 1б). Такой способ разделения целевого соединения и солей имел уже некоторый успех, потому что фракция А содержала в основном пептид (I), а фракция В – по-прежнему смесь пептида (I) и

трифлата пиридиния. Последний был выделен из фракции В с помощью ВЭЖХ.

С целью повышения эффективности процесса разделения анализировали возможность применения иных сорбентов. В литературе описан эксперимент по фракционированию сложной смеси соединений пептидной природы на сорбенте Sephadex LH-20 [24]. Авторы отмечают, что время удерживания пептидов зависело от числа ароматических аминокислотных остатков, вероятно, вследствие адсорбционного механизма разделения. Соли пиридина содержат один относительно гидрофобный ароматический остаток, а целевые соединения – два, и, кроме того, они содержат гидрофобные остатки аминокислоты валина. Таким образом, применение сорбента Sephadex LH-20 имело перспективы.

Действительно, при использовании этого сорбента распределение пептида во фракциях оказалось совершенно иным (метод 3). Фракция А (рис. 1в) не содержала пептид, но, в то же время, он распределился по фракциям В и С. Кроме того, порядок выхода элюатов (первыми соли, а затем пептид) свидетельствовал об адсорбционном механизме разделения соединений. Фракции В и С подвергали разделению методом ВЭЖХ, при этом выход пептида (I) оказался гораздо выше (56% против 24% по методу 2).

Исследовали также возможность проведения лиофилизации солей с водяным паром (вместо упаривания) с последующей очисткой уже на сорбенте Sephadex LH-20 (метод 4). В этом

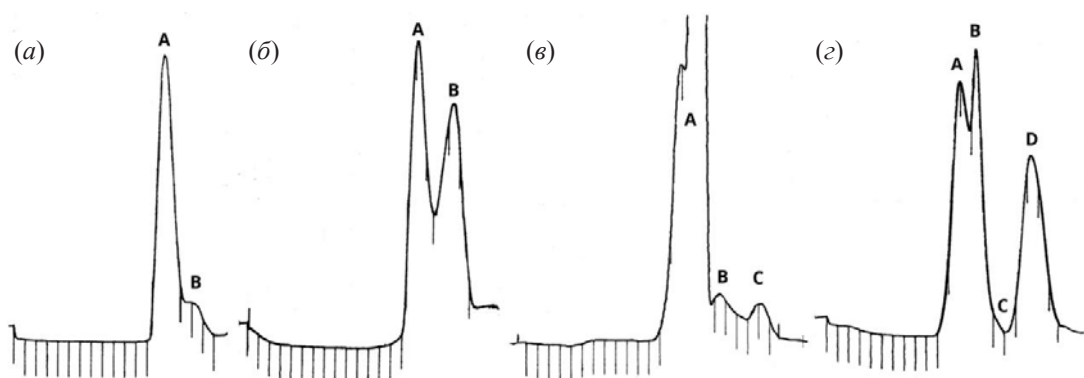


Рис. 1. Хроматограммы стадий процесса гель-фильтрации смеси пептида (I) и низкомолекулярных примесей, вертикальные линии соответствуют промежутку времени 2 мин. (а) – Сорбент Sephadex G-10, отсутствие разделения при нанесении необработанной смеси; (б) – Sephadex G-10, частичное разделение после отгонки значительной части солей с водяным паром перед нанесением; (в) – сорбент Sephadex LH-20, частичное разделение при нанесении необработанной смеси; (г) – сорбент Sephadex LH-20, практически полное разделение после отгонки значительной части солей с водяным паром в ходе лиофилизации перед нанесением.

эксперименте из 1.5 г смеси после лиофилизации получили ~230 мг остатка: соотношение в целом похоже на результат с использованием метода 2. Разделение полученного лиофилизата оказалось еще более продуктивным: целевой пептид содержался в одной фракции D (рис. 1з), которая уже явно отделялась от примесей солей. Выход пептида (I) после препаративной ВЭЖХ-очистки оказался несколько более высоким, чем полученный при использовании метода 3.

В настоящее время мы не можем отдать предпочтение методу 3 или методу 4. Затраты во времени на лиофилизацию большого объема воды и на прямое разделение смеси с большей массой одинаковые (упаривание еще большего объема воды, как в методе 2, приводит к существенным временным затратам). Следует также принимать во внимание коррозионные свойства солей пиридина при проведении лиофилизации. В то же время в методе 4 целевой продукт элюировался одним пиком. С использованием метода 4 нам удалось выделить остальные объекты исследования, поскольку ни один из них также не осаждался из диэтилового эфира после стадии глобального деблокирования. Соединения (I–IV) очищали методом ВЭЖХ и тщательно характеризовали спектральными методами.

Следует отметить факт стабильности нитрогруппы в условиях ацидолиза (1 М PhSMe, 1 М TFMSA в TFA). Хотя пептиды, содержащие 4-нитрофенилаланин, были успешно синтезированы при использовании безводного фтористого водорода [25], применяемый нами реагент значительно отличается по своей химической природе, но является сильной кислотой. В то же время в сильнокислой среде известны прецеденты миграции нитрогруппы при нитровании ароматических соединений [26], а в некоторых случаях было показано, что реакция нитрования ароматических соединений может быть обратима [27]. Кроме того, существуют методы восстановления нитрогруппы в ароматических соединениях с использованием неорганических сульфидов в присутствии кислот Льюиса [28, 29], а в нашем случае восстановителем мог быть тиаоанизол. Таким образом, стабильность нитрогруппы в условиях ацидолиза *a priori* не была однозначной. Тем не менее, несмотря на наши опасения, основным продуктом, судя по данным ЯМР-спектроскопии (наличие *n*-замещенной ароматической системы, содержащей сильный электроноакцепторный заместитель), было целевое соединение (II).

Применение TFMSA оказалось довольно трудоемким процессом. В одном из пробных экспериментов по использованию другой кислоты Льюиса (TMSOTf) [15] была получена смесь пептида (I) и другого соединения, которое, судя по данным масс-спектрометрического анализа (m/z 784.3851), представляло собой, по-видимому, C-концевую кислотную форму пептида (I). Дальнейшие эксперименты с использованием TMSOTf не проводились. В то же время TMSBr [14] в наших руках оказался неэффективен в снятии пептида (I) с полимерной подложки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все растворители, гидроксид калия, безводный хлорид кальция – коммерчески доступные продукты (Реахим и Химмед, Россия). В работе использовали стандартные производные аминокислот (IRIS Bitech GmbH, Германия); Boc-Phe(4-NO₂)-OH, *m*-крезол, тиаоанизол (Fluka, Швейцария), трифторметансульфокислоту (Chemical Line, Россия), трифторуксусную кислоту (P&M Invest, Россия). В работе с трифторметансульфокислотой шлифы всех стеклянных приборов смазывали фторуглеродной смазкой Томфлон ПЭФ 300 (ООО “Фторполимерные технологии”, Россия). Очищенную воду (18 МОм) получали на установке Milli-Q (Millipore, США).

Спектры ЯМР регистрировали на приборе Avance III (BioSpin, Bruker, Германия) (¹H при 600 МГц, ¹³C при 125 МГц) и калибровали по сигналам остаточных протонов дейтерированного растворителя DMSO-*d*₆. Химические сдвиги приведены в миллионных долях, а КССВ – в герцах. Сигналы в ¹H-ЯМР-спектрах относили с использованием данных 2D-ЯМР-экспериментов (COSY, HSQC, HMBC). Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на приборе Orbitrap Elite Hybrid Ion Trap-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Германия).

Аналитическую ВЭЖХ проводили с использованием хроматографа Waters (Waters Corporation, США), оборудованного насосом модели 1525 и детектором 2487, на колонке Phenomenex (Phenomenex, США) Luna 5u C18 (0.46 × 25 см) с детекцией на двух длинах волн (226 и 280 нм), объемный расход элюента 1 мл/мин. Элюент А – вода (0.1%-ная TFA), элюент В – ацетонитрил. Параметры градиента: 0–1 мин – 5% В; 1–20 мин – 5–80% В; 20–21 мин – 80–5% В; 21–25 мин – 5% В.

Общие условия осуществления химического синтеза пептидил-полимеров. Синтез проводили с использованием MBHA-полимера с начальной загрузкой аминокроп 1.2 ммоль/г (0.45 ммоль)

и стандартных защищенных производных аминокислот: Boc-Tyr(2-BrZ)-OH, Boc-Glu(OBzl)-OH и Boc-Ser(Bzl)-OH. Операции промывок и деблокирования временной N_α -Boc-защитной группы проводили по известным методикам [19], а активацию производных аминокислот – с помощью TBUTU [30]. Конверсию реакций ацилирования аминогрупп оценивали с использованием качественного теста Кайзера [18].

Общие условия осуществления стадии деблокирования и снятия пептида с подложки. Пептидил-полимер (0.45 ммоль) суспендировали при медленном перемешивании в смеси тиаоанизола (1.4 мл) и *m*-крезола (0.58 мл) в одnogорлой колбе, снабженной стеклянным краном (колбе Шленка), внешний штуцер которого укупoren резиновой пробкой (септой). Спустя 10 мин добавляли 100%-ную TFA (8.7 мл), подсоединяли хлоркальциевую трубку (CaCl_2), содержимое колбы охлаждали в ледяной бане в течение 10 мин. К содержимому колбы с помощью стеклянного шприца, снабженного иглой из нержавеющей стали, добавляли TFMSA (0.94 мл) через септу. Кран закрывали, содержимое колбы перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч и фильтровали в диэтиловый эфир (100 мл). Пептидил-полимер на фильтре промывали TFA (3×0.5 мл). К колбе с эфирным раствором подсоединяли капельную воронку с противодавлением, снабженную хлоркальциевой трубкой (CaCl_2), в которую добавляли пиридин (15.2 мл). Колбу охлаждали на ледяной бане, смесь кислот нейтрализовывали пиридином при перемешивании. Содержимое колбы нагревали до комнатной температуры и фильтровали. Осадок на фильтре промывали диэтиловым эфиром (3×50 мл). Полученную смесь солей и пептида сушили в вакуум-эксикаторе над KOH в течение 48 ч. Масса смеси после высушивания составила 30.2–30.5 г, теоретическое содержание пептида 0.35–0.38 г (~1 масс. %).

Общие условия проведения процесса гель-фильтрации. Хроматографическое разделение проводили с использованием системы LKB Bromma (LKB, Швеция), состоящей из перистальтического насоса модели 2115, колонки 26×400 мм (высота слоя сорбента 320 мм), детектора серии 2158 (детекция на длине волны 226 нм), коллектора фракций модели 2211 и самописца модели 2210. Элюирование проводили в изократическом режиме с использованием 0.1 М водной AcOH с последующей промывкой колонки 1 М водной AcOH. Объемный расход элюента 3 мл/мин, объем фракции 6 мл.

Общие условия анионного обмена. Пептид растворяли в очищенной воде и выдерживали с избытком (20 экв.) анионообменной смолы IRA-400 (хлоридная форма) в течение 15 мин. Раствор фильтровали, промывали смолу очищенной водой (3×2 мл), после чего раствор лиофилизировали.

Разделение пептида (I) и солей пиридиния.
Метод 1. Смесь солей и пептида (1.5 г) порциями по 100 мг растворяли в 0.1 М AcOH (1.5 мл), наносили на колонку гель-фильтрации и хроматографировали в соответствии с общими условиями на сорбенте Sephadex G-10 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция). После упаривания и лиофилизации получили 756 мг фракции А и 8 мг фракции В (рис. 1а). Ввиду значительного содержания солей во фракции А дальнейшую очистку методом ВЭЖХ не проводили.

Метод 2. Смесь солей и пептида (1.5 г) растворяли в 300 мл очищенной воды и упаривали досуха на ротационном испарителе. Процесс повторяли 10 раз. Остаток после упаривания лиофилизировали. Полученную смесь (268 мг) порциями по 35–45 мг растворяли в 0.1 М AcOH (1.5 мл), наносили на колонку гель-фильтрации и хроматографировали в соответствии с общими условиями на сорбенте Sephadex G-10. После упаривания и лиофилизации получили 4.1 мг фракции А и 38.3 мг фракции В (рис. 1б). Из обеих фракций по отдельности выделяли целевой пептид методом препаративной ВЭЖХ (28%-ный водный MeCN, 0.1%-ная TFA). После анионного обмена выход пептида (I) составил 4.3 мг (24% на все стадии).

Метод 3. Смесь солей и пептида (1.5 г) порциями по 100 мг растворяли в 0.1 М AcOH (1.5 мл), наносили на колонку гель-фильтрации и хроматографировали в соответствии с общими условиями на сорбенте Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция). После упаривания и лиофилизации получили 11.5 мг фракции В и 23.2 мг фракции С (рис. 1в). Из обеих фракций по отдельности выделяли целевой пептид методом препаративной ВЭЖХ (28%-ный водный MeCN, 0.1%-ная TFA). После анионного обмена выход пептида (I) составил 10.1 мг (56% на все стадии).

Метод 4. Смесь солей и пептида (1.5 г) растворяли в 400 мл очищенной воды и лиофилизировали в течение 36 ч. Остаток перерастворяли в 100 мл очищенной воды и лиофилизировали в течение 18 ч. Полученную смесь (227 мг) порциями по 30 мг растворяли в 0.1 М AcOH (1.5 мл), наносили на колонку гель-фильтрации и хроматографировали в соответствии с общими условиями на сорбенте Sephadex LH-20. После

упаривания и лиофилизации получили 69 мг фракции D (рис. 1с), из которой выделяли целевой пептид методом препаративной ВЭЖХ (28%-ный водный MeCN, 0.1%-ная TFA). После анионного обмена выход пептида (I) составил 11.2 мг (62% на все стадии).

H-Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH₂ гидрохлорид (I). Суммарный выход 210 мг (57%). Время удерживания 14.45 мин. Спектр ¹H-ЯМР (298 К): 0.71 (д, *J* 6.96, 1H, ala²CH₃β), 0.79–0.88 (м, 12H, Val⁵CH₃γ и Val⁶CH₃γ), 1.79 (м, 1H, Glu⁴CH₂β), 1.83–2.01 (м, 3H, Glu⁴CH₂β Val⁵CH₃β и Val⁶CH₃β), 2.24 (м, 2H, Glu⁴CH₂γ), 2.66 (дд, *J* 11.22, 13.50, 1H, Phe³CH₂β), 2.82 (м, 2H, Tyr¹CH₂β), 3.03 (дд, *J* 3.24, 13.74, 1H, Phe³CH₂β), 3.59 (дд, *J* 5.58, 16.74, 1H, Gly⁷CH₂α), 3.66 (дд, *J* 6.01, 16.71, 1H, Gly⁷CH₂α), 3.98 (м, 1H, Tyr¹CHα), 4.11 (ψт, *J* 7.38, 1H, Val⁶CHα), 4.24 (дд, *J* 7.08, 8.46, 1H, Val⁵CHα), 4.31 (м, 1H, Glu⁴CHα), 4.36 (м, 1H, ala²CHα), 4.59 (ддд, *J* 3.42, 8.48, 11.21, 1H, Phe³CHα), 6.67 (д, *J* 8.52, 2H, Tyr¹Ar), 6.99 (д, *J* 8.51, 2H, Tyr¹Ar), 7.01 (уш. с, 1H, Gly⁷NH₂), 7.11–7.31 (м, 6H, Phe³Ar и Gly⁷NH₂), 7.79 (д, *J* 8.76, 1H, Val⁵NHα), 7.95 (д, *J* 8.28, 1H, Val⁶NHα), 8.05 (уш. с, 3H, Tyr¹NH₃⁺α), 8.08 (ψт, *J* 5.71, 1H, Gly⁷NHα), 8.32–8.39 (м, 3H, ala²NHα, Phe³NHα и Glu⁴NHα), 9.31 (с, 1H, Tyr¹OH), 12.13 (уш. с, 1H, Glu⁴CO₂Hγ). Спектр ¹³C-ЯМР (298 К): 171.17, 171.09, 170.97, 170.79, 170.61, 167.20, 156.47, 137.69, 130.46, 129.25, 127.85, 126.22, 124.69, 115.16, 58.03, 57.40, 53.34, 53.30, 51.92, 47.73, 41.70, 37.93, 36.36, 30.52, 30.14, 27.29, 19.18, 19.11, 18.81, 18.19, 18.00. HRMS (+ESI) *m/z*: найдено *M* 783.3979; вычислено для C₃₈H₅₅N₈O₁₀⁺, [*M* + H]⁺ 783.403.

H-Tyr-D-Ala-Phe(4-NO₂)-Glu-Val-Val-Gly-NH₂ гидрохлорид (II). Суммарный выход 214 мг (55%). Время удерживания 15.26 мин. Спектр ¹H-ЯМР (298 К): 0.78–0.88 (м, 12H, Val⁵CH₃γ и Val⁶CH₃γ), 0.71 (д, *J* 7.02, 1H, ala²CH₃β), 1.78 (м, 1H, Glu⁴CH₂β), 1.83 (м, 1H, Glu⁴CH₂β), 1.96 (м, 1H, Val⁶CH₃β), 1.97 (м, 1H, Val⁵CH₃β), 2.06–2.22 (м, 2H, Glu⁴CH₂γ), 2.55 (дд, *J* 7.98, 13.50, 1H, Tyr¹CH₂β), 2.80 (дд, *J* 5.94, 13.58, 1H, Tyr¹CH₂β), 2.89 (дд, *J* 10.08, 13.50, 1H, Phe(4-NO₂)³CH₂β), 3.17 (дд, *J* 3.66, 13.56, 1H, Phe(4-NO₂)³CH₂β), 3.53 (м, 1H, Tyr¹CHα), 3.59 (дд, *J* 5.58, 16.74, 1H, Gly⁷CH₂α), 3.66 (дд, *J* 6.01, 16.72, 1H, Gly⁷CH₂α), 4.09 (ψт, *J* 7.50, 1H, Val⁶CHα), 4.17–4.26 (м, 3H, ala²CHα, Glu⁴CHα и Val⁵CHα), 4.63 (ддд, *J* 3.96, 9.42, 9.97, 1H, Phe(4-NO₂)³CHα), 6.65 (д, *J* 8.46, 2H, Tyr¹Ar), 6.99 (д, *J* 8.50, 2H, Tyr¹Ar), 7.02 (уш. с, 1H, Gly⁷NH₂), 7.18 (уш. с, 1H, Gly⁷NH₂), 7.49 (д, *J* 8.70, 2H, Phe(4-NO₂)³Ar), 7.81 (д, *J* 8.70, 1H, Val⁵NHα), 7.89 (д, *J* 8.16, 1H,

Val⁶NHα), 8.06–8.16 (м, 3H, Phe(4-NO₂)³Ar и Gly⁷NHα), 8.22 (д, *J* 8.46, 1H, Phe(4-NO₂)³NHα), 8.26 (д, *J* 6.42, 1H, ala²NHα), 8.63 (д, *J* 6.65, 1H, Glu⁴NHα), 9.30 (уш. с, 1H, Tyr¹OH). Спектр ¹³C-ЯМР (298 К): 174.60, 172.34, 171.79, 170.91, 170.85, 170.51, 170.16, 155.77, 146.16, 145.93, 130.50, 129.99, 127.61, 122.87, 114.90, 58.09, 57.55, 55.44, 52.99, 52.63, 47.89, 41.71, 37.18, 30.85, 30.23, 29.97, 27.08, 19.06, 19.00, 18.08, 17.90. HRMS (+ESI) *m/z*: найдено *M* 828.3820; вычислено для C₃₈H₅₄N₉O₁₂⁺, [*M* + H]⁺ 828.3886.

H-Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Ser-NH₂ гидрохлорид (III). Суммарный выход 214 мг (56%). Время удерживания 14.42 мин. Спектр ¹H-ЯМР (298 К): 0.71 (д, *J* 6.96, 1H, ala²CH₃β), 0.79–0.89 (м, 12H, Val⁵CH₃γ и Val⁶CH₃γ), 1.76 (м, 1H, Glu⁴CH₂β), 1.88 (м, 1H, Glu⁴CH₂β), 1.89–2.05 (м, 2H, Val⁵CH₃β и Val⁶CH₃β), 2.23 (м, 2H, Glu⁴CH₂γ), 2.66 (дд, *J* 11.40, 13.74, 1H, Phe³CH₂β), 2.81 (м, 2H, Tyr¹CH₂β), 3.03 (дд, *J* 3.30, 13.74, 1H, Phe³CH₂β), 3.50 (дд, *J* 5.52, 10.68, 1H, Ser⁷CH₂β), 3.56 (дд, *J* 5.52, 10.62, 1H, Ser⁷CH₂β), 3.95 (ψт, *J* 7.26, 1H, Tyr¹CHα), 4.17–4.23 (м, 2H, Val⁶CHα и Ser⁷CH₂α), 4.25 (дд, *J* 7.08, 10.92, 1H, Val⁵CHα), 4.31 (м, 1H, Glu⁴CHα), 4.35 (м, 1H, ala²CHα), 4.59 (ддд, *J* 3.41, 8.47, 11.12, 1H, Phe³CHα), 4.82 (уш. с, 1H, Ser⁷OH), 6.67 (д, *J* 8.52, 2H, Tyr¹Ar), 6.98 (д, *J* 8.51, 2H, Tyr¹Ar), 7.06 (уш. с, 1H, Ser⁷NH₂), 7.15–7.28 (м, 6H, Phe³Ar и Ser⁷NH₂), 7.74 (д, *J* 7.92, 1H, Ser⁷NHα), 7.80 (д, *J* 8.77, 1H, Val⁵NHα), 7.94 (д, *J* 8.70, 1H, Val⁶NHα), 8.32–8.40 (м, 3H, ala²NHα, Phe³NHα и Glu⁴NHα), 9.30 (с, 1H, Tyr¹OH), 12.14 (уш. с, 1H, Glu⁴CO₂Hγ). Спектр ¹³C-ЯМР (298 К): 173.92, 171.68, 171.17, 171.10, 170.87, 170.80, 170.50, 167.31, 156.45, 137.69, 130.45, 129.24, 127.85, 126.21, 124.75, 115.15, 61.64, 57.72, 57.44, 54.75, 53.34, 51.94, 47.73, 37.91, 36.41, 30.51, 30.28, 30.14, 27.27, 19.21, 19.13, 18.81, 17.99, 17.90. HRMS (+ESI) *m/z*: найдено *M* 813.4073; вычислено для C₃₉H₅₇N₈O₁₁⁺, [*M* + H]⁺ 813.4141.

H-Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-D-Ala-NH₂ гидрохлорид (IV). Суммарный выход 225 мг (60%). Время удерживания 15.36 мин. Спектр ¹H-ЯМР (298 К): 0.78–0.91 (м, 15H, ala²CH₃β и Val⁵CH₃γ и Val⁶CH₃γ), 1.18 (д, *J* 7.14, 1H, ala⁷CH₃β), 1.77 (м, 1H, Glu⁴CH₂β), 1.85 (м, 1H, Glu⁴CH₂β), 1.91–2.01 (м, 2H, Val⁵CH₃β и Val⁶CH₃β), 2.17 (м, 2H, Glu⁴CH₂γ), 2.53 (м, 1H, Tyr¹CH₂β), 2.72 (дд, *J* 10.80, 13.68, 1H, Phe³CH₂β), 2.81 (дд, *J* 5.46, 13.62, 1H, Tyr¹CH₂β), 3.06 (дд, *J* 3.24, 13.68, 1H, Phe³CH₂β), 3.48 (м, 1H, Tyr¹CHα), 4.05 (ψт, *J* 7.62, 1H, Val⁶CHα), 4.15–4.28 (м, 4H, ala²CHα, Glu⁴CHα, Val⁵CHα и ala⁷CHα), 4.51 (м, 1H, Phe³CHα), 6.64 (д, *J* 8.40, 2H, Tyr¹Ar), 6.97 (д, *J* 8.41, 2H, Tyr¹Ar),

6.98 (уш. с, 1H, ala^7NH_2), 7.12–7.27 (м, 6H, Phe^3Ar и ala^7NH_2), 7.76 (д, J 8.64, 1H, $\text{Val}^5\text{NH}\alpha$), 7.93 (д, J 8.05, 1H, $\text{Val}^6\text{NH}\alpha$), 8.04 (д, J 7.80, 1H, $\text{ala}^7\text{NH}\alpha$), 8.16–8.26 (м, 2H, $\text{ala}^2\text{NH}\alpha$ и $\text{Phe}^3\text{NH}\alpha$), 8.56 (д, J 6.54, 1H, $\text{Glu}^4\text{NH}\alpha$). Спектр ^{13}C -ЯМР (298 К): 174.92, 174.03, 172.43, 171.82, 171.10, 171.05, 171.01, 170.36, 155.82, 137.76, 130.13, 129.20, 127.91, 127.79, 126.18, 114.96, 58.39, 57.55, 55.54, 53.71, 52.69, 47.79, 37.34, 31.17, 30.36, 29.90, 27.18, 19.14, 19.03, 18.36, 18.27, 18.14, 18.07. HRMS (+ESI) m/z : найдено M 797.4127; вычислено для $\text{C}_{39}\text{H}_{57}\text{N}_8\text{O}_{10}^+$, $[M + \text{H}^+]$ 797.4192.

Трифлат пиридиния. Выделен из алиquotы фракции В (метод 2) с использованием препаративной ВЭЖХ. Спектр ^1H -ЯМР (298 К, D_2O - H_2O): 7.99 (шт, J 6.97, 2H, PyH-3), 8.54 (тт, J 1.35, 7.95, 1H, PyH-4), 8.69 (д, J 5.66, 2H, PyH-2). Спектр ^{13}C -ЯМР (298 К, D_2O - H_2O): 147.14, 141.17, 127.41, 119.58 (к, J 316.84).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При использовании сильных кислот Льюиса в качестве альтернативы безводному фтористому водороду процесс выделения гидрофобных пептидов может иметь трудности при применении стандартного подхода. В качестве альтернативы предложен и успешно опробован на примере пептида дельторфина II и трех его аналогов способ, в котором смесь кислот нейтрализуют пиридином, а полученную смесь солей и целевого пептида хроматографируют на сорбенте LH-20 либо сразу, либо после предварительной лиофилизации избытка солей пиридиния с водяным паром.

Разработанные методы выделения и очистки могут найти применение в выделении других гидрофобных пептидов в случае, когда стандартный способ непродуктивен.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны к.ф.-м.н. А.К. Сурину (Институт белка РАН) за помощь в регистрации масс-спектров высокого разрешения.

Авторы выражают благодарность инженеру А.И. Поляковой (ФИБХ РАН) за осуществление масштабирования процессов разделения пептидов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 23-65-10017). Исследование стабильности 4-нитрофенилаланина в условиях ацидолиза выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ FFEU-2024-0056).

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. Lazarus L.H., Bryant Sh.D., Cooper P.S., Salvadori S. // Prog. Neurobiol. 1999. V. 57. P. 377–420. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00050-1](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00050-1)
2. Headrick J.P., Pepe S., Peart J.N. // Curr. Pharm. Des. 2012. V. 18. P. 6090–6100. <https://doi.org/10.2174/138161212803582360>
3. Rawal H., Patel B.M. // J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther. 2018. V. 23. P. 279–291. <https://doi.org/10.1177/1074248418757009>
4. See Hoe L., Patel H.H., Peart J.N. // Delta Opioid Receptors and Cardioprotection. In: Delta Opioid Receptor Pharmacology and Therapeutic Applications. Handbook of Experimental Pharmacology. V. 247 / Ed. Jutkiewicz E. Cham: Springer, 2018. P. 301–334. https://doi.org/10.1007/164_2017_6
5. Maslov L.N., Lishmanov Yu.B., Oeltgen P.R., Barzakh E.I., Krylatov A.V., Govindaswami M., Brown S.A. // Life Sci. 2009. V. 84. P. 657–663. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.02.016>
6. Maslov L.N., Mukhomedzyanov A.V., Tsubulnikov S.Y., Suleiman M.-S., Khaliulin I., Oeltgen P.R. // Eur. J. Pharmacol. 2021. V. 907. P. 174302. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174302>
7. Popov S.V., Mukhomedzyanov A.V., Maslov L.N., Naryzhnaya N.V., Kurbatov B.K., Prasad N.R., Singh N., Fu F., Azev V.N. // Membranes. 2023. V. 13. P. 63. <https://doi.org/10.3390/membranes13010063>
8. Salvadori S., Bianchi C., Lazarus L.H., Scaranari V., Attila M., Tomatis R. // J. Med. Chem. 1992. V. 35. P. 4651–4657. <https://doi.org/10.1021/jm00103a001>
9. Benoiton N.L., Lee Y.C., Steinaur R., Chen F.M.F. // Int. J. Pept. Protein Res. 1992. V. 40. P. 559–566. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1992.tb00441.x>
10. Yang Y. // Side Reactions in Peptide Synthesis (1st ed.). London: Academic Press, 2015.
11. Guerrini R., Capasso A., Sorrentino L., Anacardio R., Bryant Sh.D., Lazarus L.H., Attila M., Salvadori S. // Eur. J. Pharmacol. 1996. V. 302. P. 37–42. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(96\)00067-2](https://doi.org/10.1016/0014-2999(96)00067-2)
12. Sakakibara S., Nakamizo N., Kishida Y., Yoshimura S. // Bull. Chem. Soc. Jpn. 1968. V. 41. P. 1477–1479. <https://doi.org/10.1246/bcsj.41.1477>

13. *Muttenthaler M., Albericio F., Dawson P.E.* // Nat. Protoc. 2015. V. 10. P. 1067–1083.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2015.061>
14. *Hughes J.L., Leopold E.J.* // Tetrahedron Lett. 1993. V. 34. P. 7713–7716.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)61546-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)61546-0)
15. *Akaji K., Fujii N., Tokunaga F., Miyata T., Iwanaga S., Yajima H.* // Chem. Pharm. Bull. 1989. V. 37. P. 2661–2664.
<https://doi.org/10.1248/cpb.37.2661>
16. *Jubilut G.N., Cilli E.M., Tominaga M., Miranda A., Okada Y., Nakaie C.R.* // Chem. Pharm. Bull. 2001. V. 49. P. 1089–1092.
<https://doi.org/10.1248/cpb.49.1089>
17. *Schnölzer M., Alewood P., Jones A., Alewood D., Kent S.B.H.* // Int. J. Pept. Protein Res. 1992. V. 40. P. 180–193.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1992.tb00291.x>
18. *Kaiser E., Colescott R.L., Bossinger C.D., Cook P.I.* // Anal. Biochem. 1970. V. 34. P. 595.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(70\)90146-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(70)90146-6)
19. *Stewart J.M., Young J.D.* // Solid Phase Peptide Synthesis. Pierce Chemical Company Rockford, IL, 1984.
20. *Yajima H., Fujii N.* // J. Am. Chem. Soc. 1981. V. 103. P. 5867–5871.
<https://doi.org/10.1021/ja00409a040>
21. *Kravchenko S.V., Domnin P.A., Grishin S.Yu., Panfilov A.V., Azev V.N., Mustaeva L.G., Gorbunova E.Yu., Kobayakova M.I., Surin A.K., Glyakina A.V., Fadeev R.S., Ermolaeva S.A., Galzitskaya O.V.* // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 524.
<https://doi.org/10.3390/ijms23010524>
22. *Espada A., Rivera-Sagredo A.* // J. Chromatogr. A. 2003. V. 987. P. 211–220.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01819-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01819-8)
23. *Subirats X., Bosch E., Rosés M.* // LCGC North America. 2009. V. 27. P. 1000–1004.
<https://www.chromatographyonline.com/view/buffer-considerations-lc-and-lc-ms>
24. *Göransson U., Luijendijk T., Johansson S., Bohlin L., Claeson P.* // J. Nat. Prod. 1999. V. 62. P. 283–286.
<https://doi.org/10.1021/np9803878>
25. *Barbeau D., Guay S., Neugebauer W., Escher E.* // J. Med. Chem. 1992. V. 35. P. 151–157.
<https://doi.org/10.1021/jm00079a020>
26. *Myhre P.C.* // J. Am. Chem. Soc. 1972. V. 94. P. 7921–7923.
<https://doi.org/10.1021/ja00777a043>
27. *Olah G.A., Narang S.C., Malhotra R., Olah J.A.* // J. Am. Chem. Soc. 1979. V. 101. P. 1805–1807.
<https://doi.org/10.1021/ja00501a028>
28. *Nickson T.E.* // J. Org. Chem. 1986. V. 51. P. 3903–3904.
<https://doi.org/10.1021/jo00370a031>
29. *Shiao M.-J., Lai L.-L., Ku W.-Sh., Lin P.-Y., Hwu J. R.* // J. Org. Chem. 1993. V. 58. P. 4742–4744.
<https://doi.org/10.1021/jo00069a046>
30. *Knorr R., Trzeciak A., Bannwarth W., Gillesen D.* // Tetrahedron Lett. 1989. V. 30. P. 1927–1930.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)99616-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)99616-3)

Boc/Bzl Solid Phase Synthesis of Deltorpin II and its Analogues without Utilization of Anhydrous Hydrogen Fluoride

**V. N. Azev^{*,#}, L. G. Mustaeva^{*}, E. Yu. Gorbunova^{*}, L. K. Baidakova^{*}, A. N. Chulin^{*},
L. N. Maslov^{**}, A. V. Mukhomedziyanov^{**}, M. B. Molchanov^{**}, and A. I. Miroshnikov^{***}**

[#]Phone: +7 (4967) 73-54-42; e-mail: viatcheslav.azev@bibch.ru

^{*} Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Bioorganic Chemistry Institute RAS,
prosp. Nauki 6, Puschino, 142290 Russia

^{**} Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center RAS,
ul. Kievskaya 111-A, Tomsk, 634012 Russia

^{***} Institute for Theoretical and Experimental Biophysics RAS, ul. Institutskaya 3, Puschino, 142290 Russia

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

The toxicity and aggressive nature of hydrogen fluoride have resulted in development of alternative strong Lewis acid-based reagents for final deprotection and cleavage steps in Boc/Bzl peptide synthesis. The acids employed are high-boiling liquids unlike hydrogen fluoride, however most peptides could be quite easily isolated from the cleavage cocktails due to their favorable physico-chemical properties: they are usually precipitated with ether. We found that this simple procedure is not suitable for the isolation of Deltorpin II peptides and its analogues. Therefore we developed alternative isolation methods and successfully purified these peptides. The procedures developed could be utilized in purification of other hydrophobic peptides.

Keywords: Boc/Bzl-methodology, Deltorpin II, Lewis acid, solid phase peptide synthesis



УДК 577.2:547.75

ПОЛУЧЕНИЕ АКТИВНЫХ АМИНОГРУПП НА ПОВЕРХНОСТИ ПОЛИЭТИЛЕНТЕРЕФТАЛАТНОЙ ПЛЕНКИ И ИХ КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ДЛЯ ТЕХНОЛОГИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МИКРОЧИПОВ

© 2024 г. Г. Ф. Штылев*, И. Ю. Шишкин*, С. А. Лапа*, В. Е. Шершов*, В. Е. Барский*,
С. А. Поляков*, В. А. Василисков*, О. А. Заседателева*,
В. Е. Кузнецова*, А. В. Чудинов*[#]

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

Поступила в редакцию 16.11.2023 г.

После доработки 21.11.2023 г.

Принята к публикации 22.11.2023 г.

Разработан метод получения активных аминок групп на поверхности подложки из полиэтилентерефталата (ПЭТ). Разработан метод количественной оценки концентрации и распределения химически доступных аминок групп на поверхности ПЭТ-подложки с использованием цианинового красителя Су5 и цифровой флуоресцентной микроскопии. Аминок группы могут быть использованы для дальнейшей химической модификации поверхности ПЭТ, прививки различных функциональных групп и ковалентного связывания с биомолекулами, что открывает перспективы широкого использования недорогого ПЭТ в качестве функциональных подложек в биочипах, биосенсорах, устройствах “лаборатория на чипе” и других биотехнологических приложениях.

Ключевые слова: активация поверхности ПЭТ, флуоресценция, цианиновые красители

DOI: 10.31857/S0132342324050092, **EDN:** LQVIRS

ВВЕДЕНИЕ

При исследовании белков и нуклеиновых кислот широко используют анализ по связыванию анализируемых компонентов биологических образцов с молекулярными зондами, закрепленными на поверхности твердых подложек. Анализ по связыванию используют в иммунологических исследованиях в формате микротитровальных планшетов [1], индикаторных тестах на беременность [2], иммунохроматографических полосках (стрипах) [3], олигонуклеотидных и белковых биологических микрочипах [4–7]. В методе биочипов набор олигонуклеотидных или белковых зондов иммобилизуют на подложке в микрочайках по определенным координатам, а затем исследуют одновременное связывание анализируемого об-

разца с набором иммобилизованных зондов. С использованием этого принципа реализован вариант многопараметрического мультиплексного гибридационного анализа ДНК [4, 5].

В качестве подложек используют стекло, кварц, кремний и силоксаны. Для них отработаны методы активации поверхности и прививки функциональных групп с использованием различных производных силана [4, 8–10]. В анализах по связыванию, наряду с кремнийсодержащими подложками, используют подложки из синтетических полимеров, для которых доступны методы активации поверхности и прививки реактивных химических групп. Нашли применение подложки из полиметилметакрилата, поверхность которых достаточно легко активируется в реакциях

Сокращения: ПЭТ – полиэтилентерефталат; ПЭТ-Су5 – полиэтилентерефталат с привитым на поверхности красителем Су5; ПЭТ-NH₂ – полиэтилентерефталат с аминированной поверхностью; ЭДА – этилендиамин; Су5-pNP – *пара*-нитрофениловый эфир индодикарбоцианинового красителя Су5.

[#] Автор для связи: (эл. почта: chud@eimb.ru).

гидролиза, восстановления, аминирования [11]. Значительный интерес представляют подложки из тонкого полиэтилентерефталата (ПЭТ) [12–14]. ПЭТ биосовместим, прозрачен в видимом и ближнем ИК-свете. Благодаря высокой термостойкости на тонких подложках из ПЭТ возможно выполнение анализов не только при окружающей температуре, но и при температурах до 100°C, что важно для ПЦР. Наличие сложноэфирных групп в составе ПЭТ позволяет изменять химические свойства поверхности без затрагивания полимерного массива.

Иммобилизация зондов на поверхности подложки позволяет получать двумерные ячейки с ограниченной концентрацией зондов, приходящихся на единицу поверхности, и снижает их пространственную доступность для взаимодействия с анализируемыми ДНК. Иммобилизация зондов в трехмерной сетке гидрогелевых ячеек позволяет увеличить их концентрацию. В гидрогелевых ячейках, закрепленных на стеклянных подложках, реализованы варианты гибридного анализа нуклеиновых кислот [4, 5], а также некоторые подходы для проведения ПЦР на чипе [15, 16].

Перекрестно-сшитая трехмерная сетка ограничивает пространственную доступность иммобилизованных зондов и затрудняет диффузию компонентов анализируемых проб, что увеличивает время анализа [17]. Для преодоления пространственных и диффузионных препятствий предложено использовать ячейки из перекрестно-сшитой крупнопористой агарозы с праймерами, иммобилизованными на линкерах, которые расщепляются в ходе термоциклической ПЦР [18].

Другое решение для иммобилизации зондов – использование ячеек из щеточных полимеров [19]. Щеточные полимеры закреплены на подложке только одним концом, без образования перекрестно-сшитой сетки, а реактивные химические группы на полимерных цепях используют для иммобилизации зондов [20]. Непосредственное получение щеточных полимеров на поверхности ПЭТ затруднительно, ПЭТ не фотоактивен. В работе Мифтахова с соавт. [21] подложки из ПЭТ покрывали тонким слоем фотоактивного циклоолефинсополимера с высокой адгезией к ПЭТ. На подложках методом фотолитографии получали ячейки из щеточных сополимеров акриловой кислоты и акриламида. Множественные карбоксильные группы на полимерных цепях использовали для иммобилизации зондов.

Свойства ячеек из щеточных полимеров, предназначенных для анализа макромолекул, должны регулироваться в процессе получения ячеек. Радикальная полимеризация “от поверхности” с фотоинициаторами, находящимися в растворе, затрудняет такое регулирование [20]. Молекулы фотоинициаторов радикальной полимеризации должны быть иммобилизованы на поверхности подложки, и их поверхностная концентрация должна регулироваться [22].

Контролируемый аминолитиз поверхности ПЭТ диаминами в мягких условиях позволяет получать аминокгруппы [23], которые могут использоваться для иммобилизации фотоинициаторов. В работе Avny et al. [24] для контроля аминокгрупп на поверхности ПЭТ использовали “кислотный фукцин”, который связывается с аминокгруппами с образованием солей. Связавшийся краситель затем десорбировали, и его количество определяли спектрофотометрически. В работе Bech et al. [25] для этих целей использовали пикриновую кислоту. Поверхность ПЭТ в значительной мере гидрофобна и физически сорбирует полиароматический краситель. Поэтому количество красителя, связавшегося с поверхностью, зависит не только от концентрации аминокгрупп, но и от условий сорбции отмывки и десорбции. При этом важна не общая концентрация аминокгрупп на поверхности, а концентрация доступных аминокгрупп, способных к ковалентному связыванию с образованием амидных связей.

Цель данного исследования – разработка метода аминолита поверхности ПЭТ-подложки и контроля химически доступных аминокгрупп по связыванию с красителем Су5 с флуоресцентной регистрацией результатов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе подложки из пленочного ПЭТ обрабатывали растворами этилендиамина (ЭДА). В мягких условиях происходит разрыв части сложноэфирных групп, находящихся на поверхности. Одна из аминокгрупп этилендиамина присоединяется к фрагменту терефталевой кислоты, который связан с полимерной цепью, входящей в состав полимерного массива, а вторая аминокгруппа остается свободной. Получали подложку с аминированной поверхностью, ПЭТ-NH₂ (рис. 1).

Количественный анализ концентрации доступных аминокгрупп на поверхности ПЭТ-NH₂ проводили после ковалентного связывания с флуоресцентным цианиновым красителем Су5 и регистрации флуоресцентных сигналов методом

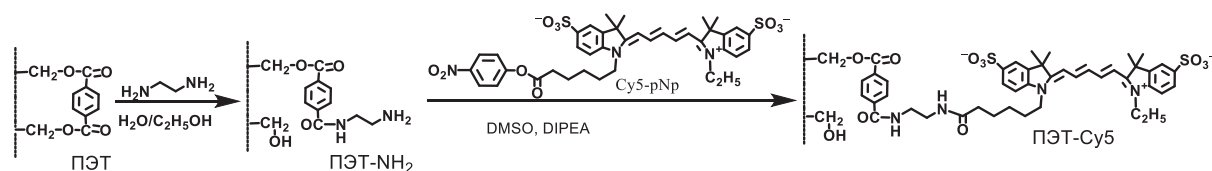


Рис. 1. Схема химической модификации поверхности ПЭТ-пленки.

цифровой флуоресцентной микроскопии. Для этого аминированную пленку ПЭТ-NH₂ обрабатывали активированным производным красителя, *para*-нитрофениловым эфиром Cy5-pNP, в диметилсульфоксиде. Подложку тщательно отмывали от не связавшегося с пленкой красителя. Ковалентная связь красителя Cy5 с аминогруппами, полученными на поверхности ПЭТ-пленки, обеспечивает прочное связывание и возможность исчерпывающей отмывки от несвязавшегося красителя, что увеличивает достоверность и воспроизводимость результатов. Получили ПЭТ-подложку, у которой доступные аминогруппы маркированы флуоресцентным красителем, ПЭТ-Cy5 (рис. 1).

Краситель Cy5 и его активное производное, *para*-нитрофениловый эфир, Cy5-pNP предварительно синтезировали по ранее отработанному методу [26]. Схема синтеза представлена на рис. 2.

Для количественной оценки концентрации молекул красителя, связавшихся с поверхностью подложки, был изготовлен калибровочный чип с ячейками, содержащими тот же самый краситель Cy5 с пошаговой убывающей концентрацией молекул красителя на единицу поверхности. Измерения интенсивности флуоресценции подложек с ячейками, содержащими известную концентрацию красителя на единицу поверхности, показали, что флуоресцентному сигналу в одну относительную единицу (отн. ед.) при выдержке 100 мс соответствует концентрация Cy5 8.44×10^{-4} пмоль/см².

В табл. 1 представлены вычисленные значения концентрации аминогрупп на поверхности ПЭТ, полученные реакцией с этилендиамином в различных условиях и последующем связывании с флуоресцентным красителем Cy5. Приведены усредненные значения при трех повторях.

Таблица 1. Результаты обработки поверхности ПЭТ растворами этилендиамина (ЭДА)

Реагенты	Концентрация ЭДА, %	Время, мин	Концентрация NH ₂ -групп, пмоль/см ²
ЭДА/этанол	10	15	0.67
		30	0.78
		60	1.01
		120	1.39
		240	5.49
ЭДА/вода	10	15	0.55
		30	0.59
		60	0.70
		120	0.89
		240	1.69
		480	4.90
ЭДА/вода	25	60	1.35
		120	1.71
		240	7.43
ЭДА/этанол	50	15	1.86
		30	10.04
		60	23.13
ЭДА/вода	50	15	1.10
		30	1.77
		60	3.33
		120	4.30

Примечание: концентрация ЭДА приведена в процентах (v/v), температура аминирования 70°C.

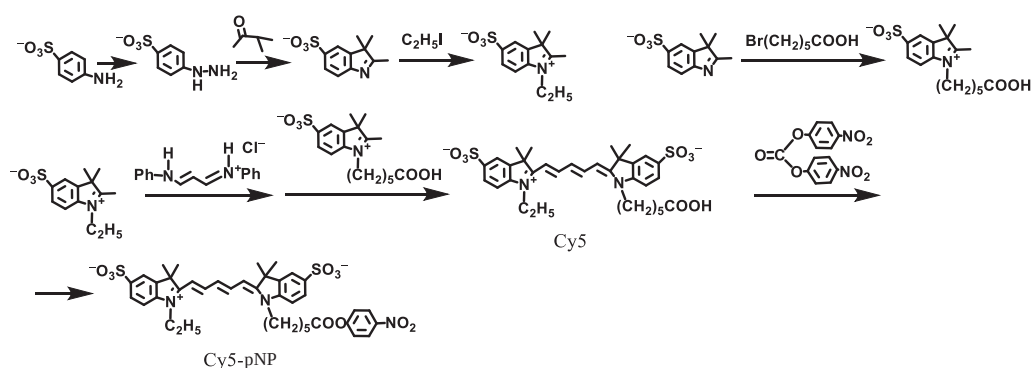


Рис. 2. Схема синтеза флуоресцентного красителя Cy5 и активированного производного *para*-нитрофенилового эфира красителя Cy5-pNP.

Как видно из данных табл. 1, с ростом концентрации этилендиамина концентрация аминогрупп на поверхности возрастает, при этом в спиртовых растворах концентрация аминогрупп выше, чем в водных растворах. Однако при достижении концентрации NH_2 -групп ~ 8 пмоль/ cm^2 начинают наблюдаться следы деградации поверхности ПЭТ-подложки, наблюдаемой визуальнo в виде помутнения первоначально гладкой и блестящей поверхности.

Оптимальные условия для получения аминогрупп на поверхности ПЭТ-подложки наблюдались для 10%-ной объемной концентрации этилен-

диамина в водном растворе и времени реакции до 8 ч, а в спиртовом растворе – до 4 ч. В этих условиях, при визуальном контроле, поверхность ПЭТ-подложки остается гладкой и блестящей, без видимых повреждений.

На рис. 3 представлена микрофотография ПЭТ-подложки в свете флуоресценции красителя Cy5 после аминирования 10%-ным водным раствором этилендиамина в течение 8 ч при 70°C и связывания аминогрупп с флуоресцентным красителем Cy5-pNP. Показан график распределения сигналов вдоль проведенной линии на флуоресцентном изображении подложки.

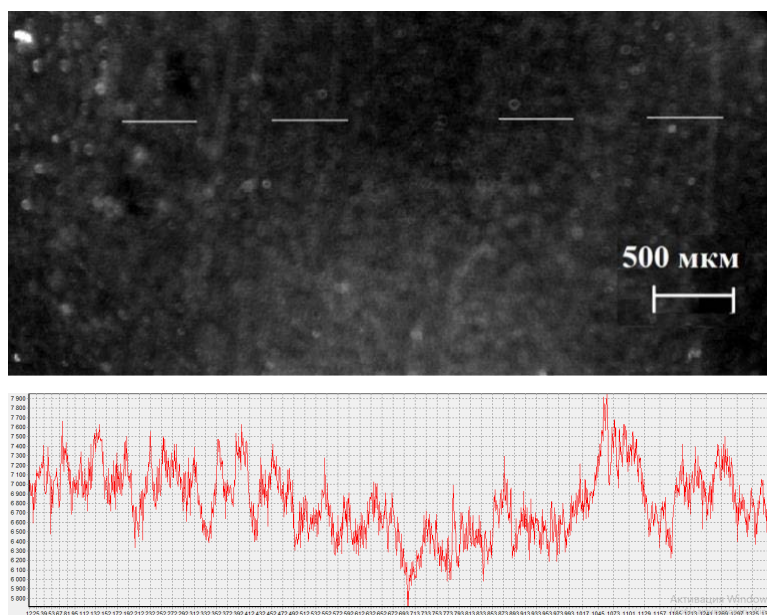


Рис. 3. Микрофотография ПЭТ-подложки в свете флуоресценции красителя Cy5 после аминирования 10%-ным водным раствором этилендиамина в течение 8 ч при 70°C и связывания аминогрупп с флуоресцентным красителем Cy5-pNP. Показан график распределения сигналов вдоль проведенной линии на флуоресцентном изображении подложки.

Как следует из данных, представленных на рис. 3, аминокруппы на поверхности распределяются неравномерно, что, видимо, связано с наличием аморфных и кристаллических участков на поверхности ПЭТ-подложки. При получении ячеек со щеточными полимерами будет наблюдаться химическая неоднородность по площади ячеек. Для нивелирования неоднородности химических свойств подложки под ячейкой следует увеличивать площадь ячейки, чтобы под ячейкой оказывалось несколько разнородных микроучастков. Для чипов повышенной плотности с супермелкими ячейками нужны подложки с химически более однородной поверхностью, например, кристаллический кремний.

Флуоресцентные сигналы вдоль проведенной линии колеблются в диапазоне 5900–7900 отн. ед., что после вычислений с вычетом фонового сигнала соответствует концентрации аминокрупп 4.1–5.7 пмоль/см² при среднем значении 4.9 пмоль/см². На выдержке 100 мс фоновый сигнал составляет 1100 отн. ед., он суммируется из темнового сигнала видеокамеры 1000 отн. ед., собственной флуоресценции ПЭТ 50 отн. ед. и флуоресценции сорбировавшихся к подложке молекул красителя 50 отн. ед. Разница концентрации аминокрупп на поверхности значительная. При получении ячеек со щеточными полимерами будет наблюдаться неоднородность концентрации щеточных полимеров в ячейках в зависимости от положения ячеек на поверхности подложки. Соответственно, будет наблюдаться неоднородность концентрации иммобилизованных зондов в разных ячейках на одной подложке. Для нивелирования влияния неоднородности иммобилизации зондов от ячейки к ячейке следует зонды дополнительно маркировать спектрально независимыми красителями, и сигналы, полученные от индикаторной флуоресцентной метки, нормировать на количество иммобилизованного зонда в ячейке: для сэндвич-иммуноанализа это нормировка сигнала индикаторной метки на проявляющих антителах на сигнал от метки на первичных захватывающих антителах, для ПЦР на чипе – нормировка сигналов от встроенных маркированных нуклеотидов на сигнал от иммобилизованных в ячейках праймеров.

Из вычислений следует, что при поверхностной концентрации аминокрупп 5 пмоль/см² расстояние между аминокруппами на поверхности будет ~6 нм. При иммобилизации через аминокруппы фотоинициаторов радикальной полимеризации и последующем получении цепей полимеров методом радикальной полимеризации “от поверхности” расстояние между полимерными цепями будет ~6 нм, что находится в диапазоне предпочтительных значений с тенденцией в сторону увеличения рас-

стояний между аминокруппами. Размер молекул иммуноглобулинов составляет ~10 нм. Для получения небольших концентраций аминокрупп на поверхности ПЭТ лучше подходит 10%-ный водный раствор этилендиамина, реакция идет медленно, легче регулировать концентрацию аминокрупп.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и реагенты. Использовали подложки из пленочного полиэтилентерефталата (ПЭТ) толщиной 125 мкм (ГОСТ 24234-80, плотность 1.39 г/см³, молекулярная масса 20–40 кДа) и размером 25 × 75 мм. Для удаления возможных загрязнений с поверхности подложки промывали 2%-ным раствором моющего средства (Roth Ultrasonol 7 Neutral, Art. No 5356.1) в дистиллированной воде в ультразвуковой бане (Elmasonic S 30, Elma, Германия) в течение 10 мин, промывали струей деионизированной воды, далее обрабатывали ацетоном в ультразвуковой бане в течение 30 мин и высушивали при 60°C в течение 1 ч на открытом воздухе. Использовали 96%-ный этанол марки х.ч., этилендиамин 99.5% (Fluka, Германия; Art. No 03550).

Синтез активного флуоресцентного красителя Cy5-pNP. Краситель Cy5 и активное производное, *para*-нитрофениловый эфир красителя Cy5-pNP, синтезировали по методу Spitsyn et al. [26]. Схема синтеза представлена на рис. 1.

Аминирование поверхности ПЭТ-подложки. Аминирование пленочных ПЭТ-подложек размером 25 × 75 мм проводили в закрытой пробирке из полипропилена, содержащей 40 мл раствора этилендиамина. Пробирки закрывали и помещали в термостат при 70°C на заданное время. Затем подложки доставали, промывали струей деионизированной воды, сушили в течение 1 ч на открытом воздухе, а затем сушили в вакуум-эксикаторе (Медлабстекло, Россия) над P₂O₅ в течение 16 ч. Хранили в эксикаторе над свежим P₂O₅.

Флуоресцентное маркирование аминокрупп на ПЭТ-подложке. На подложке формировали разборную камеру объемом 30 мкл, площадь подложки в камере 50 мм². В камеру вносили 30 мкл раствора активированного красителя Cy5-pNP с концентрацией 1 нмоль/мкл и диизопропилэтиламина (DIPEA) с концентрацией 60 нмоль/мкл в диметилсульфоксиде, инкубировали при комнатной температуре в течение 16 ч. После окончания реакции раствор удаляли, камеру разбирали, подложки промывали струей деионизированной воды.

Для удаления красителя, не связавшегося с пленкой, ее тщательно отмывали. Для этого пленку помещали в закрытую пробирку из полипропилена с 40 мл 50%-ного раствора ацетонитрила в 50 мм триэтиламонийгидрокарбонате (рН 7.5), выдерживали на ультразвуковой бане 20 мин. Процедуру повторяли 3 раза со сменой растворителя. Затем промывали струей деионизированной воды, после чего сушили при комнатной температуре в течение 1 ч на открытом воздухе. Ковалентная связь красителя Cu5 с аминогруппами, полученными на поверхности ПЭТ-пленки, обеспечивает прочное связывание и возможность исчерпывающей отмывки от несвязавшегося красителя.

Флуоресцентные сигналы. Для измерения флуоресцентных сигналов использовали метод цифровой флуоресцентной микроскопии с регистрацией интенсивности сигналов флуоресценции в свете флуоресценции красителя Cu5 [27]. Флуоресцентные сигналы на пленке регистрировали на портативном анализаторе (ООО “БИОЧИП-ИМБ”, Россия) с лазерным возбуждением при 650 нм, запирающим фильтром 716 ± 43 нм (Semrock, США) и цифровой ПЗС-камерой. Изображение анализировали с помощью программы ImaGeWare (ООО “БИОЧИП-ИМБ”, Россия) [27, 28]. В спектральном диапазоне флуоресценции красителя Cu5 полимерная подложка из ПЭТ-пленки практически не флуоресцирует и не влияет на регистрируемые сигналы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании были разработаны следующие методы: 1) метод получения активных аминогрупп на поверхности ПЭТ-подложки; 2) метод количественной оценки концентрации химически доступных аминогрупп на поверхности ПЭТ-подложки с использованием индодикарбоцианинового красителя Cu5 и цифровой флуоресцентной микроскопии; 3) метод количественной оценки распределения химически доступных аминогрупп на поверхности ПЭТ-подложки с использованием математической программы анализа интенсивностей флуоресцентных сигналов.

Предложенный метод контроля химически доступных аминогрупп на поверхности аминированной ПЭТ-пленки может быть использован применительно к аминированным поверхностям других материалов.

Разработанные методы могут найти применение в разработке технологии параллельного множественного экспресс-микроанализа нуклеиновых кислот “лаборатория на чипе” для выявления соматических и инфекционных заболеваний человека.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Р.А. Юрасову за помощь при использовании компьютерной программы ImaGeWare (ООО “БИОЧИП-ИМБ”, Россия).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-14-00257).

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. *Ahsan H.* // *Comp. Clin. Pathol.* 2022. V. 31. P. 333–345.
<https://doi.org/10.1007/s00580-021-03302-4>
2. *Gnoth C., Johnson S.* // *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2014. V. 74. P. 661–669.
<https://doi.org/10.1055/s-0034-1368589>
3. *Mao X., Wang W., Du T.-E.* // *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2013. V. 186. P. 315320.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.05.083>
4. *Rubina A.Yu., Pan'kov S.V., Dementieva E.I., Pen'kov D.N., Butygin A.V., Vasiliskov V.A., Chudinov A.V., Mikheikin A.L., Mikhailovich V.M., Mirzabekov A.D.* // *Anal. Biochem.* 2004. V. 325. P. 92–106.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.10.010>
5. *Gryadunov D., Dementieva E., Mikhailovich V., Nasedkina T., Rubina A., Savvateeva E., Fesenko E., Chudinov A., Zimenkov D., Kolchinsky A., Zasedatelev A.* // *Exp. Rev. Mol. Diagn.* 2011. V. 11. P. 839–853.
<https://doi.org/10.1586/ERM.11.73>
6. *Miller M.B., Tang Y.W.* // *Clin. Microbiol.* 2009. V. 22. P. 611–633.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00019-09>
7. *Zhu H., Qian J.* // *Adv. Genet.* 2012. V. 79. P. 123–155.
8. *Rother D., Sen T., East D., Bruce I.J.* // *Nanomedicine.* 2011. V. 6. P. 281–300.
<https://doi.org/10.2217/nnm.10.159>
9. *Akkoyun A., Bilitewski U.* // *Biosensors and Bioelectronics.* 2002. V. 17. P. 655–664.
[https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(02\)00029-5](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(02)00029-5)
10. *Tu Q., Wang J.-C., Zhang Y., Liu R., Liu W., Ren L., Shen S., Xu J., Zhao L., Wang J.* // *Rev. Anal. Chem.* 2012. V. 31. P. 177–192.
<https://doi.org/10.1515/revac-2012-0016>
11. *Hosseini S., Ibrahim F., Djordjevic I., Koolea L.H.* // *Analyst.* 2014. V. 139. P. 2933–2943.
<https://doi.org/10.1039/c3an01789c>

12. Dimitrievska S., Maire M., Diaz-Quijada G.A., Robitaille L., Ajji A., Yahia L., Moreno M., Merhi Y., Rureau M. // *Macromol. Biosci.* 2011. V. 11. P. 493–502. <https://doi.org/10.1002/mabi.201000390>
13. Miftakhov R.A., Lapa S.A., Shershov V.E., Zasedateleva O.A., Guseinov T.O., Spitsyn M.A., Kuznetsova V.E., Mamaev D.D., Lysov Yu.P., Barsky V.E., Timofeev E.N., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // *Biophysics.* 2018. V. 63. P. 512–518. <https://doi.org/10.1134/S0006350918040127>
14. Miftakhov R.A., Lapa S.A., Kuznetsova V.E., Zolotov A.M., Vasiliskov V.A., Shershov V.E., Surzhikov S.A., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2021. V. 47. P. 1345–1347. <https://doi.org/10.1134/S1068162021060182>
15. Lapa S.A., Klochikhina E.S., Miftakhov R.A., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2021. V. 47. P. 1122–1125. <https://doi.org/10.1134/S1068162021050290>
16. Лана С.А., Мифтахов Р.А., Клочихина Е.С., Аммури Ю.И., Благодатских С.А., Шершова В.Е., Заседателев А.С., Чудинов А.В. // *Мол. биология.* 2021. Т. 55. С. 944–955. <https://doi.org/10.1134/S0026893321040063>
17. Zubtsov D.A., Savvateeva E.N., Rubina A.Yu., Pan'kov S.V., Kononova E.V., Moiseeva O.V., Chechetkin V.R., Zasedatelev A.S. // *Anal. Biochem.* 2007. V. 368. P. 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.04.040>
18. Zolotov A.M., Miftakhov R.A., Ikonnikova A.Y., Lapa S.A., Kuznetsova V.E., Vasiliskov V.A., Shershov V.E., Zasedatelev A.S., Nasedkina T.V., Chudinov A.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2022. V. 48. P. 858–863. <https://doi.org/10.1134/S1068162022040203>
19. Rendl M., Bönisch A., Mader A., Schuh K., Prucker O., Brandstetter T., Rühe J. // *Langmuir.* 2011. V. 27. P. 6116–6123. <https://doi.org/10.1021/la1050833>
20. Ma Y., Liu L., Yang W. // *Polymer.* 2011. V. 52. P. 4159–4173. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2011.07.027>
21. Miftakhov R.A., Ikonnikova A.Yu., Vasiliskov V.A., Lapa S.A., Levashova A.I., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Zasedatelev A.S., Nasedkina T.V., Chudinov A.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2023. V. 49. P. 1143–1150. <https://doi.org/10.1134/S1068162023050217>
22. Mueller M., Bandl C., Kern W. // *Polymers.* 2022. V. 14. P. 608. <https://doi.org/10.3390/polym14030608>
23. Bui L.N., Thompson M., McKeown N.B., Romaschin A.D., Kalman P.G. // *Analyst.* 1993. V. 118. P. 463–474.
24. Avny Y., Rebenfeld L. // *J. Appl. Polymer Sci.* 1986. V. 32. P. 4009–4025.
25. Bech L., Meylheuc T., Lepoittevin B., Roger P. // *J. Polymer Science. Part A: Polymer Chem.* 2007. V. 45. P. 2172–2183. <https://doi.org/10.1002/pola.21983>
26. Spitsyn M.A., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Emelyanova M.A., Guseinov T.O., Lapa S.A., Nasedkina T.V., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // *Dyes and Pigments.* 2017. V. 147. P. 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.07.052>
27. Lysov Y., Barsky V., Urasov D., Urasov R., Cherepanov A., Mamaev D., Yegorov Y., Chudinov A., Surzhikov S., Rubina A., Smoldovskaya O., Zasedatelev A. // *Biomed. Optics Express.* 2017. V. 8. P. 4798–4810. <https://doi.org/10.1364/BOE.8.004798>
28. Barsky V., Perov A., Tokalov S., Chudinov A., Kreindlin E., Sharonov A., Kotova E., Mirzabekov A. // *J. Biomol. Screening.* 2002. V. 7. P. 247–257. <https://doi.org/10.1177/108705710200700308>

Obtaining of Active Amino Groups on a Surface of a Polyethylene Terephthalate Films and Their Quantitative Evaluation

G. F. Shtylev*, I. Yu. Shishkin*, S. A. Lapa*, V. E. Shershov*, V. E. Barsky*, S. A. Polyakov*, V. A. Vasiliskov*, O. A. Zasedateleva*, V. E. Kuznetsova*, and A. V. Chudinov*,[#]

[#]E-mail: chud@eimb.ru

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

A method has been developed for obtaining active amino groups on the surface of a polyethylene terephthalate (PET) substrate. A method has been developed to quantify the concentration and distribution of chemically accessible amino groups on the surface of a PET substrate using the cyanine dye Cy5 and digital fluorescence microscopy. Amino groups can be used for further chemical modification of the PET surface, grafting of various functional groups and covalent binding with biomolecules, which opens up prospects for widespread use of inexpensive PET as functional substrates in biochips, biosensors, “laboratory-on-a-chip” devices and other biotechnological applications.

Keywords: fluorescence, cyanine dyes, activation of polyethylene terephthalate surface



УДК 577.2:547.75

ИММОБИЛИЗАЦИЯ БЕЛКОВЫХ ЗОНДОВ НА БИОЧИПАХ С ЯЧЕЙКАМИ ИЗ ЩЕТОЧНЫХ ПОЛИМЕРОВ

© 2024 г. Г. Ф. Штылев*, И. Ю. Шишкин*, В. Е. Шершов*, В. Е. Кузнецова*,
Д. А. Качуляк*, В. И. Бутвиловская*, А. И. Левашова*, В. А. Василисков*,
О. А. Заседателяева*, А. В. Чудинов*, #

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

Поступила в редакцию 09.12.2023 г.

После доработки 28.12.2023 г.

Принята к публикации 29.12.2023 г.

Изучены способы получения на поверхности полиэтилентерефталатных полимерных подложек полимерного покрытия из поливинилацетата и последующего получения методом фотоиндуцированной радикальной сополимеризации акрилатных мономеров щеточных полимеров. Методом фотолитографии сформированы матрицы ячеек с многочисленными реактивными химическими группами для последующей иммобилизации белков. Апробированы способы активации карбоксильных групп на щеточных полимерах, прикрепленных к поверхности полиэтилентерефталата. Выполнена иммобилизация модельного белка стрептавидина, маркированного флуоресцентным красителем Су3, для проверки метода активации карбоксильных групп. На модели “стрептавидин – биотинилированный иммуноглобулин” апробирован вариант иммунофлуоресцентного анализа в формате биологического микрочипа. Стрептавидин, иммобилизованный в ячейках из щеточных полимеров, сохраняет функциональность и пространственную доступность для связывания с биотинилированным иммуноглобулином и последующим проявлением антителами, флуоресцентно меченными красителем Су5, что открывает перспективы использования биологических микрочипов с ячейками из щеточных полимеров на подложках из полиэтилентерефталата для иммунофлуоресцентного анализа различных белковых мишеней.

Ключевые слова: биочипы, щеточные полимеры, конъюгирование белков, иммобилизация белков, флуоресцентный иммуноанализ

DOI: 10.31857/S0132342324050103, **EDN:** LQSAPV

ВВЕДЕНИЕ

Миниатюризация в электронике оказала огромное влияние на человеческую цивилизацию. Мы находимся в начале аналогичной революции в биотехнологии. Огромный потенциал биочипов для революционного изменения аналитической биохимии был очевиден с момента их изобретения

одновременно несколькими исследовательскими группами, в том числе группой российских ученых под руководством А.Д. Мирзабекова, и получил название метод биочипов [1]. Ключевая задача технологии биочипов заключается в иммобилизации молекулярных зондов в упорядоченных матрицах ячеек с максимальным сохранением аффинности и специфичности зондов, а

Сокращения: ПЭТ – полиэтилентерефталат; ПВАц – поливинилацетат; Bio – биотин; Bio-Su – биотин-ПЭГ4-NHS-эфир; COMU – (1-циано-2-этокси-2-оксоэтиленаминоокси)диметиламинорфоллинокарбениевый гексафторфосфат; Су5-NH₂ – 1-этил-3,3,3',3'-тетраметил-5,5'-дисульфо-1'-(1-амино-7-аза-6-кето-тридекан-13-ил)индодикарбоцианин; Су3-rNP – *пара*-нитрофениловый эфир 1-этил-3,3,3',3'-тетраметил-5,5'-дисульфоиндодикарбоцианин-1'-пентаметилкарбоновой кислоты; Су5-rNP – *пара*-нитрофениловый эфир 1-этил-3,3,3',3'-тетраметил-5,5'-дисульфоиндодикарбоцианин-1'-пентаметилкарбоновой кислоты; DMSO – диметилсульфоксид; DSC – ди-(*N,N'*-сукцинимидил)карбонат; EDC – 1-этил-3(3-диметиламинопропил)-карбодимид гидрохлорид; HOSu – *N*-гидроксисукцинимид; HBTU – 2-(1*H*-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурия гексафторфосфат; MES – 2-(*N*-морфолино)этансульфоновая кислота; Sav – стрептавидин; TSTU – 2-сукцинимидо-1,1,3,3-тетраметилурия тетрафторборат.

Автор для связи: (тел.: +7 (499) 135-98-00; эл. почта: chud@eimb.ru).

также с достижением пространственной доступности зондов для взаимодействия с анализируемыми макромолекулами. Вопросам подбора материалов для изготовления биочипов, функционализации поверхности носителей и способам иммобилизации молекулярных зондов уделяется значительное внимание в публикациях последних лет [2–4].

В щеточных полимерах полимерные цепи закреплены на поверхности подложки одним концом и не связаны между собой. Многочисленные реактивные химические группы на щеточных полимерах используются для ковалентной иммобилизации молекулярных зондов [5]. Ячейки из щеточных полимеров могут обеспечить высокую емкость ковалентной иммобилизации молекулярных зондов, соизмеримую с таковой для 3D-гидрогелевых ячеек. При этом динамическая подвижность полимерных цепей, закрепленных на подложке только одним концом, минимально влияет на диффузию анализируемой пробы к молекулярным зондам, иммобилизованным на щеточных полимерах. Потенциальные преимущества биочипов с ячейками из щеточных полимеров могут быть реализованы только при оптимизации всех стадий процесса получения матрицы ячеек из щеточных полимеров и иммобилизации белковых зондов в ячейках.

Ранее мы сообщали о применимости биочипов с ячейками из щеточных полимеров для анализа последовательностей нуклеиновых кислот [6]. Иммобилизация белковых зондов осложняется возможным многоточечным связыванием белковых зондов с носителем, что затрудняет конформационные изменения белковой макромолекулы при взаимодействии с молекулярной мишенью и влияет на результаты анализа.

Цель данной работы – исследование условий иммобилизации белковых зондов на биочипах с ячейками из щеточных полимеров, получаемых методом фотолитографии, на подложках из полиэтилентерефталата и проверка их применимости для иммунохимического анализа белковых мишеней с индикаторным маркированием проявляющих антител флуоресцентным красителем Cy5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полимерное покрытие полиэтилентерефталата (ПЭТ). На подложку из ПЭТ наносили тонкий слой раствора фотоактивного полимера, поливинилацетата, и фотоинициатора полимеризации, бензофенона, в метилэтилкетоне. Нанесение раствора “при вращении” в центрифуге позволяет

получить тонкий ровный слой полимера. При высыхании растворителя образуется тонкое гидрофобное полимерное покрытие, которое не растворяется и не отслаивается в воде.

Матрица ячеек из щеточных полимеров. Ячейки из щеточных полимеров получали методом фотоинициируемой радикальной полимеризации от поверхности. Бензофенон, находящийся в полимерном поливинилацетатном покрытии, при УФ-облучении инициирует радикальную полимеризацию акриловых мономеров, находящихся в растворе в соприкосновении с полимерным покрытием. Образующиеся полимерные цепи закреплены на поливинилацетатном покрытии одним концом, типа щеток. В зоне УФ-облучения также происходит перекрестное сшивание линейных молекул поливинилацетата в трехмерную сетку с одновременным пришиванием полимерного покрытия к поверхности ПЭТ-подложки [7, 8].

Получаемые ячейки из щеточных полимеров прочно держатся на поверхности подложки, не разрушаются и не отслаиваются в воде и в ацетоне в ультразвуковой бане. Фотолитографический метод позволяет получать упорядоченную матрицу гидрофильных ячеек одного размера с четкими краями на гидрофобной подложке.

Для получения щеточных полимеров использовали водный раствор акриловой кислоты и акриламида. Из смеси мономеров в ходе полимеризации образуются полимерные цепи нерегулярного строения, что уменьшает вероятность их межцепочечного взаимодействия, “складывания” по типу кристаллизации (рис. 1).

Активация ячеек. Для активации карбоксильных групп, находящихся в ячейках на цепях щеточных полимеров, использовали реакцию с *N*-гидроксисукцинимидом в присутствии активаторов с получением *N*-гидроксисукцинимидных эфиров. В качестве активаторов использовали производные карбодиимида: 2-(1*H*-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония гексафторфосфат (HBTU), 2-сукцинимидо-1,1,3,3-тетраметилурония тетрафторборат (TSTU), 1-(циано-2-этокси-2-оксоэтиленаминоокси)диметиламинморфолин окарбениевый гексафторфосфат (COMU), *N*-(3-диметиламинопропил)-*N'*-этилкарбодиимид гидрохлорид (EDC). Активацию проводили в безводном диметилсульфоксиде (DMSO) и водном буферном растворе при pH 5.0. Образующиеся сукцинимидоксикарбонильные группы анализировали по связыванию с аминокислотным красителем Cy5-NH₂ с последующей ре-

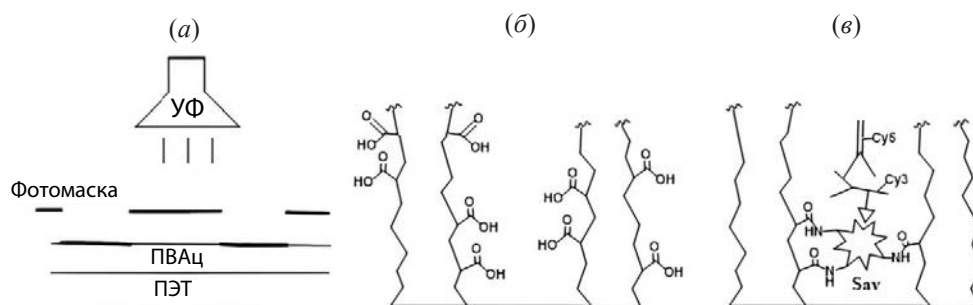


Рис. 1. Схема получения биочипа методом фотолитографии (а), схематичное изображение ячейки из щеточных полимеров (б) и последующей иммобилизации стрептавидина (Sav) и тройного комплекса Sav–Human IgG–Goat anti-Human-Cy5 (в).

гистрацией результатов методом цифровой флуоресцентной микроскопии.

В табл. 1 представлены значения интенсивности флуоресцентных сигналов ячеек биочипа в относительных единицах после активации ячеек различными реагентами и иммобилизации красителя Cy5-NH₂. Установлено, что во всех случаях активации в безводном органическом растворителе DMSO наблюдается неравномерная активация карбоксильных групп. Изображения ячеек в свете флуоресценции связавшегося красителя очень различаются между собой. В то же время в водном растворе наблюдается равномерная активация карбоксильных групп (рис. 2).

Белки. В работе в качестве модели использовали стрептавидин (Sav), иммуноглобулины человека IgG и специфичные к ним козы антитела (Goat anti-Human IgG). Для контроля иммобилизации белки маркировали предварительно синтезированными флуоресцентными красителями Cy3-pNP и Cy5-pNP. Строение красителей представлено на рис. 3. Красители Cy3 и Cy5 спектрально независимы, что позволяет регистрировать белки, маркированные этими красителями, как индивидуально, так и в смеси. Конъюгаты белков с красителями очищали методом гель-фильтрации.

Концентрацию белка в растворе и количество присоединенных молекул красителя на молекулу белка определяли спектрофотометрическим методом с использованием коэффициента экстинкции 200 000 М⁻¹ см⁻¹ (при 280 нм) для стрептавидина, 210 000 М⁻¹ см⁻¹ (при 280 нм) для антител и 150 000 М⁻¹ см⁻¹ (при 550 нм) или 250 000 М⁻¹ см⁻¹ (при 650 нм) для красителей Cy3 и Cy5 соответственно. Конъюгаты Sav-Cy3, Human IgG-Bio-Cy3 и Goat anti-Human IgG-Bio-Cy5 содержали две молекулы красителя на молекулу белка, а конъюгат Goat anti-Human IgG-Cy5 – три молекулы красителя. Небольшое количество молекул красителя, приходящееся на молекулу белка, незначительно влияет на аффинные и специфические свойства маркированных белков.

Иммобилизация белков в ячейках. Стрептавидин (Sav) и флуоресцентно меченый стрептавидин Sav-Cy3 иммобилизовали в ячейках биочипа при капельном нанесении роботом-манипулятором растворов белков на индивидуальные активированные ячейки по заданной раскладке. В ячейках происходит ковалентное связывание стрептавидина с полимерными цепями амидной связью. После инкубации и отмытки от несвязавшихся компонентов на анализаторе флуоресцентного изображения регистрировали флуоресцентные сигналы ячеек.

Таблица 1. Значения интенсивности (*I*) флуоресцентных сигналов ячеек биочипа на канале Cy5 после активации ячеек различными реагентами и иммобилизации красителя Cy5-NH₂

Параметр	Интенсивность флуоресценции, усл. ед.				
	TSTU/HOSu/DMSO	HBTU/HOSu/DMSO	COMU/HOSu/DMSO	EDC/HOSu/DMSO	EDC/HOSu/MES
<i>I</i> _{сигнала}	6000	4000	5000	2600	35000
<i>I</i> _{фона}	30	30	20	30	80
<i>I</i> _{сигнала} <i>I</i> _{фона}	200	133	250	87	438

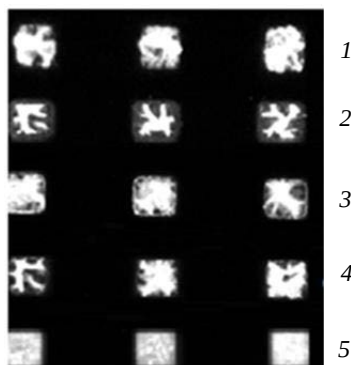


Рис. 2. Флуоресцентное изображение ячеек биочипа в свете флуоресценции красителя Cy5 после активации ячеек различными реагентами и иммобилизации красителя Cy5-NH₂: 1 – активация ячеек EDC/NHS в DMSO, 2 – TSTU/NHS в DMSO, 3 – HBTU/NHS в DMSO, 4 – COMU/NHS в DMSO, 5 – EDC/NHS в MES-буфере.

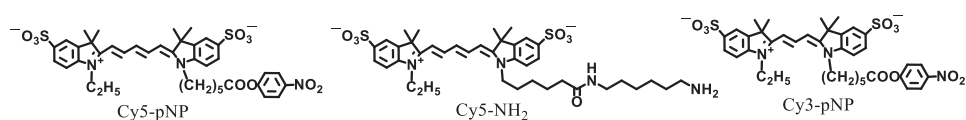


Рис. 3. Схема строения флуоресцентных красителей.

Функциональность стрептавидина, иммобилизованного в ячейках из щеточных полимеров, и его пространственную доступность анализировали по связыванию с биотинилированными козьими антителами, маркированными красителем Cy5. После инкубации и отмывки от несвязавшихся компонентов на анализаторе флуоресцентного изображения регистрировали флуоресцентные сигналы ячеек.

Биотинилированные иммуноглобулины человека иммобилизовали в ячейках биочипа через специфическую связь биотин–стрептавидин. Изготавливали биочипы с ячейками из щеточных полимеров. Карбоксильные группы на полимерных цепях активировали, иглой робота-манипулятора наносили растворы стрептавидина по заданной раскладке. После инкубации и отмывки от несвязавшихся компонентов получали биочипы с ковалентно иммобилизованным стрептавидином. Ковалентно иммобилизованный стрептавидин использовали для мягкой нековалентной иммобилизации биотинилированных иммуноглобулинов человека, маркированных красителем Cy3. После инкубации и отмывки от несвязавшихся компонентов на анализаторе флуоресцентного изображения регистрировали флуоресцентные сигналы ячеек.

Проявление иммобилизованных белков. Иммуноглобулины человека, нековалентно иммобилизованные в ячейках биочипа, проявляли козьими антителами, специфичными к иммуноглобулинам

человека, маркированными красителем Cy5 (Goat anti-Human IgG-Cy5). После инкубации и отмывки от несвязавшихся компонентов на анализаторе флуоресцентного изображения регистрировали флуоресцентные сигналы ячеек. На рис. 1в представлено схематичное изображение ячейки из щеточных полимеров для последующей иммобилизации стрептавидина и тройного комплекса Sav-Human IgG-Goat anti-Human-Cy5.

Обсуждение полученных результатов. Подложки из кремния, стекла, полисилоксанов и золота наиболее популярны в исследованиях, связанных с технологией биочипов, что обусловлено легкостью функционализации поверхности и ковалентной иммобилизацией молекулярных зондов [2–4]. Подложки из доступных синтетических полимеров химически и фотохимически достаточно инертны.

Ранее мы сообщали о получении на поверхности полиэтилентерефталата якорных химических групп (без изменения свойств полимерного массива) щелочным гидролизом и аминированием [9, 10]. Подложки из ПЭТ использовали для получения биочипов с двумерными поверхностными ячейками [11] и с трехмерными агарозными ячейками с термоотщепляемыми праймерами [12]. Ранее мы сообщали [6] об использовании подложек из пленочного полиэтилентерефталата (ПЭТ) с модификацией поверхности для изготовления биочипов с ячейками из щеточных полимеров. Поверхность ПЭТ покрывали пленкой из циклоолефинсополимера. В ячейках биочипа иммоби-

лизовали ДНК-зонды и продемонстрировали их применимость для анализа нуклеиновых кислот.

В данной работе поверхность ПЭТ модифицировали пленкой из фотоактивного поливинилацетата (ПВАц). Для этого ПЭТ-подложки покрывали тонким слоем раствора поливинилацетата (ПВАц) и бензофенона в органическом растворителе. После высыхания на поверхности ПЭТ образуется полимерная пленка, которая не растворяется в воде и удерживает бензофенон. Сверху наливали раствор мономеров и облучали УФ-светом. Происходит радикальная полимеризация с образованием полимеров в растворе и одновременно полимеризация с образованием щеточных полимеров, связанных одним концом с подложкой. ПВАц-покрытие удерживает бензофенон и препятствует его выходу в водный раствор, что приводит к уменьшению доли полимеров в растворе и увеличению доли щеточных полимеров, связанных с подложкой.

Варьирование условий получения покрытия из ПВАц, органического растворителя, концентрации ПВАц и бензофенона, типа и концентрации мономеров, условий УФ-облучения позволило получить на ПЭТ-подложке ячейки из щеточных полимеров. Ячейки держатся за ПЭТ, не отщепляются и не разрушаются в ацетоне, в котором ПВАц растворим.

Химическая доступность карбоксильных групп, расположенных на полимерных цепях, зависит от ряда факторов. Так, получение щеточных полимеров только из акриловой кислоты позволяет получать отчетливые ячейки, но резко снижается емкость химически доступных карбоксильных групп. Видимо, это связано с межцепочечными взаимодействиями, “складыванием” цепей по типу кристаллизации.

При активации карбоксильных групп, расположенных на цепях щеточных полимеров, наблюдается неравномерность активации в органическом безводном растворителе и более равномерная активация в водном буферном растворе.

Средние значения сигналов и отношение сигнал/фон при активации ячеек в водном растворе существенно выше, чем в безводном DMSO (табл. 1).

Возможная причина неравномерности окрашивания ячеек заключается в том, что карбоксильные и амидные группы на щеточных полимерах способны образовывать водородные связи, и гидрофильные цепи щеточных полимеров в безводных условиях “складываются” по типу

кристаллизации. В водных условиях этот эффект реализуется в меньшей степени. Нерегулярное строение полимерных цепей за счет использования смеси акриловой кислоты и акриламида также уменьшает эффект “складывания”. В пользу этого предположения свидетельствует то, что при использовании только акриловой кислоты на подложке получают отчетливые ячейки, но резко снижается емкость химически доступных карбоксильных групп. В дальнейшем для уменьшения этого эффекта нужно изменять состав мономеров, используемых для получения щеточных полимеров.

Концепция изготовления биочипов с белковыми зондами, иммобилизованными в ячейках из щеточных полимеров, основана на двухэтапном методе. Первоначально в жестких условиях методом фотолитографии получали матрицу гидрофильных ячеек одного размера с четкими границами, регулярно расположенными на гидрофобной поверхности подложки, прочно связанных с подложкой. Затем капельно роботоманипулятором наносили растворы стрептавидина в заранее сформированные ячейки по координатам ячеек. Игла робота-манипулятора забирает из емкости микрокаплю раствора белкового зонда и переносит ее в ячейку. Раствор всасывается гидрофильной ячейкой и не растекается по гидрофобной поверхности, окружающей ячейку. В ячейках белок связывается с предварительно активированными карбоксильными группами амидной связью.

После инкубации и отмытки от несвязавшихся компонентов на анализаторе флуоресцентного изображения регистрировали флуоресцентные сигналы ячеек.

На рис. 4 представлена флуоресцентная картина биочипа в свете флуоресценции красителя Cu3 после иммобилизации стрептавидина (Sav) и стрептавидина, маркированного Cu3 (Sav-Cu3). На графике распределения флуоресцентных сигналов на канале Cu3 вдоль проведенных линий на флуоресцентном изображении рядов 2 и 5 со стрептавидином, маркированным красителем Sav-Cu3, видно, что сигналы между ячейками и внутри ячеек распределены не совсем равномерно. Так, вычисленные средние сигналы по рядам 2 и 5 с Sav-Cu3 составляют 720 и 914 отн. ед. соответственно.

Адсорбированного белка Sav-Cu3 вне границ ячеек рядов 1 и 5 нет. При этом сигналы рядов 1 и 4 с иммобилизованным Sav составляют 46 и 53 отн. ед., что близко к среднему сигналу пустых ячеек ряда 3 – 23 отн. ед. Примечательно, что фоновый

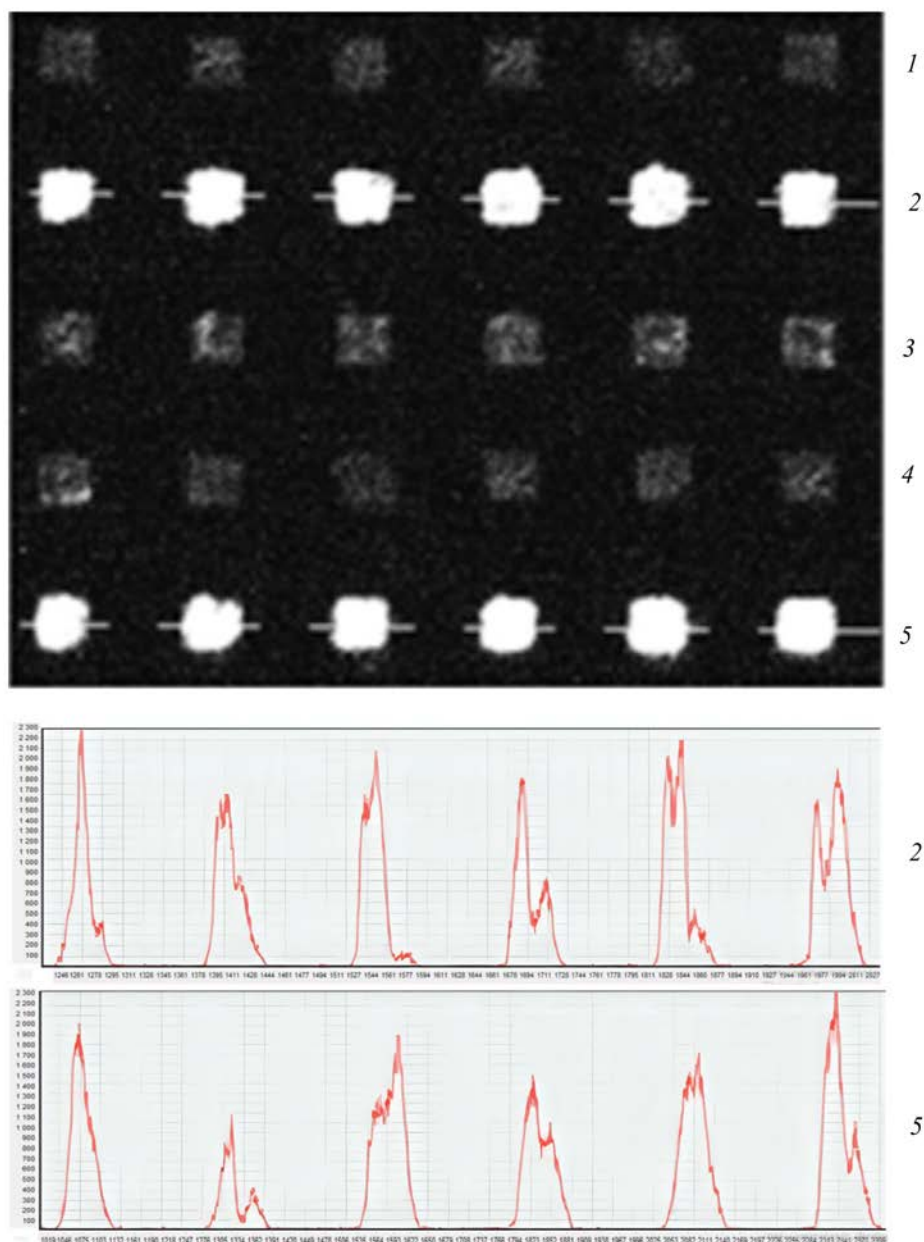


Рис. 4. Флуоресцентная картина биочипа в свете флуоресценции красителя Cy3 после иммобилизации стрептавидина (Sav) и стрептавидина, маркированного Cy3 (Sav-Cy3): 1 и 4 – Sav, 2 и 5 – Sav-Cy3, 3 – пустые ячейки. Показан график распределения сигналов вдоль проведенных линий 2 и 5 на флуоресцентном изображении.

сигнал подложки между ячейками составляет 7 отн. ед. Отношение сигнала к фону, контрастность составляет более 100, отношение сигнала ячеек с иммобилизованными Sav-Cy3 к сигналу пустых ячеек – более 30.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что капельное нанесение раствора белка в заранее сформированную матрицу активированных ячеек из щеточных полимеров вполне применимо.

Иммобилизация белков в ячейках из щеточных полимеров с многочисленными активированными карбоксильными группами может сопровождаться множественным связыванием по аминокетам, экспонированным на поверхности белковой глобулы. В результате аффинность иммобилизованного белка может быть снижена.

На биочип с иммобилизованным Sav-Cy3 и Sav наносили раствор козьих антител против иммуноглобулина человека, маркированных

биотином и красителем Cy5 (Goat anti-Human IgG-Bio-Cy5). После инкубации и отмытки от несвязавшихся компонентов на анализаторе флуоресцентного изображения регистрировали флуоресцентные сигналы ячеек. На рис. 5 представлена флуоресцентная картина биочипа на канале Cy5 с иммобилизованным стрептавидином (Sav) и стрептавидином, маркированным Cy3 (Sav-Cy3), после инкубации с козьими антителами против иммуноглобулина человека, маркированными биотином и красителем Cy5 (Goat anti-Human IgG-Bio-Cy5). Показан график распределения сигналов вдоль проведенных линий на флуоресцентном изображении рядов 4 и 5.

На графике распределения флуоресцентных сигналов на канале Cy5 вдоль проведенных линий на флуоресцентном изображении рядов 4

и 5 со стрептавидином (Sav) и стрептавидином, маркированным красителем Sav-Cy3, видно, что сигналы между ячейками и внутри ячеек распределены неравномерно.

Вычисленные средние сигналы по рядам 2 и 5 с иммобилизованным Sav-Cy3 составляют 1034 и 2029 отн. ед. соответственно, для рядов 1 и 4 с иммобилизованным Sav без флуоресцентной метки – 1267 и 1675 отн. ед. соответственно. Средний сигнал ряда 3 с пустыми ячейками составлял 57 отн. ед., отношение целевого сигнала к сигналу пустых ячеек – более 18. При этом фоновый сигнал подложки между ячейками составляет 9 отн. ед., что свидетельствует о низкой неспецифической сорбции козьих антител, маркированных биотином и красителем Cy5.

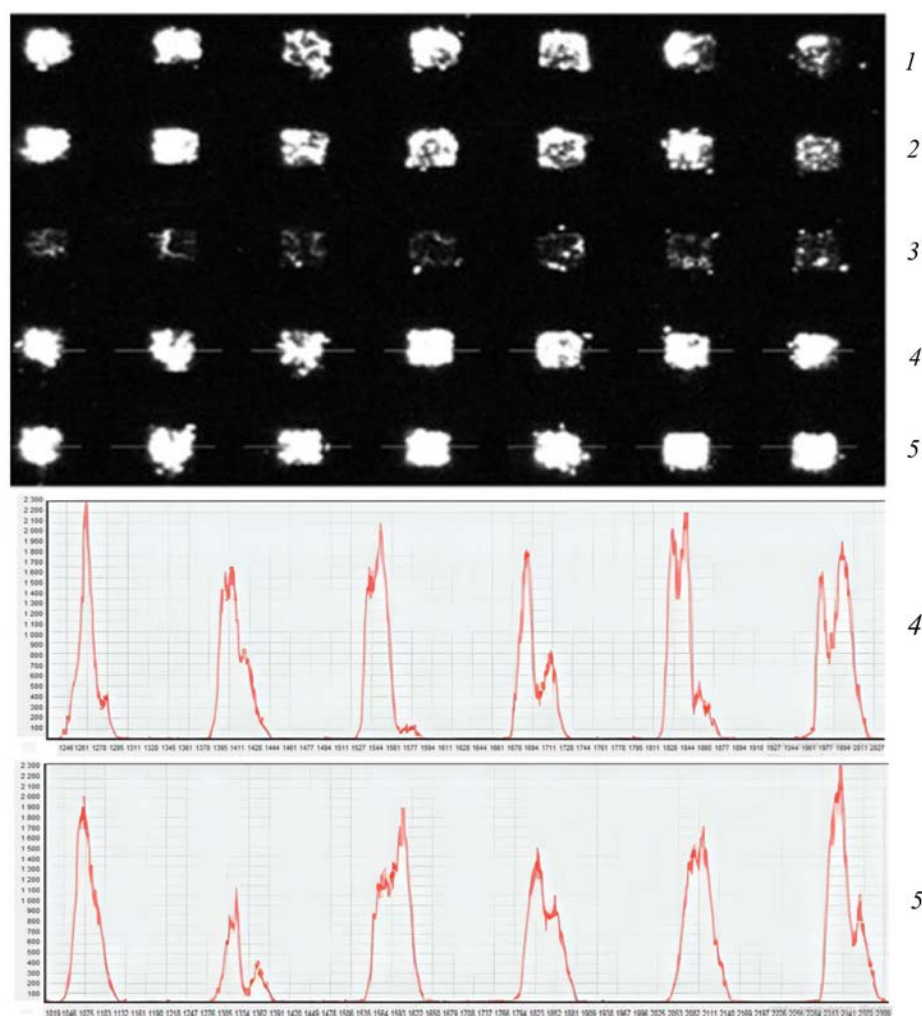


Рис. 5. Флуоресцентная картина биочипа на канале Cy5 с иммобилизованным стрептавидином (Sav) и стрептавидином, маркированным Cy3 (Sav-Cy3), после инкубации с козьими антителами против иммуноглобулина человека, маркированными биотином и красителем Cy5 (Goat anti-Human IgG-Bio-Cy5). Ряды 1 и 4 содержат Sav, 2 и 5 – Sav-Cy3, 3 – пустые ячейки. Показан график распределения сигналов вдоль проведенных линий 4 и 5 на флуоресцентном изображении.

В итоге можно сделать вывод о том, что стрептавидин, иммобилизованный в ячейках щеточных полимеров ковалентным связыванием по аминок группам стрептавида, вполне доступен для связывания с биотинилированными антителами. Двойной белковый комплекс может образовываться в ячейках из щеточных полимеров.

Биотинилированные иммуноглобулины человека (Human IgG-Bio-Cy3) нековалентно иммобилизовали в ячейках биочипа через специфическую связь биотин–стрептавидин. На рис. 6 представлена флуоресцентная картина биочипа в свете флуоресценции красителя Cy3 после иммобилизации Human IgG-Bio-Cy3. Показан график распределения сигналов вдоль проведенных

линий на флуоресцентном изображении рядов 1 и 3. Видно, что сигналы между ячейками и внутри ячеек распределены неравномерно.

Средние сигналы для рядов 1 и 3 с иммобилизованным стрептавидином составляют 2190 и 2916 отн. ед. соответственно, средний сигнал ряда 2 с пустыми ячейками – 85 отн. ед., отношение целевого сигнала к сигналу пустых ячеек – более 27. При этом фоновый сигнал подложки между ячейками составляет 9 отн. ед., что подтверждает низкую неспецифическую адсорбцию иммуноглобулинов, маркированных биотином и красителем Cy3. Отношение сигнала целевых ячеек к фоновому сигналу составляет более 240.

Затем антитела человека, иммобилизованные в ячейках биочипа, проявляли флуоресцентно

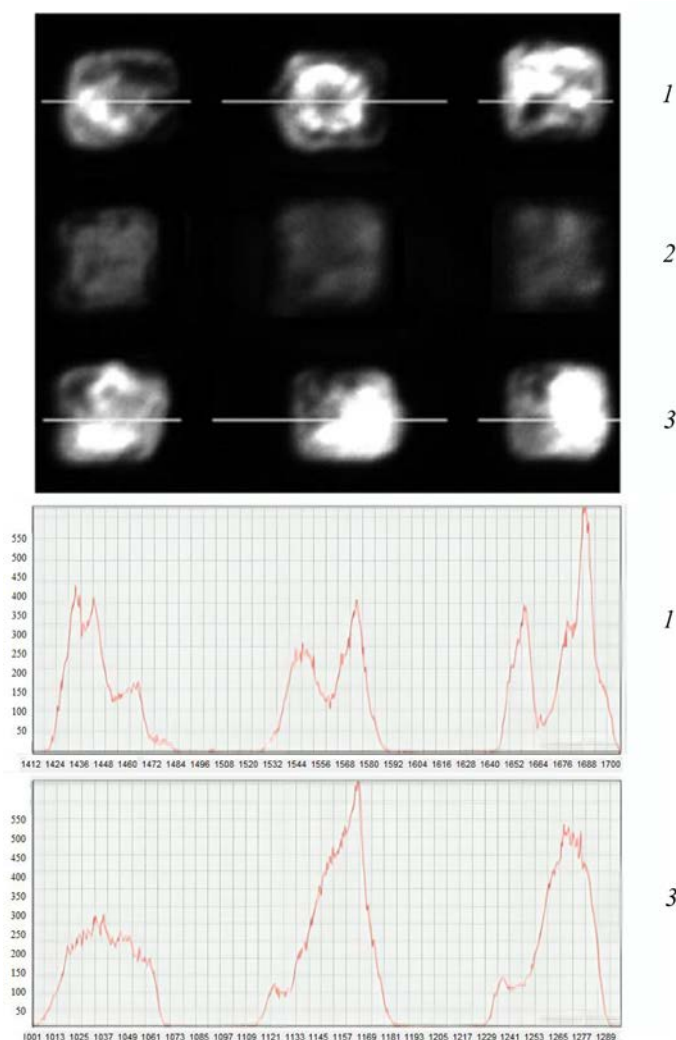


Рис. 6. Флуоресцентная картина биочипа в свете флуоресценции красителя Cy3 с иммобилизованным стрептавидином после инкубации с иммуноглобулинами человека, маркированными биотином и красителем Cy3 (Human IgG-Bio-Cy3) – ряды 1 и 3; ряд 2 – пустые ячейки. Показан график распределения сигналов вдоль проведенных линий 1 и 3 на флуоресцентном изображении.

мечеными козьими антителами против иммуноглобулинов человека (Goat anti-Human IgG-Cy5). В данном случае иммуноглобулины человека выступают в роли белковой мишени.

На рис. 7 представлена флуоресцентная картина биочипа в свете флуоресценции красителя Cy5 с нековалентно иммобилизованными иммуноглобулинами человека после проявления козьими антителами против иммуноглобулинов человека, маркированными красителем Cy5 (Goat anti-Human IgG-Cy5). Показан график распределения сигналов вдоль проведенных линий на флуоресцентном изображении. На графике распределения сигналов вдоль проведенных линий на флуоресцентном изображении видно, что сигналы между ячейками и внутри ячеек распределены неравномерно.

Средние сигналы для рядов 1 и 3 с иммобилизованным стрептавидином составляют 9463 и 8980 отн. ед. соответственно, средний сигнал 2-го ряда с пустыми ячейками – 257 отн. ед. Отношение целевого сигнала к сигналу пустых ячеек составляет более 35, что более чем достаточно для уверенной регистрации белковой мишени. При этом фоновый сигнал подложки между ячейками составляет 95 отн. ед., что свидетельствует о низкой неспецифической сорбции иммуноглобулинов, маркированных биотином и красителем Cy5. Отношение сигнала целевых ячеек к фоновому сигналу составляет более 94. В ячейках могло иметь место многоточечное связывание молекул стрептавида с цепями полимеров, но способность стрептавида связываться с биотинилированными иммуноглобулинами сохраняется.

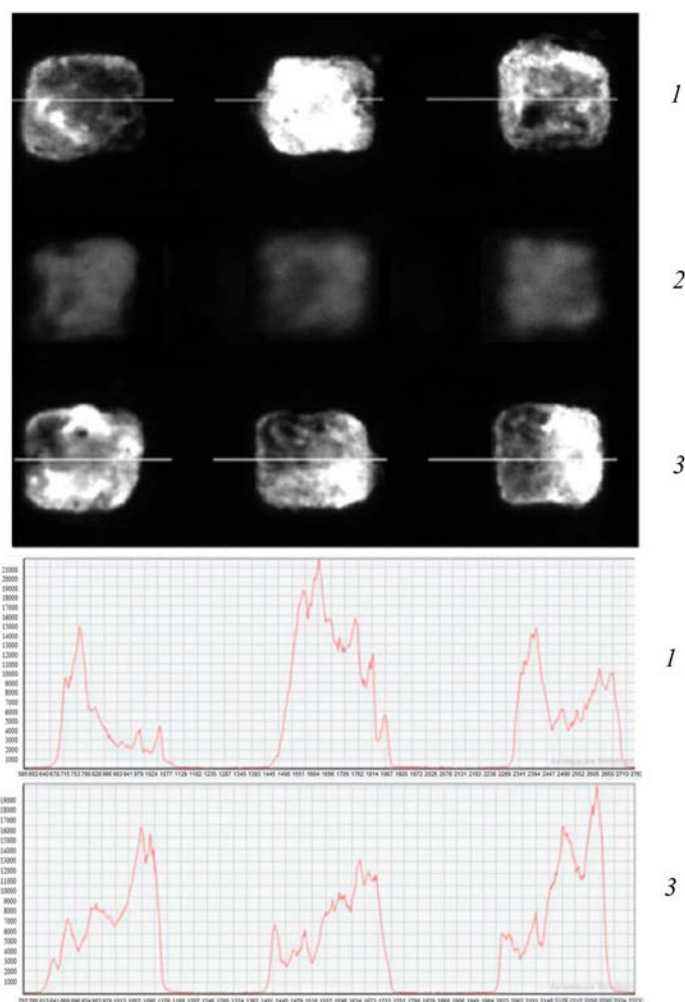


Рис. 7. Флуоресцентная картина биочипа в свете флуоресценции красителя Cy5 с иммобилизованным стрептавидином после инкубации с иммуноглобулинами человека, маркированными биотином и красителем Cy3 (Human IgG-Bio-Cy3), и проявлением козьими антителами против иммуноглобулинов человека, маркированными красителем Cy5 (Goat anti-Human IgG-Cy5) – ряды 1 и 3; ряд 2 – пустые ячейки. Показан график распределения сигналов вдоль проведенных линий 1 и 3 на флуоресцентном изображении.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и реагенты. В работе использовали пленочный полиэтилентерефталат (ПЭТ) толщиной 125 мкм (ГОСТ 24234-80, плотность 1.39 г/см³, молекулярная масса 20–40 кДа), лист пленки нарезают на части размером 25 × 75 мм и использовали поштучно; поливинилацетат (марка М = 100, ТУ 2215-001-98514529-2007); моющее средство Ultrasonol, 7-Neutral (Art. No 5356.1, Carl Roth, Германия); ди-(*N,N'*-сукцинимидил)карбонат (DSC, Art. No 225827), диметилсульфоксид (DMSO, Art. No D2050000) (Fluka, США); *N*-(3-диметиламинопропил)-*N'*-этилкарбодиимид гидрохлорид (EDC) (Art. No 22981, Acros, Бельгия); *N*-гидроксисукцинимид (HONSu) (Art. No AAA1031214, Alfa Aesar, Германия); 2-(1*H*-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурия гексафторфосфат (HBTU, Art. No AAL1347003), 2-сукцинимидо-1,1,3,3-тетраметилурия тетрафторборат (TSTU, Art. No AAL1353806), акриловая кислота (Art. No L04280) (Alfa Aesar, Германия); 1-(циано-2-этокси-2-оксоэтиленаминоокси)диметиламино-морфолино-карбениевый гексафторфосфат (COMU, Art. No 8.51085), диизопропилэтиламин (DIPEA, Art. No 496219), триэтиламмоний гидрокарбонат (TEAHC, Art. No 90360) (Aldrich, США); бензофенон (Art. No AC219680500), Tween 20 (Art. No 233360050) (Acros, Бельгия); акриламид (Art. No A1090.0500, Panreac, Испания); 2-(*N*-морфолино)этансульфоновая кислота (Art. No M8250, Sigma, США); биотин-ПЭГ4-NHS-эфир (Bio-Su) (Lumiprobe, Россия); антитела козы против иммуноглобулинов человека (Goat anti-Human IgG) (Bethyl Laboratories, США); иммуноглобулины человека (Human IgG) (Имтех, Россия); стрептавидин (Sav) (Art. No SA101), Sephadex G-25 Superfine (Art. No S5772), фосфатный буфер солевой (Art. No 6506) (Sigma, США); ацетон, метилэтилкетон, фосфора пятиокись, дихлорметан, ацетонитрил (Химмед, Россия); красители: *пара*-нитрофениловый эфир 1-этил-3,3,3',3'-тетраметил-5,5'-дисульфоиндодикарбоцианин-1'-пентаметиленкарбоновой кислоты (Cy5-pNP), *пара*-нитрофениловый эфир 1-этил-3,3,3',3'-тетраметил-5,5'-дисульфоиндокарбоцианин-1'-пентаметиленкарбоновой кислоты (Cy3-pNP), 1-этил-3,3,3',3'-тетраметил-5,5'-дисульфо-1'-(1-амино-7-аза-6-кето-тридекан-13-ил) индодикарбоцианин (Cy5-NH₂) – синтезировали по методу Spitsyn et al. [13]. Химическое строение красителей представлено на рис. 3. Все растворители и исходные реагенты аналитического ка-

чества были получены из коммерческих источников и использовались без дополнительной очистки.

Оборудование. В работе использовали ультразвуковую баню S 30 (Elmasonic, Германия), мини-центрифугу FV-2400 (Biosan, Латвия), УФ-осветитель ОИ-18А с кварцевой ртутной лампой ДРК-120 (Россия), шейкер с нагревом Heating thermoshaker MHR 13 (Hettich, Германия), спектрофотометр DU 730 (Beckman Coulter Spectrophotometer, США), робот-манипулятор QArray (Genetix, Великобритания), двухканальный портативный анализатор флуоресцентного изображения [14], канал флуоресценции красителя Cy5 с лазерным возбуждением при 650 нм, запирающим фильтром 690 ± 40 нм (Semrock, США), канал флуоресценции красителя Cy3 с лазерным возбуждением при 535 нм, запирающим фильтром 580 ± 27 нм (Semrock, США) и цифровой ПЗС-камерой (ООО “БИОЧИП-ИМБ”, Россия). Флуоресцентные изображения анализировали с помощью программы ImageWare (ООО “БИОЧИП-ИМБ”, Россия).

Подготовка поверхности полиэтилентерефталатных (ПЭТ) подложек. Для удаления возможных загрязнений с поверхности подложки последовательно промывали 2%-ным раствором моющего средства в деионизированной воде (в ультразвуковой бане в течение 10 мин), струей деионизированной воды (в течение 1 мин) и ацетоном (в ультразвуковой бане в течение 30 мин). Подготовленные подложки сушили при 60°C в течение 1 ч на открытом воздухе и хранили в эксикаторе до использования.

Полимерное покрытие поверхности подложек. ПЭТ-подложки покрывали раствором 2%-ного поливинилацета и 0.5%-ного бензофенона в метилэтилкетоне при вращении 1000 об/мин в течение 5 мин (spin coating), сушили на открытом воздухе в течение 1 ч. Для покрытия поверхности подложки раствором полимера при вращении использовали установку на основе мини-центрифуги FV-2400 (Biosan, Латвия) с изготовленным дисковым ротором, снабженным зажимами для подложек, который вращался в закрытом кожухе.

Получение ячеек из щеточных полимеров. Подложку с поливинилацетатным покрытием помещали горизонтально в держатель, сверху на рабочую область накладывали рамку, вырезанную из тетрафторэтилена толщиной 10 мкм, внутрь рамки вносили раствор 0.15 М акриловой кислоты и 0.75 М акриламида в деионизированной воде, сверху накладывали фотомаску и плотно зажимали в держателе. Рамка из тетрафторэти-

лена – это кольцевой спейсер, который определяет расстояние от подложки до фотомаски и формирует камеру высотой 10 мкм. Количество раствора, вносимого внутрь рамки, и покрытие сверху фотомаской обеспечивают отсутствие пузырей воздуха в камере. Фотомаску накладывали рабочей поверхностью вниз, чтобы препятствовать аберрации света при облучении. Фотомаска изготовлена на кварцевом стекле размером 25×75 мм толщиной 1 мм со светонепроницаемым хромовым покрытием с прозрачными квадратными ячейками размером 200×200 мкм с шагом 600 мкм.

Камеру с раствором мономеров через фотомаску облучали УФ-светом с помощью УФ-осветителя в течение 20 мин. Расстояние от УФ-осветителя до фотомаски составляло 10 см. После окончания облучения камеру разбирали, подложки поочередно промывали струей деионизированной воды в течение 1 мин, ацетоном в ультразвуковой бане в течение 1 ч и деионизированной водой при 95°C в течение 6 ч. Капли воды с поверхности подложки удаляли обдувкой струей воздуха, сушили в вакуум-эксихаторе над P_2O_5 в течение 16 ч. Хранили в эксихаторе над свежим P_2O_5 (рис. 1а).

Активация ячеек биочипа. Карбоксильные группы в ячейках биочипа активировали получением *N*-гидроксисукцинимидных эфиров. На биочипе с ячейками из щеточных полимеров формировали разборную камеру объемом 35 мкл, площадь подложки в камере составляла 50 мм^2 . В камеру вносили 35 мкл свежеприготовленного активирующего раствора. Реакцию проводили при 37°C в течение 5 ч. После окончания реакции камеру разбирали, подложки промывали DMSO, затем дихлорметаном или MES-буфером (в зависимости от растворителя, используемого при активации). Подложки сушили обдувкой струей воздуха при комнатной температуре. Хранили в закрытой коробке при 5°C до использования.

Ковалентная иммобилизация флуоресцентного красителя в ячейках биочипа. На биочипе с ячейками из щеточных полимеров с активированными карбоксильными группами формировали разборную камеру объемом 35 мкл, площадь подложки в камере составляла 50 мм^2 . В камеру вносили 35 мкл раствора красителя Cy5- NH_2 с концентрацией 1 мМ, диизопропилэтиламина (DIPEA) с концентрацией 60 мМ в DMSO, инкубировали при комнатной температуре в течение 16 ч. После окончания реакции раствор удаляли, камеру разбирали, подложки промывали струей деионизированной воды.

Для удаления красителя, не связавшегося с карбоксильными группами, подложки тщательно отмывали. Для этого пленку помещали в закрытую пробирку из полипропилена с 40 мл 50%-ного раствором ацетонитрила в 50 мМ триэтиламонийгидрокарбонате (pH 8.5), выдерживали на ультразвуковой бане 20 мин. Процедуру повторяли 3 раза со сменой растворителя. Затем промывали струей деионизированной воды, после чего сушили при комнатной температуре в течение 1 ч на открытом воздухе (рис. 3).

Получение конъюгатов белков со стрептавидином и красителями. Конъюгат Sav-Cy3 синтезировали реакцией стрептавида (Sav) с красителем Cy3-pNP. Конъюгат HumanIgG-Bio-Cy3 получали одновременной реакцией иммуноглобулинов человека (Human IgG) с *N*-гидроксисукцинимидным эфиром биотина (Bio-Su) и красителем Cy3-pNP. Для синтеза конъюгатов антител козы Goat anti-Human IgG-Cy5 и Goat anti-Human IgG-Bio-Cy5 использовали реакции антител козы Goat anti-Human IgG с красителем Cy5-pNP или одновременно со смесью Bio-Su и красителем Cy5-pNP. Синтез конъюгатов выполняли по ранее разработанной методике [15].

К раствору белка с концентрацией 10^{-4} М в 0.1 М карбонатном буфере при pH 8.5 и охлаждении на льду добавляли краситель Cy3-pNP, или краситель Cy5-pNP, или смесь красителя Cy3-pNP и биотин-ПЭГ4-NHS-эфира, или смесь красителя Cy5-pNP и биотин-ПЭГ4-NHS-эфира в молярном соотношении 100 : 1 каждого маркера к маркируемому белку. Маркеры к раствору белка добавляли в виде раствора в DMSO с концентрацией 100 мкг/мкл. Реакционную смесь инкубировали при 4°C в течение 2 ч. Конъюгаты очищали методом гель-фильтрации на колонке с Sephadex G-25 superfine, элюировали PBS-буфером (0.15 М NaCl, 10 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7.2).

Ковалентная иммобилизация стрептавида в ячейках биочипа. Растворы стрептавида (Sav) и конъюгата стрептавида с красителем Cy3 (Sav-Cy3) с концентрацией 1.7 мкг/мкл в 0.1 М карбонатном буфере (pH 9.0), содержащем 30% глицерина, наносили роботом-манипулятором иглой диаметром 200 мкм в ячейки с активированными карбоксильными группами. Затем подложки инкубировали в герметичной камере с повышенной влажностью в течение 16 ч при 5°C и дополнительно 4 ч при 25°C . Влажность в камере поддерживали смесью вода/глицерин в соотношении 1 : 7. После инкубации подложки выдерживали в 0.1 М растворе этанол-

амин в течение 1 ч при комнатной температуре для блокирования остаточных активных карбоксильных групп. Затем отмывали на шейкере в фосфатно-солевом буфере с 1%-ным Tween 20 (PBST), pH 7.4, при комнатной температуре в течение 40 мин. Подложки сушили обдувкой струей воздуха при комнатной температуре. Хранили в закрытой коробке при 5°C до использования.

Нековалентная иммобилизация биотинилированных козьих антител (Goat anti-Human IgG-Bio-Cy5) в ячейках биочипа. На подложке с ячейками из щеточных полимеров с иммобилизованным стрептавидином (Sav) и конъюгатом стрептавидина с красителем Cy3 (Sav-Cy3) формировали разборную камеру объемом 35 мкл, площадь подложки в камере – 50 мм². В камеру вносили 35 мкл раствора, содержащего 0.01 мкг/мкл конъюгата козьих антител с биотином и красителем Cy5 (Goat anti-Human IgG-Bio-Cy5) в PBS-буфере, pH 7.4, и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч.

Затем биочипы отмывали на шейкере в фосфатно-солевом буфере с 1%-ным Tween 20 (PBST), pH 7.4, при комнатной температуре в течение 40 мин. Биочипы сушили обдувкой струей воздуха при комнатной температуре. Хранили в закрытой коробке при 5°C до использования.

Нековалентная иммобилизация биотинилированных иммуноглобулинов человека в ячейках биочипа. На первом этапе растворы стрептавидина (Sav) с концентрацией 1.7 мкг/мкл в 0.1 М карбонатном буфере (pH 9.0), содержащем 30% глицерина, наносили роботом-манипулятором иглой диаметром 200 мкм в ячейки биочипа с активированными карбоксильными группами по заданной раскладке. Затем подложки инкубировали в герметичной камере с повышенной влажностью в течение 16 ч при 5°C и дополнительно 4 ч при 25°C. Влажность в камере поддерживали смесью вода/глицерин в соотношении 1 : 7. Биочипы отмывали на шейкере в фосфатно-солевом буфере с 1% Tween 20 (PBST) при комнатной температуре (pH 7.4) в течение 40 мин, затем сушили обдувкой струей воздуха при комнатной температуре.

На втором этапе на подложке с ячейками из щеточных полимеров с иммобилизованным стрептавидином (Sav) формировали разборную камеру объемом 35 мкл, площадь подложки в камере – 50 мм². В камеру вносили 35 мкл раствора, содержащего 0.01 мкг/мкл конъюгата иммуноглобулинов человека с биотином и красителем Cy3 (Human IgG-Bio-Cy3) в PBS-буфере (pH 7.4), инкубировали при комнатной

температуре в течение 2 ч. Раствор из камеры удаляли, камеру разбирали. Биочипы промывали на шейкере в фосфатно-солевом буфере с 1% Tween 20 (PBST), pH 7.4, при комнатной температуре в течение 40 мин, затем сушили обдувкой струей воздуха при комнатной температуре.

Проявление козьими антителами иммуноглобулинов человека, иммобилизованных в ячейках биочипа. На подложке с ячейками из щеточных полимеров с иммуноглобулинами человека (Human IgG-Bio-Cy3), нековалентно иммобилизованными через стрептавидин (Sav), формировали разборную камеру объемом 35 мкл, площадь подложки в камере – 50 мм². В камеру вносили 35 мкл раствора, содержащего 0.005 мкг/мкл конъюгата козьих антител с красителем Cy5 (Goat anti-Human IgG-Cy5) в PBS-буфере (pH 7.4), инкубировали при комнатной температуре в течение 16 ч. Раствор из камеры удаляли, камеру разбирали. Биочипы промывали на шейкере в фосфатно-солевом буфере с 1% Tween 20 (PBST), pH 7.4, при комнатной температуре в течение 40 мин, затем сушили обдувкой струей воздуха при комнатной температуре.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе изучали способы получения на поверхности полиэтилентерефталатных (ПЭТ) подложек матрицы ячеек из щеточных полимеров с многочисленными реактивными группами с последующей иммобилизации белков для использования в иммунофлуоресцентном анализе. Поверхность ПЭТ-подложек предварительно покрывали тонким слоем поливинилацетата с добавкой бензофенона, которые не растворимы в воде. Поверхность подложки покрывали водным раствором смеси акрилатных мономеров, акриламида и акриловой кислоты. При УФ-облучении через фотомаску в зоне облучения происходит фотоиндуцированная сополимеризация мономеров. После отмывки на поверхности подложки в зоне УФ-облучения остаются ячейки из полимеров, связанных одним концом с поверхностью подложки, щеточных полимеров. Ячейки прочно держатся на поверхности ПЭТ-подложки, содержат многочисленные реактивные карбоксильные группы, пригодные для ковалентной иммобилизации белковых и иных молекулярных мишеней.

Изучали методы активации ячеек из щеточных полимеров и ковалентной иммобилизации в ячейках белка стрептавидина. Разработан метод, сохраняющий функциональность стрептавидина и

его пространственную доступность для связывания с биотинилированным иммуноглобулином и последующим проявлением антителами. флуоресцентно меченными красителем Cy5.

Биочипы с ячейками их щеточных полимеров на подложке из пленочного полиэтилентерефталата представляются перспективными для дальнейшего совершенствования с целью использования в иммунофлуоресцентном анализе белковых мишеней для развития технологий микроанализа “лаборатория на чипе”.

В настоящее время не решен вопрос с равномерностью иммобилизации крупных белковых молекул в ячейках биочипа. Возможное решение проблемы может заключаться в изменении состава мономеров, используемых для получения щеточных полимеров, регулировании плотности и равномерности распределения полимерных цепей в ячейках биочипа.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-14-00287).

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. Yershov G., Barsky V., Belgovskiy A., Kirillov E., Kreindlin E., Ivanov I., Parinov S., Guschin D., Drobitshev A., Dubiley S., Mirzabekov A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. P. 4913–4918. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.10.4913>
2. Brittain W.J., Brandstetter T., Prucker O., Rühle J. // *ACS Appl. Mat. Int.* 2019. V. 11. P. 39397–39409. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b06838>
3. Sangermano M., Razza N. // *Express Polym. Lett.* 2019. V. 13. P. 135–145. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2019.13>
4. Mueller M., Bandl C., Kern W. // *Polymers*. 2022. V. 14. P. 608. <https://doi.org/10.3390/polym14030608>
5. Ma J., Luan S., Song L., Jin J., Yuan S., Yan S., Yang H., Shi H., Yin J. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2014. V. 6. P. 1971–1978. <https://doi.org/10.1021/am405017h>
6. Miftakhov R.A., Ikonnikova A.Yu., Vasiliskov V.A., Lapa S.A., Levashova A.I., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Zasedatelev A.S., Nasedkina T. V., Chudinov A.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2023. V. 49. P. 1143–1150. <https://doi.org/10.1134/S1068162023050217>
7. Sim Y.J., Seo E.K., Choi G.J., Yoon S.J., Jang J. // *J. Korean Soc. Dyers Finishers*. 2009. V. 21. P. 33–38. <https://doi.org/10.5764/TCF.2009.21.4.033>
8. Qu B.J., Xu Y.H., Ding L.H., Ranby B. // *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* 2000. V. 38. P. 999–1005. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0518\(20000315\)38:6<999::AID-POLA9>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0518(20000315)38:6<999::AID-POLA9>3.0.CO;2-1)
9. Miftakhov R.A., Lapa S.A., Shershov V.E., Zasedateleva O.A., Guseinov T.O., Spitsyn M.A., Kuznetsova V.E., Mamaev D.D., Lysov Yu.P., Barsky V.E., Timofeev E.N., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // *Biophysics*. 2018. V. 63. P. 512–518. <https://doi.org/10.1134/S0006350918040127>
10. Shlylev G.F., Shishkin I.Yu., Lapa S.A., Shershov V.E., Barsky V.E., Polyakov S.A., Vasiliskov V.A., Zasedateleva O.A., Kuznetsova A. V., Chudinov A.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2024. V. 50. P. 2050–2057. <https://doi.org/10.1134/S106816202405039X>
11. Miftakhov R.A., Lapa S.A., Kuznetsova V.E., Zolotov A.M., Vasiliskov V.A., Shershov V.E., Surzhikov S.A., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2021. V. 47. P. 1345–1347. <https://doi.org/10.1134/S1068162021060182>
12. Zolotov A.M., Miftakhov R.A., Ikonnikova A.Y., Lapa S.A., Kuznetsova V.E., Vasiliskov V.A., Shershov V.E., Zasedatelev A.S., Nasedkina T.V., Chudinov A.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2022. V. 48. P. 858–863. <https://doi.org/10.1134/S1068162022040203>
13. Spitsyn M.A., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Emelyanova M.A., Guseinov T.O., Lapa S.A., Nasedkina T.V., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // *Dyes Pigments*. 2017. V. 147. P. 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.07.052>
14. Lysov Y., Barsky V., Urasov D., Urasov R., Cherepanov A., Mamaev D., Yegorov Y., Chudinov A., Surzhikov S., Rubina A., Smoldovskaya O., Zasedatelev A. // *Biomed. Optics Express*. 2017. V. 8. P. 4798–4810. <https://doi.org/10.1364/BOE.8.004798>
15. Zasedateleva O.A., Mikheikin A.L., Turygin A.Y., Prokopenko D.V., Chudinov A.V., Belobritskaya E.E., Chechetkin V.R., Zasedatelev A.S. // *Nucleic Acids Res.* 2008. V. 36. P. e61. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn246>

Immobilization of Protein Probes on Biochips with Brush Polymer Cells

**G. F. Shtylev*, I. Yu. Shishkin*, V. E. Shershov*, V. E. Kuznetsova*, D. A. Kachulyak*,
V. I. Butvilovskaya*, A. I. Levashova*, V. A. Vasiliskov*,
O. A. Zasedateleva*, and A. V. Chudinov*,#**

Phone: + 7 (499) 135-98-00; e-mail: chud@eimb.ru

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

The methods of obtaining a polymer coating from polyvinyl acetate on the surface of polyethylene terephthalate polymer substrates and subsequent production by photoinduced radical copolymerization of acrylate monomers of brush polymers have been studied. Cell matrices with numerous reactive chemical groups were formed by photolithography for subsequent immobilization of proteins. Methods of activation of carboxyl groups on brush polymers attached to the surface of polyethylene terephthalate have been tested. Immobilization of the streptavidin model protein labeled with fluorescent dye Cy3 was performed to test the activation method of carboxyl groups. A variant of immunofluorescence analysis in the format of a biological microchip was tested on the streptavidin – biotinylated immunoglobulin model. Streptavidin, immobilized in brush polymer cells, retains functionality and spatial accessibility for binding to biotinylated immunoglobulin and subsequent manifestation by antibodies fluorescently labeled with Cy5 dye, which opens up prospects for the use of biological microchips with brush polymer cells on polyethylene terephthalate substrates for immunofluorescence analysis of various protein targets.

Keywords: microarray, brush polymers, protein conjugation, protein immobilization, fluorescent immunoassay



УДК 577.29

ВЫЯВЛЕНИЕ МУТАЦИЙ ГЕНОВ *IDH1/2* В ОБРАЗЦАХ ОПУХОЛИ С НИЗКОЙ ПРЕДСТАВЛЕННОСТЬЮ МУТАНТНОГО АЛЛЕЛЯ

© 2024 г. В. О. Варачев*, Д. А. Гуськов*, О. Ю. Сусова**, А. П. Шехтман***,
Д. В. Рогожин***, С. А. Суржиков*, А. В. Чудинов*,
А. С. Заседателев*, Т. В. Наседкина*,#

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

** ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина” Минздрава России,
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 23

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

Поступила в редакцию 12.11.2023 г.

После доработки 19.11.2023 г.

Принята к публикации 20.11.2023 г.

Определение драйверных мутаций в опухоли – крайне важная задача в онкологии для выбора стратегии лечения и оценки эффективности терапии. Во многих случаях, особенно при мониторинге заболевания, возникает необходимость выявления малого количества копий мутантного аллеля на фоне избыточного содержания ДНК дикого типа. В данной работе исследованы возможности высокочувствительной детекции мутаций в генах *IDH1* и *IDH2* при подавлении амплификации ДНК дикого типа с помощью олигомеров “замкнутых” нуклеиновых кислот (locked nucleic acid, LNA) с последующей гибридизацией флуоресцентно меченого продукта полимеразной цепной реакции на биологическом микрочипе (биочипе). Предел обнаружения мутантной ДНК составляет 0.1% на фоне ДНК дикого типа. Эффективность данного подхода продемонстрирована на примере анализа 26 образцов хондроидных опухолей и глиальных опухолей мозга с низкой представленностью мутантного аллеля, в трех случаях были выявлены ранее не обнаруженные мутации R132C, R132L и R132H.

Ключевые слова: соматические мутации, изоцитратдегидрогеназа 1 и 2, хондроидные опухоли, глиома, предел обнаружения, ингибирование амплификации, LNA-нуклеотиды, биологический микрочип

DOI: 10.31857/S0132342324050117, EDN: LQRGLT

ВВЕДЕНИЕ

Выявление мутаций в генах, вовлеченных в развитие злокачественных новообразований, становится важнейшим инструментом для выбора схем лечения в онкологии [1]. Поскольку мутация обычно возникает в отдельных клетках среди большой популяции нормальных клеток, часто возникает проблема обнаружения мутантного аллеля на фоне большого числа копий дикого типа [2]. Стандартные методы диагностики мутаций используют ПЦР-амплификацию фрагментов

целевых генов с последующей регистрацией мутантной последовательности различными методами, включая секвенирование по Сэнгеру [3], пиросеквенирование [4], секвенирование нового поколения (NGS) [5], метод масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) [6], высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) [7], анализ кривых плавления с TaqMan-зондом [8]. При использовании этих методов доля детектируемой мутантной последовательности по отношению к

Сокращения: BNA – мостиковая нуклеиновая кислота (bridge nucleic acid); IDA – изоцитратдегидрогеназа; LNA – замкнутая нуклеиновая кислота.

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

последовательности дикого типа обычно имеет нижний предел от 5 до 15–20%.

Для преодоления этого ограничения разрабатываются различные способы обогащения ПЦР-продукта мутантными аллелями. Распространенная стратегия обогащения – аллель-специфичная ПЦР [2], альтернативный подход заключается в подавлении амплификации ДНК дикого типа за счет образования двухцепочечной структуры аллелей дикого типа (но не мутантного аллеля) при ПЦР. В методе “холодной” ПЦР (cold-PCR) в качестве блокирующей комплементарной цепи дикого типа используют целые участки ампликона, что позволяет достичь обогащения мутантной последовательностью в 5–100 раз [9]. В последние годы широкое применение находят короткие комплементарные последовательности, представленные аналогами нуклеиновой кислоты, которые образуют более стабильные пары оснований по сравнению с природной ДНК: пептидно-нуклеиновая кислота (peptide, nucleic acid PNA), замкнутая нуклеиновая кислота (locked nucleic acid, LNA) или мостиковая нуклеиновая кислота (bridge nucleic acid, BNA) [10, 11]. LNA и BNA состоят из нуклеотидов, в которых рибоза модифицирована дополнительным мостиком между 2'-атомом кислорода и 4'-атомом углерода, в состав мостика могут входить как метиленовые, так и неметиленовые группы (например, аминокислоты) [11, 12]. Нуклеотиды LNA/BNA способны образовывать более стабильные структуры по сравнению с нативной ДНК и, таким образом, повышать температуру плавления дуплексов при гибридизации, при этом число копий мутантного аллеля, полученных в результате ПЦР, возрастает в 100–1000 раз [11–13]. Олигонуклеотиды LNA/BNA широко используются для блокирования амплификации определенных последовательностей, т.к. они совместимы с различными платформами секвенирования [14], способами амплификации (включая изотермическую и асимметричную ПЦР [13, 15]), а также с технологией биологических микрочипов [16].

Драйверные мутации в генах изоцитратдегидрогеназ *IDH1/2* – важные биомаркеры для целого ряда злокачественных новообразований, прежде всего опухолей головного мозга и хондральных опухолей [17, 18], кроме того, они могут служить молекулярными мишенями для таргетной терапии. Активно разрабатываются таргетные препараты – ингибиторы мутантных форм IDH: например, для лечения пациентов с холангиокарциномой и наличием мутации

IDH1 был одобрен препарат ивосидениб [18, 19]. Применение высокочувствительных методов детекции мутаций *IDH1/2* особенно актуально для оценки эффективности терапии и ранней диагностики рецидива. Ранее нами был разработан биочип для определения мутаций *IDH1/2* [20], однако чувствительность метода не превышала 10–15%, что не позволяло выявлять мутации в образцах с малым количеством опухолевых клеток.

В настоящем исследовании мы применили LNA-опосредованное блокирование амплификации ДНК дикого типа для разработки высокочувствительного способа детекции мутаций в генах *IDH1* и *IDH2* с использованием биочипов. Оптимизированы условия подавления амплификации аллелей дикого типа генов *IDH1* и *IDH2* с помощью LNA-олигомеров, определена аналитическая чувствительность метода гибридизационного анализа на биочипе в сочетании с LNA-блокирующей амплификацией, продемонстрирована эффективность детекции мутаций *IDH1/2* с помощью данного подхода при анализе образцов опухоли с низкой представленностью мутантного аллеля.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовали образцы ДНК, выделенные из тканей глиальных (глиома, глиобластома) и хондральных опухолей, заключенных в парафиновые блоки. Для блокирования амплификации аллелей дикого типа R132 (ген *IDH1*) и R172 (ген *IDH2*) в образцах опухоли в реакционную смесь ПЦР добавляли LNA-олигомеры. Были синтезированы LNA-олигомеры с различной температурой плавления (T_m) от 73.0 до 83.9°C, а также комплементарные (+)- и (–)-цепям ДНК генов *IDH1* и *IDH2* (табл. 1). Для оптимизации условий блокирующей ПЦР в присутствии LNA-олигомеров использовали метод ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) и метод кривых плавления ДНК с TaqMan-зондом. По результатам экспериментов были выбраны олигомеры длиной 13 нт с $T_m = 79^\circ\text{C}$ для мутации R132 *IDH1* (LNA11) и с $T_m = 80^\circ\text{C}$ для R172 *IDH2* (LNA21), в обоих случаях соответствующие (–)-цепи ДНК дикого типа. При проведении ПЦР-РВ видно, что с возрастанием концентрации LNA-олигомера в реакции значение порогового цикла заметно увеличивается для аллеля дикого типа гена *IDH1* и практически не изменяется для мутантного аллеля (рис. 1). Аналогичные результаты были получены для мутации в гене *IDH2*.

Таблица 1. Последовательности LNA-олигомеров для блокирования амплификации аллелей дикого типа генов *IDH1* и *IDH2*

Ген	Название олигомера	Последовательность (5'–3')	Длина, нт	T _m , °C	Ориентация
<i>IDH1</i>	LNA11	GCA⁺T⁺G⁺A⁺C⁺G⁺A⁺C⁺C⁺TA-p	13	79.2	(–)-цепь
	LNA12	GCAT ⁺ G ⁺ A ⁺ C ⁺ G ⁺ A ⁺ C ⁺ CTA-p	13	73.0	(–)-цепь
	LNA13	TA ⁺ G ⁺ G ⁺ TC ⁺ G ⁺ T ⁺ C ⁺ A ⁺ T ⁺ GC-p	13	79.4	(+)-цепь
<i>IDH2</i>	LNA21	G⁺CGT⁺G⁺C⁺C⁺T⁺G⁺CCAA-p	13	80.0	(–)-цепь
	LNA22	GC ⁺ G ⁺ T ⁺ G ⁺ C ⁺ C ⁺ T ⁺ G ⁺ C ⁺ CAA-p	13	83.9	(–)-цепь
	LNA23	GCGT ⁺ G ⁺ C ⁺ C ⁺ T ⁺ G ⁺ CCAA-p	13	77.1	(–)-цепь

Примечание: LNA-нуклеотиды отмечены надстрочным знаком “плюс” перед обозначением буквы основания. Полу жирным шрифтом выделены LNA-олигомеры, отобранные для дальнейшей работы. Зонды содержали на 3'-конце фосфатную группу.

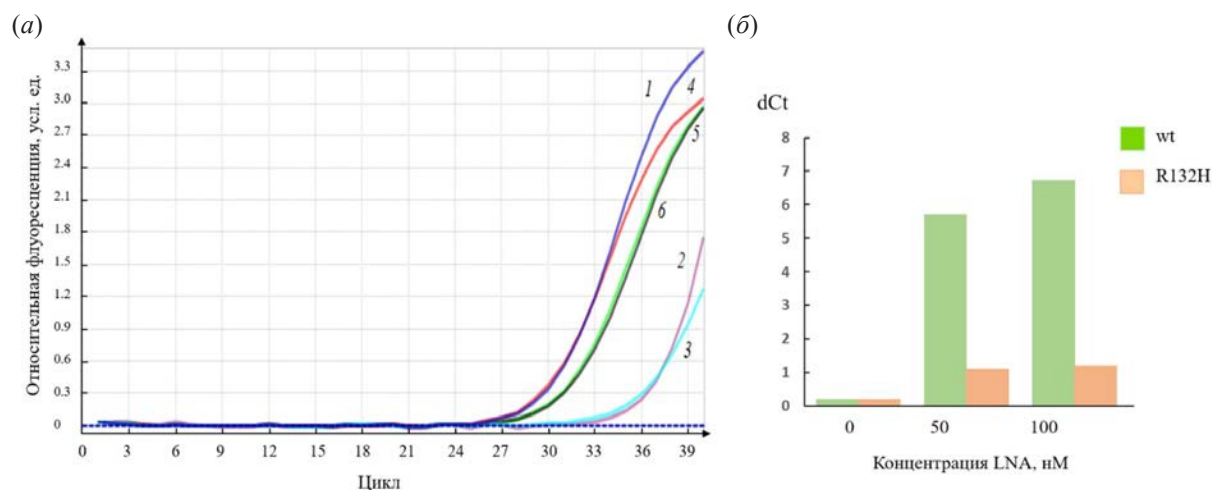


Рис. 1. Подавление амплификации аллеля дикого типа R132 *IDH1* в образце, содержащем ~50% мутантного аллеля R132H, при различных концентрациях LNA-олигомера. (а) – Кривые амплификации аллеля дикого типа R132 и мутантного аллеля R132H: аллель дикого типа (wt) – кривые 1 (0 нМ), 2 (50 нМ) и 3 (100 нМ); мутантный аллель (R132H) – кривые 4 (0 нМ), 5 (50 нМ) и 6 (100 нМ); (б) – разница в значениях порогового цикла кривых амплификации аллеля дикого типа (wt) и мутантного аллеля (R132H) при различной концентрации LNA по сравнению с нулевой концентрацией.

Подавление амплификации аллеля дикого типа может существенно повысить чувствительность метода в определении мутаций при анализе кривых плавления с TaqMan-зондом. При достаточно сильном подавлении амплификации ДНК дикого типа образуется ПЦР-продукт, представленный преимущественно мутантным аллелем (рис. 2).

При анализе мутаций *IDH1/2* с помощью биологического микрочипа подавление амплификации аллеля дикого типа использовали на первом этапе гнездовой ПЦР (см. “Эксперим. часть”). Для определения предела чувствительности метода проводили анализ образцов с различным процентным содержанием мутантного аллеля на фоне аллеля дикого типа (10, 5, 1, 0.5 и 0.1%). При сочетании LNA-блокирующей ПЦР с гибридационным анализом на биочипе метод позво-

ляет обнаружить не менее 0.1% мутантной ДНК на фоне ДНК дикого типа, эффективность выявления мутации также зависит от эффективности подавления ДНК дикого типа и коррелирует с концентрацией LNA-олигомера (рис. 3).

Для проверки способности метода выявлять мутации *IDH1/2* в образцах опухоли с низкой представленностью мутантного аллеля была сформирована коллекция образцов ДНК, выделенных из ткани хондросаркомы и имеющих *IDH1*-мутантный статус по данным иммуногистохимического анализа (ИГХ). Методом гибридационного анализа на биочипе без подавления амплификации ДНК дикого типа гена *IDH1* было проанализировано 14 образцов хондросаркомы. В двух случаях метод биологических микрочипов не подтвердил наличие выявленной методом ИГХ

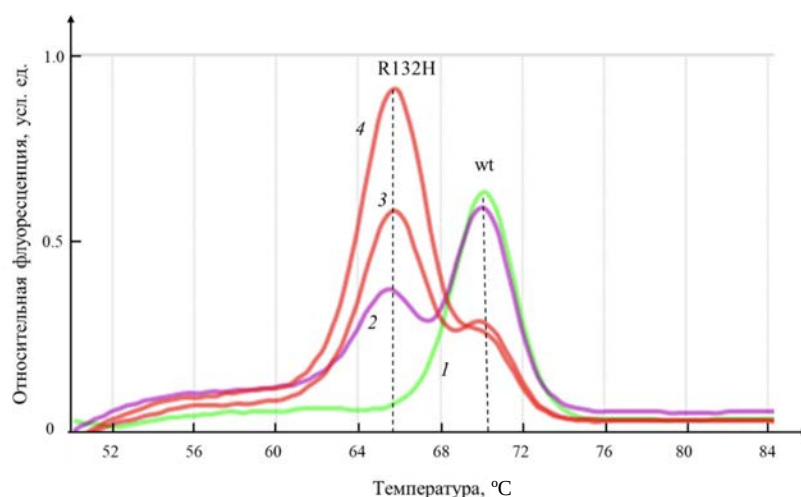


Рис. 2. Анализ кривых плавления с TaqMan-зондом при подавлении амплификации аллеля дикого типа R132 *IDH1* (wt) в образце, содержащем 15–20% мутантного аллеля (R132H) при различных концентрациях LNA-олигомера: 1 – образец дикого типа (0 нМ); образцы с мутацией R132H – кривые 2 (0 нМ), 3 (50 нМ) и 4 (100 нМ). Заметно увеличение пика R132H при возрастании концентрации LNA-олигомера.

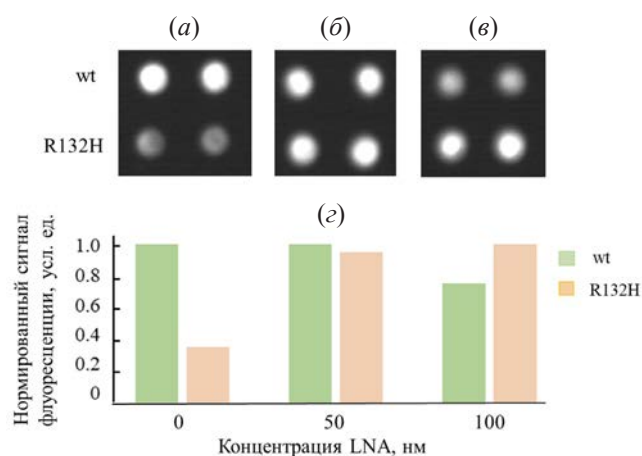


Рис. 3. Детекция мутации R132H *IDH1* в образце, содержащем 0.5% мутантного аллеля, при различных концентрациях LNA-олигомера. Картины гибридизации: (а) – 0 нМ LNA, (б) – 50 нМ LNA, (в) – 100 нМ LNA; (z) – нормированные значения флуоресцентных сигналов.

мутации в кодоне R132 гена *IDH1*. Использование LNA-блокирующего этапа ПЦР при получении флуоресцентной ДНК-мишени для гибридизации на биочипе позволило идентифицировать в этих образцах мутации R132C и R132L (рис. 4).

Также метод LNA-блокирующей ПЦР и гибридизации на биочипе апробировали при анализе 12 образцов глиом. В одном образце была выявлена мутация *IDH1* R132H, что соответствовало клиническим характеристикам данного случая: IDH-мутантный подтип глиомы 4-й степени злокачественности, рецидив опухоли (пример определения мутации R132H представлен на рис. 3). Результат был подтвержден секвенированием по Сэнгеру. Мутаций в гене *IDH2* выявлено не было.

Подавление амплификации аллеля дикого типа с использованием LNA-олигонуклеотидов – эффективный методический подход, используемый при выявлении соматических мутаций в опухоли [13, 16, 21, 22]. При дизайне LNA-олигомеров для блокирования амплификации целевых последовательностей дикого типа критическим параметром является температура плавления, которая должна превышать температуру отжига и элонгации праймеров на определенное число градусов. В нашей работе мы использовали программное обеспечение компании IDT (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) для расчета температур плавления LNA-олигомеров. Оптимальными значениями было превышение T_m LNA-олигомера на 16–20 °C температуры отжига и на 8–10 °C

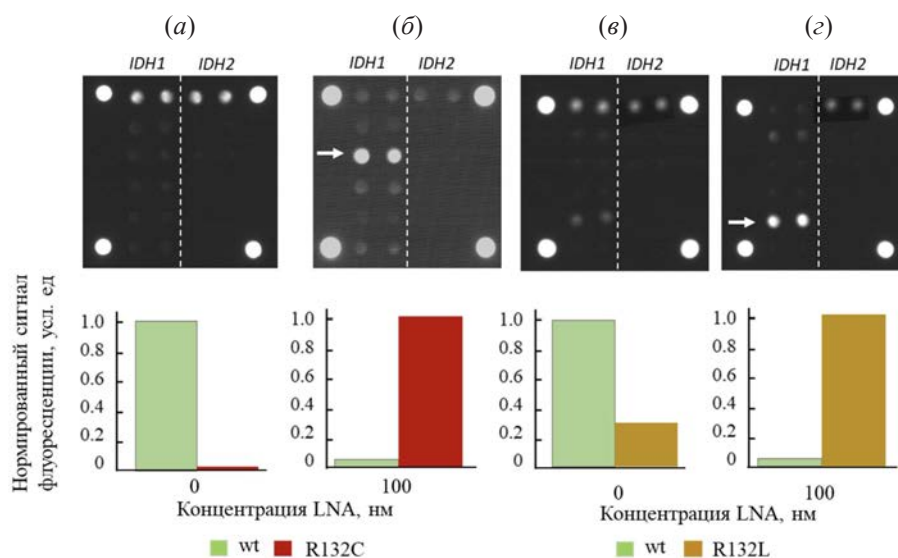


Рис. 4. Детекция мутаций в гене *IDH1* в образцах опухоли (хондросаркома) с низким содержанием мутантного аллеля. В верхней части рисунка представлены гибридизационные картины на биочипе, в нижней части – нормированные значения сигналов флуоресценции. Образец с мутацией R132C: (а) – 0 нМ LNA-олигомера в реакции ПЦР, (б) – при добавлении 100 нМ LNA-олигомера. Образец с мутацией R132L: (в) – 0 нМ LNA-олигомера в реакции ПЦР, (г) – при добавлении 100 нМ LNA-олигомера. По углам биочипа расположены ячейки с флуоресцентным красителем Cy5, выполняющие роль маркера.

температуры элонгации праймеров в реакции амплификации.

Детекция результатов амплификации с помощью биочипа – достаточно простой, надежный и специфичный метод определения мутаций, который ранее был успешно применен при анализе соматических мутаций в генах *EGFR*, *BRAF*, *KRAS* и *NRAS* [16, 23]. В настоящей работе мы продемонстрировали эффективность этого подхода для детекции мутаций в генах *IDH1* и *IDH2*. Одна из проблем при определении мутаций с помощью биочипов – открытая система проведения эксперимента, как следствие, высокочувствительный формат анализа становится уязвимым с точки зрения потенциальной контаминации посторонней ДНК. Этого недостатка лишен метод кривых плавления с TaqMan-зондом, который представляет собой закрытую систему, при этом чувствительность метода также может быть существенно повышена за счет добавления в реакционную смесь LNA-олигомеров. Слабое звено этого подхода – необходимость секвенировать амплифицированную последовательность ДНК для идентификации мутации. С этой точки зрения перспективным направлением является разработка закрытых систем “лаборатория-на-чипе”, в которых сочетается мультиплексность и информативность анализа с использованием биочипов и закрытое реакционное пространство методов ПЦР в реальном времени [24].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы. В исследование было включено 26 клинических образцов, из них 14 образцов хондросаркомы основания черепа и 12 образцов опухолей головного мозга (глиома, глиобластома). Образцы хондросаркомы были предоставлены патологоанатомическим отделением РДКБ ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова, образцы опухолей мозга получены из отделения нейрохирургии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Материал опухоли фиксировали 4%-ным раствором формальдегида и заключали в парафиновые блоки по стандартной методике приготовления гистологических препаратов.

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

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). ПЦР-РВ проводили в двух модификациях: анализ кривых амплификации с использованием интеркалирующего красителя EvaGreen (Евроген, Россия) и анализ кривых плавления с использованием TaqMan-зонда. Определение мутаций в генах *IDH1* и *IDH2* проводили в различных пробирках. Последовательности праймеров и TaqMan-зондов приведены ранее [20]. Для проведения реакции использовали смесь для ПЦР 5× qPCRmix-HS

(Евроген, Россия). В реакцию добавляли LNA-олигомеры (ДНК-Синтез, Россия) в концентрации 20–200 нМ (последовательности представлены в табл. 1) и образец ДНК в количестве 5–10 нг. Реакцию проводили в амплификаторе LightCycler 96 (Roche, Швейцария) для пар праймеров *IDH1* и *IDH2*: 95°C – 5 мин; (95°C – 13 с, 60°C – 40 с, 72°C – 20 с) × 53 цикла. При использовании TaqMan-зондов проводили амплификацию и плавление продуктов ПЦР: 95°C – 1 мин, 55°C – 4 мин, далее от 55 до 90°C повышение температуры на 0.2°C при каждом шаге с продолжительностью шага 12 с. Секвенирование по Сэнгеру проводили на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США).

Гибридизационный анализ с использованием биочипа. Для наработки одноцепочечного флуоресцентно-меченого фрагмента ДНК для гибридизации на биочипе использовали метод гнездовой ПЦР в два этапа, как описано ранее [20, 23]. На первом этапе добавляли в реакционную смесь LNA-олигомеры в концентрации 20–200 нМ. В ходе первого этапа происходило подавление амплификации последовательностей дикого типа, преимущественно нарабатывался двухцепочечный продукт мутантной ДНК (при наличии мутации). На втором этапе использовали в качестве матрицы продукт первого этапа и проводили асимметричную ПЦР с одновременным включением в ПЦР-продукт флуоресцентной метки в виде Cy5-dUTP. Реакцию гнездовой ПЦР для генов *IDH1* и *IDH2* проводили в разных пробирках, далее флуоресцентно-меченые продукты второго этапа ПЦР добавляли в гибридизационную смесь и наносили на биочип, гибридизацию проводили, как описано ранее [16, 23]. Биочипы изготавливали методом фотоиндуцируемой совместной полимеризации олигонуклеотидов и компонентов акриламидного геля, как описано ранее [16, 23]. Флуоресцентные сигналы регистрировали с помощью анализатора биочипов, анализ изображения проводили с помощью программы ImaGeWare (ООО “БИОЧИП-ИМБ”, Россия). Наличие мутации устанавливали, если при обработке флуоресцентных сигналов ячеек биочипа получали, что $J(\text{mut}) > J(\text{wt})$ и $J(\text{mut})/B_m \geq 2$, где $J(\text{mut})$ и $J(\text{wt})$ – нормированные на фон сигналы ячеек биочипа, B_m – сигнал фона [16]. Последовательности зондов и их расположение на биочипе приведены ранее [20]. Для определения чувствительности метода смешивали образец с мутацией гена *IDH1*, в котором доля мутантного аллеля была определена методом ПЦР-РВ или методом NGS, с образцом ДНК, не содержащем мутацию, в различных соотношениях.

Была получена серия разведений с долей *IDH1*-мутантной ДНК в образце 10, 5, 1, 0.5 и 0.1%. Далее проводили ПЦР в присутствии LNA-олигомера, полученный продукт гибридизовали на биочипе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан высокочувствительный формат метода определения соматических мутаций в генах *IDH1/2* с использованием LNA-опосредованного блокирования амплификации аллелей дикого типа и гибридизации на биологическом микрочипе. Предел обнаружения мутантной ДНК в образцах опухолевой ткани составил 0.1% на фоне ДНК дикого типа. Метод апробирован на коллекции 26 образцов парафинизированной опухолевой ткани (глиома, глиобластома, хондросаркома), в трех случаях на примере гена *IDH1* показана эффективность выявления мутаций R132C, R132L и R132H в образцах опухоли с низкой представленностью мутантного аллеля.

Дальнейшее развитие метода может быть связано с разработкой закрытой системы типа “лаборатория-на-чипе”, что позволит повысить специфичность и надежность проводимого анализа.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

Исследование одобрено локальным этическим комитетом НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России (протокол № 7 от 27 июля 2023 г.). От пациентов получено письменное добровольное информированное согласие на использование результатов исследования в обезличенной форме в научных целях.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Angulo B., Lopez-Rios F., Gonzalez D. // Exp. Rev. Mol. Diagn. 2014. V. 14. P. 517–524. <https://doi.org/10.1586/14737159.2014.910120>
2. Matsuda K. // Adv. Clin. Chem. 2017. V. 80. P. 45–72. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2016.11.002>

3. Wilkening S., Hemminki K., Thirumaran R.K., Bermejo J.L., Bonn S., Försti A., Kumar R. // *Biotechniques*. 2005. V. 39. P. 853–858.
<https://doi.org/10.2144/000112027>
4. Ogino S., Kawasaki T., Brahmandam M., Yan L., Cantor M., Namgyal C., Mino-Kenudson M., Lauwers G.Y., Loda M., Fuchs C.S. // *J. Mol. Diagn.* 2005. V. 7. P. 413–421.
[https://doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60571-5](https://doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60571-5)
5. Reckamp K.L., Melnikova V.O., Karlovich C., Sequist L.V., Camidge D.R., Wakelee H., Perol M., Oxnard G.R., Kosco K., Croucher P., Samuels E., Vibat C.R., Guerrero S., Geis J., Berz D., Mann E., Matheeny S., Rolfe L., Raponi M., Erlander M.G., Gadgeel S.J. // *Thorac. Oncol.* 2016. V. 11. P. 1690–1700.
[https://doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60571-5](https://doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60571-5)
6. Thomas R.K., Baker A.C., Debiassi R.M., Winckler W., Laframboise T., Lin W.M., Wang M., Feng W., Zander T., MacConaill L., Lee J.C., Nicoletti R., Hatton C., Goyette M., Girard L., Majmudar K., Ziaugra L., Wong K.K., Gabriel S., Beroukhi R., Peyton M., Barretina J., Dutt A., Emery C., Greulich H., Shah K., Sasaki H., Gazdar A., Minna J., Armstrong S.A., Mellinghoff I.K., Hodi F.S., Dranoff G., Mischel P.S., Cloughesy T.F., Nelson S.F., Liao L.M., Mertz K., Rubin M.A., Moch H., Loda M., Catalona W., Fletcher J., Signoretti S., Kaye F., Anderson K.C., Demetri G.D., Dummer R., Wagner S., Herlyn M., Sellers W.R., Meyerson M., Garraway L.A. // *Nat. Genet.* 2007. V. 39. P. 347–351.
<https://doi.org/10.1038/ng1975>
7. Mitchell M., Cutler J. // *Methods Mol. Biol.* 2011. V. 688. P. 17–33.
https://doi.org/10.1007/978-1-60761-947-5_3
8. Botezatu I.V., Kondratova V.N., Shelepov V.P., Mazurenko N.N., Tsyganova I.V., Susova O.Y., Lichtenstein A.V. // *Anal. Biochem.* 2020. V. 590. P. 113517.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.113517>
9. Li J., Wang L., Mamon H., Kulke M.H., Berbeco R., Makrigiorgos G.M. // *Nat. Med.* 2008. V. 14. P. 579–584.
<https://doi.org/10.1038/nm1708>
10. Nagai Y., Miyazawa H., Huqun, Tanaka T., Udagawa K., Kato M., Fukuyama S., Yokote A., Kobayashi K., Kanazawa M., Hagiwara K. // *Cancer Res.* 2005. V. 65. P. 7276–7282.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472>
11. Imanishi T., Obika S. // *Chem. Commun. (Camb)*. 2002. V. 16. P. 1653–1659.
<https://doi.org/10.1039/b201557a>
12. Rahman S.M., Seki S., Obika S., Yoshikawa H., Miyashita K., Imanishi T. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. P. 4886–4896.
<https://doi.org/10.1021/ja710342q>
13. Latorra D., Campbell K., Wolter A., Hurley J.M. // *Hum. Mutat.* 2003. P. 22. P. 79–85.
<https://doi.org/10.1002/humu.10228>
14. Parris B.A., Shaw E., Pang B., Soong R., Fong K., Soo R.A. // *Respirology*. 2019. V. 24. P. 215–226.
<https://doi.org/10.1111/resp.13463>
15. Itonaga M., Matsuzaki I., Warigaya K., Tamura T., Shimizu Y., Fujimoto M., Kojima F., Ichinose M., Murata S. // *PLoS One*. 2016. V. 11. P. e0151654.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151654>
16. Emelyanova M., Ghukasyan L., Abramov I., Ryabaya O., Stepanova E., Kudryaviseva A., Sadritdinova A., Dzhumakova C., Belysheva T., Surzhikov S., Lyubchenko L., Zasedatelev A., Nasedkina T. // *Oncotarget*. 2017. V. 8. P. 52304–52320.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.17014>
17. Picca A., Berzero G., Di Stefano A.L., Sanson M. // *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2018. V. 18. P. 1041–1051.
<https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1548935>
18. Pirozzi C.J., Yan H. // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2021. V. 18. P. 645–661.
<https://doi.org/10.1038/s41571-021-00521-0>
19. Tian W., Zhang W., Wang Y., Jin R., Wang Y., Guo H., Tang Y., Yao X. // *Front. Pharmacol.* 2022. V. 13. P. 982424.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.982424>
20. Varachev V.O., Guskov D.A., Shekhtman A.P., Rogozhin D.V., Polyakov S.A., Chudinov A.V., Zasedatelev A.S., Nasedkina T.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2023. V. 49. P. 1147–1152.
<https://doi.org/10.1134/S1068162023050205>
21. Nafa K., Hameed M., Arcila M.E. // *Methods Mol. Biol.* 2016. V. 1392. P. 71–82.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3360-0_8
22. Шаманин В.А., Карпов И.В., Писарева Е.Е., Гуткина Н.И., Коваленко С.П. // *Сибирский онкологич. журнал*. 2018. Т. 17. С. 30–35.
<https://doi.org/10.21294/1814-4861-2018-17-4-30-35>
23. Emelyanova M., Arkhipova K., Mazurenko N., Chudinov A., Demidova I., Zborovskaya I., Lyubchenko L., Zasedatelev A., Nasedkina T. // *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2015. V. 23. P. 255–265.
<https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000084>
24. Kukhtin A.C., Sebastian T., Golova J., Perov A., Knickerbercker C., Linger Y., Bueno A., Qu P., Villanueva M., Holmberg R.C., Chandler D.P., Cooney C.G. // *Lab. Chip*. 2019. V. 19. P. 1217–1225.
<https://doi.org/10.1039/c8lc01404c>

Detection of the *IDH1/2* Gene Mutations in Tumor Samples with Low Abundance of the Mutant Allele

V. O. Varachev*, D. A. Guskov*, O. Yu. Susova**, A. P. Shekhtman***, D. V. Rogozhin***, S. A. Surzhikov*, A. V. Chudinov*, A. S. Zasedatelev*, and T. V. Nasedkina*, #

Phone: +7 (495) 135-98-46; e-mail: tanased06@rambler.ru

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

** N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation,
Kashirskoe shosse 23, Moscow, 115478 Russia

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

Identification of driver mutations in tumors is an extremely important task in oncology for the choice of treatment strategy and assessment of therapy efficacy. In many cases, especially in disease monitoring, there is a need to detect a small number of copies of the mutant allele against the background of excessive content of wild-type DNA. In this work we investigated the possibilities of highly sensitive detection of mutations in *IDH1* and *IDH2* genes at suppression of wild-type DNA amplification using oligomers of "locked" nucleic acid (LNA) with subsequent hybridization of fluorescently labeled polymerase chain reaction (PCR) product on a biological microchip (biochip). The limit of detection of mutant DNA is 0.1% in the wild-type DNA background. The effectiveness of this approach is demonstrated by analyzing 26 samples of chondroid tumors and glial brain tumors with low representation of the mutant allele, previously undetected mutations R132C, R132L and R132H were identified in three cases.

Keywords: somatic mutations, isocitrate dehydrogenase 1 and 2, chondroid tumors, glioma, limit of detection, amplification inhibition, LNA nucleotides, biological microarray



УДК 547.789

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ВРЕМЯРАЗРЕШЕННОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ СЕЛЕКТИВНОСТИ ФЛУОРОГЕННЫХ КРАСИТЕЛЕЙ РЯДА АРИЛИДЕН-ИМИДАЗОЛОНОВ В ОТНОШЕНИИ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА¹

© 2024 г. А. Р. Гильванов*,[#], А. Ю. Смирнов*, С. А. Краснова*, И. Д. Соловьев**,
А. П. Савицкий**, Ю. А. Богданова*, М. С. Баранов*. ***

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

** Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН,
Россия, 119071 Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2

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

Поступила в редакцию 16.11.2023 г.

После доработки 26.11.2023 г.

Принята к публикации 27.11.2023 г.

С использованием флуоресцентной времяразрешенной микроскопии (FLIM) был изучен набор синтезированных ранее флуорогенов ряда арилиден-имидазолонов, преимущественно окрашивающих эндоплазматический ретикулум (ЭПР) живых клеток. Показано, что использование этого типа флуоресцентной микроскопии позволяет повысить селективность окрашивания ЭПР.

Ключевые слова: арилиден-имидазолон, флуорогены, ЭПР, время жизни флуоресценции, FLIM

DOI: 10.31857/S0132342324050129, **EDN:** LQOADH

ВВЕДЕНИЕ

Флуорогены – вещества, не обладающие собственной флуоресценцией в водных растворах, но приобретающие ее при их связывании с определенными целевыми молекулами (белками [1–4], нуклеиновыми кислотами [5] и др. [6–9]). Такая особенность позволяет в существенной степени сократить нецелевое мечение и фоновый сигнал, что делает флуорогены интереснейшим инструментом для использования во флуоресцентной микроскопии. Отдельного упоминания заслуживают флуорогены, основанные на арилиден-имидазолонах, чья структура аналогична структуре зрелого хромофора GFP [10].

Вещества данного типа характеризуются небольшим размером, обладают различными спектральными свойствами, высокой растворимостью в воде, кроме того, их несложно синтезировать [11]. Многие арилиден-имидазолон демонстрируют значительное увеличение интенсивности флуоресценции при переходе из водной среды в менее полярный растворитель, что делает их потенциальными флуоресцентными “сенсорами полярности”. Благодаря такому свойству на основе арилиден-имидазолонов были созданы флуорогенные красители (I), (II) [12], (III) [13] и (IV) [14], пригодные для селективного флуоресцентного окрашивания эндоплазматического ретикулума (ЭПР).

Сокращения: FLIM – флуоресцентная времяразрешенная микроскопия; КВФ – квантовый выход флуоресценции; ЭПР – эндоплазматический ретикулум.

¹ Дополнительные материалы к этой статье доступны по doi 10.31857/S0132342324050129 для авторизованных пользователей.

[#] Автор для связи: (эл. почта: aidar_gilvanov@mail.ru).

ЭПР – клеточная органелла, формирующая сеть трубочек и карманов, отделенных от цитоплазмы одним замкнутым слоем липидной мембраны. ЭПР играет ключевую роль в трансляции, сборке и транспорте мембранных и секреторных белков [15, 16], липидов [17], а также выступает в качестве внутриклеточного депо ионов кальция [18]. Нарушение любой из вышеперечисленных функций ЭПР приводит к ярко выраженным патологиям [19–23], что делает ЭПР исключительно важным для наблюдения внутриклеточным объектом. При этом важно разделять ЭПР и другие липидные органеллы клетки, например, образующиеся из ЭПР липидные капли (адипосомы). Адипосомы были выделены в качестве самостоятельных клеточных органелл [24], имеющих собственные клеточные функции [25].

Разделение ЭПР и липидных капель во флуоресцентной микроскопии не всегда возможно при использовании только интенсивнострических или спектральных данных о флуоресценции флуорогена. Однако флуоресценция флуорогенов характеризуется еще одним параметром – временем жизни. Время жизни флуоресценции характеризует среднее время, которое флуорофор проводит в возбужденном состоянии между актами поглощения и эмиссии фотона света [26]. Этот процесс в первую очередь зависит от природы самой молекулы, вследствие чего наблюдаемые при его измерении значения мало зависят от концентрации флуорофора или метода измерения. Тем не менее окружающая среда может существенно влиять на устойчивость возбужденной формы флуорогена и, соответственно, время жизни флуоресценции.

Флуоресцентная микроскопия времен жизни флуоресценции или флуоресцентная времязрешенная микроскопия (FLIM) давно используется в исследовательской практике. Она позволяет детектировать изменения pH в живых клетках [27, 28], концентрацию ионов хлора [29], натрия [30], кальция [31, 32] и др. Также с ее помощью возможно проводить измерение внутриклеточной температуры [33], вязкости [34] и полярности [35]. Данные о различии времен жизни флуоресценции

красителей использовались ранее для различения липидных капель и других органелл клетки [36], а также для визуализации доменов в пределах одной фосфолипидной мембраны [37].

Целью данной работы стало изучение ряда синтезированных нами ранее флуорогенов, окрашивающих преимущественно ЭПР, с использованием FLIM.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании нами были изучены четыре флуорогена из группы арилиден-имидазолонов, представленных на схеме 1. Данные вещества были ранее синтезированы в нашей лаборатории и показали высокую селективность во флуоресцентном окрашивании ЭПР [12–14], однако помимо ЭПР в микроскопии также наблюдалось флуоресцентное мечение отдельных липидных капель (адипосом). Мы предположили, что различная полярность среды в ЭПР и адипосомах будет обуславливать различные времена жизни флуоресценции, что позволит разделить эти сигналы с помощью FLIM.

В первую очередь мы изучили времена жизни флуоресценции выбранных красителей в различных средах (табл. 1–4). Было установлено, что большинство веществ характеризуется би- или даже триэкспоненциальным характером спада флуоресценции, что говорит о существовании множества механизмов релаксации возбужденного состояния данных молекул. Наименее выраженным этот эффект оказался для сложноэфирного производного (**I**), у которого вклад второй из компонент всегда оставался низким. Чуть более сложной оказалась природа релаксации производного (**II**), у которого вклад второй компоненты заметно нарастал в полярных средах. Соединения (**III**) и (**IV**) характеризовались самой сложной природой спада флуоресценции, который в некоторых случаях описывался тремя отдельными компонентами со значительным вкладом, причем для соединения (**IV**) этот вклад увеличивался при переходе к менее полярным средам (например, толуолу, гексану или диоксану). Стоит отметить,

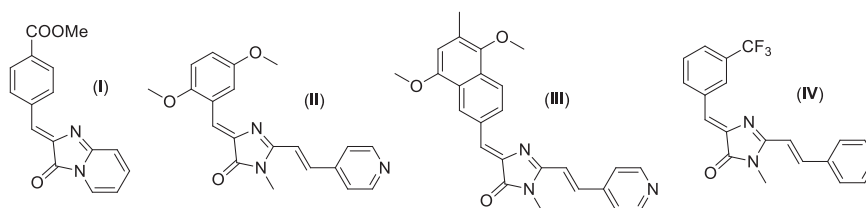


Схема 1. Структуры красителей ряда арилиден-имидазолонов, изученных в работе.

Таблица 1. Оптические свойства соединения (I) в разных растворителях

Растворитель	τ_1 , нс	A_1 , %	τ_2 , нс	A_2 , %	КВФ, % [12]
Et ₂ O	0.20	3	1.15	97	8.2
EtOAc	0.13	4	1.59	96	8.8
EtOH	0.08	7	1.26	93	4.6
MeOH	0.07	8	0.95	92	1.7
Ацетонитрил	0.07	3	2.09	97	8.9
CH ₂ Cl ₂	0.11	3	1.85	97	12.2
Диметилформамид	0.07	4	2.02	96	10.5
DMSO	0.10	5	1.99	95	9.3
Ацетон	0.05	3	1.92	97	10.2
Тетрагидрофуран	0.07	5	1.44	95	8.8
Толуол	0.09	8	1.04	92	5.9
Диоксан	0.08	7	1.24	93	6.3
Гексан	0.16	17	0.67	83	—

Таблица 2. Оптические свойства соединения (II) в разных растворителях

Растворитель	τ_1 , нс	A_1 , %	τ_2 , нс	A_2 , %	КВФ, % [12]
Et ₂ O	0.11	4	4.39	96	50.1
EtOAc	0.08	4	3.75	96	34.7
EtOH	0.11	59	0.51	41	16.0
MeOH	0.09	92	1.40	8	0.8
Ацетонитрил	0.12	5	1.75	95	8.7
CH ₂ Cl ₂	0.08	5	3.27	95	23.4
Диметилформамид	0.12	7	1.76	93	10.0
DMSO	0.14	12	1.47	88	7.1
Ацетон	0.07	7	2.38	93	16.0
Тетрагидрофуран	0.08	4	3.78	96	31.2
Толуол	0.10	5	4.03	95	38.3
Диоксан	0.08	5	4.04	95	41.1
Гексан	0.11	5	3.57	95	—

Таблица 3. Оптические свойства соединения (III) в разных растворителях

Растворитель	τ_1 , нс	A_1 , %	τ_2 , нс	A_2 , %	τ_3 , нс	A_3 , %	КВФ, % [13]
Et ₂ O	0.07	5	—	—	2.95	95	36.3
EtOAc	0.16	17	0.87	83	—	—	5.86
EtOH	Очень тусклый раствор						0.67
MeOH	Очень тусклый раствор						0.14
Ацетонитрил	Очень тусклый раствор						0.29
CH ₂ Cl ₂	0.15	32	0.63	57	2.72	11	2.89
Диметилформамид	Очень тусклый раствор						0.75
DMSO	Очень тусклый раствор						0.73
Ацетон	Очень тусклый раствор						0.57
Тетрагидрофуран	0.11	16	0.73	80	2.57	4	5.44
Толуол	0.10	6	—	—	3.25	94	46.2
Диоксан	0.09	8	—	—	2.48	92	28.4
Гексан	0.10	6	—	—	3.13	94	68.5

Таблица 4. Оптические свойства (IV) в разных растворителях

Растворитель	τ_1 , нс	A_1 , %	τ_2 , нс	A_2 , %	τ_3 , нс	A_3 , %	КВФ, % [14]
Et ₂ O	0.16	37	0.52	49	1.39	14	3.9
EtOAc	0.21	54	0.70	46	—	—	4.7
EtOH	0.15	78	0.52	22	—	—	2.3
MeOH	0.15	80	0.46	20	—	—	1.8
Ацетонитрил	0.14	43	0.46	57	—	—	2.3
CH ₂ Cl ₂	0.17	48	0.53	52	—	—	3.3
Диметилформамид	0.18	44	0.56	56	—	—	3.4
DMSO	0.17	41	0.57	59	—	—	3.7
Ацетон	0.18	55	0.54	45	—	—	3.1
Тетрагидрофуран	0.23	55	0.84	45	—	—	4.5
Толуол	0.15	23	0.56	46	1.52	31	7.5
Диоксан	0.13	21	0.52	49	1.49	30	7.7
Гексан	0.13	24	0.44	51	1.40	25	5.6

что во всех случаях мы не смогли выявить какой-то заметной корреляции между временами жизни и квантовыми выходами флуоресценции.

Затем мы изучили окрашивание клеточных культур этими красителями с использованием FLIM. Мы подтвердили, что инкубация клеток HeLa Kyoto с красителями (I–IV) в концентрациях 5–10 мкМ приводит к селективному окрашиванию ЭПР и отдельных липидных капель, однако фильтрация по времени жизни флуоресценции в некоторых случаях позволила различить эти клеточные структуры (рис. 1, а также рис. S1–S5 в дополнительных материалах).

Характер спада интенсивности флуоресценции для описанных красителей в органеллах был во многом похож на тот, что наблюдался для различных растворителей (табл. 5). Так, для красителя (I) в клеточных культурах был характерен моноэкспоненциальный спад, в то время как спад флуоресценции красителей (II–IV) лучше описывался биэкспоненциальной кривой. Важно отметить, что реальный анализ изображений FLIM и разделение сигналов опирается не на отдельные компоненты, а на среднее время жизни флуоресценции, в связи с чем нами был проанализирован и этот параметр для различных клеточных локализаций (амплитудно-взвешенное время – t_m , табл. 5).

Как оказалось, инкубация с красителем (II) приводила только к равномерному окрашиванию ЭПР, без затрагивания адипосом. При этом зна-

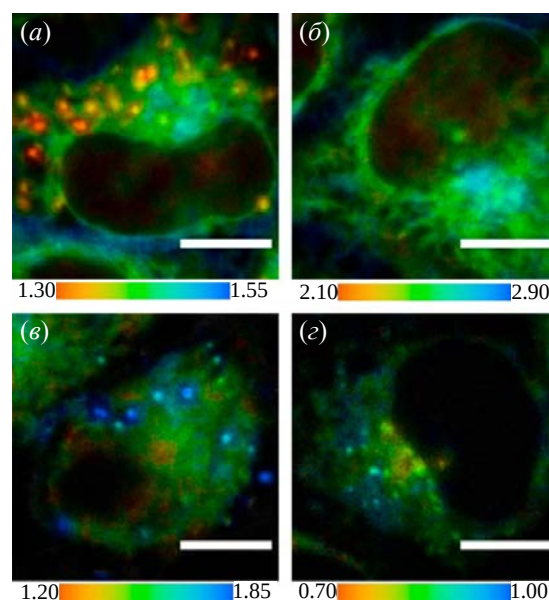


Рис. 1. Микрофотографии живых клеток HeLa Kyoto, окрашенных красителями (I) (а), (II) (б), (III) (в) и (IV) (г), полученные с использованием флуоресцентной времяразрешенной микроскопии. Цветовое кодирование отражает времена жизни флуоресценции красителей в зависимости от их окружения. Соответствующий диапазон времен жизни в наносекундах указан под каждой микрофотографией. Для красителей с двумя спектральными компонентами ((I), (III) и (IV)) в качестве значения времени жизни флуоресценции использовали амплитудно-взвешенное среднее время жизни. Масштабный отрезок – 5 мкм.

Таблица 5. Значения времени жизни флуоресценции анализируемых красителей в ЭПР и адипосомах

Краситель	Локализация	$\tau_1 \pm SD$, нс	A_1 , %	$\tau_2 \pm SD$, нс	A_2 , %	t_m , нс	Количество точек
(I)	ЭПР	1.447 ± 0.013	—	—	—	—	30
(II)		1.320 ± 0.117	44	3.627 ± 0.193	56	2.598 ± 0.042	30
(III)		0.643 ± 0.094	46	2.272 ± 0.153	54	1.514 ± 0.065	30
(IV)		0.646 ± 0.023	92	2.956 ± 0.703	8	0.807 ± 0.034	30
(I)	Адипосомы	1.351 ± 0.041	—	—	—	—	23
(II)		—	—	—	—	—	—
(III)		0.712 ± 0.171	40	2.457 ± 0.298	60	1.742 ± 0.102	13
(IV)		0.649 ± 0.033	89	2.668 ± 0.625	11	0.864 ± 0.032	17

чения среднего времени жизни флуоресценции в ЭПР ($t_m = 2.598$ нс) наиболее соответствуют значениям, полученным для данного красителя в ацетоне ($t_2 = 2.38$ нс).

Красители (I), (III) и (IV) окрашивали и адипосомы, и ЭПР. Разница в амплитудно-взвешенном среднем времени жизни флуоресценции между ЭПР и адипосомами различалась для каждого красителя.

Так, для красителя (IV) значения средних времен жизни у ЭПР и адипосом практически совпадали (0.807 и 0.864 нс соответственно). Полученные значения соответствовали менее представленной спектральной компоненте в тетрагидрофуране ($t_2 = 0.84$ нс). Однако общее поведение не соответствовало ни одному из органических растворителей. Столь незначительная разница по амплитудно-взвешенному времени жизни флуоресценции не позволила осуществить фильтрацию адипосом на микрофотографиях.

Разница между средним временем жизни флуоресценции для ЭПР и адипосом в клетках, инкубированных с красителем (I), оказалась близка к 0.1 нс (1.447 и 1.351 нс соответственно). Данные значения соответствуют мажорным спектральным компонентам в ТГФ ($t_2 = 1.44$ нс) и этаноле ($t_2 = 1.26$ нс) соответственно.

Аналогично, для красителя (III) разница составляет ~0.2 нс (ЭПР – 1.514 нс, адипосомы – 1.742 нс), однако эти значения не соответствовали данным, полученным в органических растворителях.

Мы показали, что различие в амплитудно-взвешенном времени жизни флуоресценции в 0.1 нс и более (соединения (I) и (III)) делает возможным более корректное разделение микрофотографии по цветовым каналам и, как следствие, удаление областей с адипосомами (рис. 2), что, в свою очередь, позволяет повысить селективность окрашивания ЭПР для исследованных красителей.

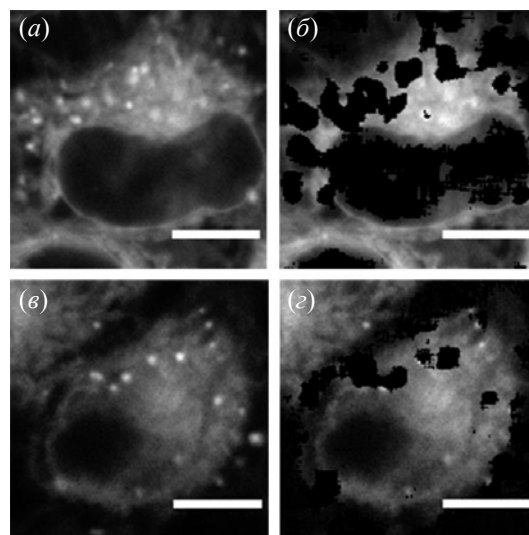


Рис. 2. Микрофотографии живых клеток HeLa Kyoto, окрашенных красителями (I) и (III) до (а, в соответственно) и после (б, г) удаления областей изображений, содержащих липидные капли. Удаление областей, содержащих липидные капли, осуществляли на основании различий времен жизни флуоресценции веществ при их окрашивании ЭПР и липидных капель. Масштабный отрезок – 5 мкм.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез флуорогенов. Соединения (I–IV) получены ранее в нашей лаборатории [12–14].

Спектроскопия времени жизни флуоресценции. Исследовали растворы соединений (I–IV) с концентрацией 1–15 мкМ в разных растворителях. Измерения производили с помощью время-разрешенного флуоресцентного спектрометра miniTau (Edinburgh Instruments, Великобритания) в окнах 10, 20 и 50 нс, разделенных на 1024 временных каналов. Для возбуждения флуоресценции применяли пикосекундный лазер EPL-450 (Edinburgh Instruments, Великобритания) с центральной длиной волны излучения 445.6 нм,

частотой повторений 20 МГц. Счет фотонов осуществляли в спектральных диапазонах 575–625 нм (соединение (I)) и 525–575 нм (соединения (II–IV)). Обработку и визуализацию данных проводили в программе Fluoracle 2.5.1 (Edinburgh Instruments, Великобритания).

Поддержание клеточной культуры. Для поддержания клеточной культуры использовали инкубатор MCO-175 (Sanyo, Япония). Клеточная культура раковой опухоли шейки матки человека HeLa Kyoto была получена из коллекции клеточных линий отдела биофотоники ИБХ РАН. Клетки культивировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в среде DMEM (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Cytiva, США), 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия). Для проведения микроскопии клетки высевали на 35-мм конфокальные чашки со смотровым окном 13 мм (SPL, Южная Корея).

Флуоресцентная времяразрешенная микроскопия (FLIM). Микроскопию времени жизни флуоресценции проводили при помощи микроскопа TE-2000U с 100× S Fluor 0.5–1.3 масляным объективом (Nikon, Япония), оборудованного сканирующим конфокальным модулем DCS-120 и детектором PMC-100-1 (Becker&Hickl, Германия). Источник Fianium WhiteLase SC-480-6 с акустооптическим фильтром (AOTF) (NKT Photonics, Дания) использовали для возбуждения флуоресценции, частота повторения импульсов – 60 МГц. Для проведения FLIM клеточную среду заменяли на раствор солей Хэнкса (ПанЭко, Россия) с добавлением 20 мМ HEPES (Corning, США), pH 7, содержащий один из красителей в концентрации 5 мкМ (I), (II) и (IV)) или 10 мкМ (III); красители разводили из 10 мМ стокового раствора в DMSO. Инкубацию в присутствии красителей осуществляли в течение 5 мин. Микроскопию проводили при комнатной температуре и использовали следующий набор эмиссионных фильтров: 580/40 (Omega Optical, США) – для красителей (I) и (II), HQ525/50m (Chroma Technology, США) – для красителя (III) и ET585/40 (Chroma Technology, США) – для красителя (IV). В зависимости от свойств красителей и их склонности к фотообесцвечиванию регистрировали следующее количество фотонов: 100 млн – для красителей (I) и (II), 40 млн – для красителя (III) и 80 млн – для красителя (IV). Флуоресцентные изображения и данные по времени жизни флуоресценции были получены и проанализированы с помощью программного пакета SPCImage (Becker&Hickl, Германия).

Обработка микрофотографий. Полученные микрофотографии в формате “SDT” импортиро-

вали в среду SPCImage с помощью программного компонента M1 SPC-150 Emulation v.9.87 (Main ® Send Data to SPCImage). В качестве области интереса выбирали наиболее равномерный по интенсивности участок ЭПР. Для выбранной области с использованием пространственного бининга устанавливали количество фотонов на пиксель не менее 300; порог визуализации флуоресценции (Threshold) – не менее 20; подбирали экспоненциальную функцию затухания (монокспоненциальное или биэкспоненциальное затухание). Заданные параметры принимали и осуществляли расчет матрицы затухания флуоресцентного сигнала (Calculate ® Decay Matrix) только в том случае, если значение распределения времени жизни флуоресценции соответствовало $\chi^2 \leq 1.3$. Далее устанавливали пороговые значения цветового кода на высоте не менее 5% от высоты пика полученной параметрической гистограммы, после чего изменяли цветовую палитру на дискретную и задавали цвета следующим образом: красный – для липидных капель, зеленый – для ЭПР и остальных областей клеток. Изображение с дискретным цветовым кодом и проекцию полной интенсивности в черно-белом цвете экспортировали в формате “TIFF”. Далее файлы обрабатывали с помощью программного пакета ImageJ (NIH, США): цветное изображение разделяли по цветовым каналам (Image ® Color ® Split Channels); изображение для красного канала отбрасывали, а изображение для зеленого канала сохраняли в формате “TIFF”.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием флуоресцентной времяразрешенной микроскопии (FLIM) был изучен набор синтезированных нами ранее флуорогенов ряда арилиден-имидазолонов, преимущественно окрашивающих ЭПР живых клеток. Проведено сравнение поведения красителей в живых клетках и в органических растворителях. Выраженной корреляции между временами жизни в различных средах, а также в адипосомах и ЭПР не выявлено. Показано, что в условиях FLIM фильтрация флуоресцентного окрашивания клеточных оргanelл по среднему времени жизни флуоресценции возможна при разнице значений от 0.1 нс. Таким образом в работе установлено, что использование этого типа флуоресцентной микроскопии позволяет повысить селективность окрашивания ЭПР изученными флуорогенными красителями.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания (номер госрегистрации 124020900020-4).

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. Jana P., Patel N., Mukherjee T., Soppina V., Kanvah S. // New J. Chem. 2019. V. 43. P. 10859–10867. <https://doi.org/10.1039/C9NJ01972C>
2. Plamont M.-A., Billon-Denis E., Maurin S., Gauron C., Pimenta F.M., Specht C.G., Shi J., Quérard J., Pan B., Rossignol J., Moncoq K., Morellet N., Volovitch M., Lescop E., Chen Y., Triller A., Vríz S., Le Saux T., Jullien L., Gautier A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. P. 497–502. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513094113>
3. Szent-Gyorgyi C., Schmidt B.F., Creeger Y., Fisher G.W., Zakel K.L., Adler S., Fitzpatrick J.A.J., Woolford C.A., Yan Q., Vasilev K.V., Berget P.B., Bruchez M.P., Jarvik J.W., Waggoner A. // Nat. Biotechnol. 2008. V. 26. P. 235–240. <https://doi.org/10.1038/nbt1368>
4. Hori Y., Norinobu T., Sato M., Arita K., Shirakawa M., Kikuchi K. // J. Am. Chem. Soc. 2013. V. 135. P. 12360–12365. <https://doi.org/10.1021/ja405745v>
5. Schoen I., Ries J., Klotzsch E., Ewers H., Vogel V. // Nano Lett. 2011. V. 11. P. 4008–4011. <https://doi.org/10.1021/nl2025954>
6. Pal K., Samanta I., Gupta R.K., Goswami D., Koner A.L. // Chem. Commun. (Camb). 2018. V. 54. P. 10590–10593. <https://doi.org/10.1039/C8CC03962C>
7. Hu R., Chen B., Wang Z., Qin A., Zhao Z., Lou X., Tang B.Z. // Biomaterials. 2019. V. 203. P. 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.03.002>
8. Hu P.F., Liu B. // Org. Biomol. Chem. 2016. V. 14. P. 9931–9944. <https://doi.org/10.1039/C6OB01414C>
9. Collot M., Kreder R., Tatarets A.L., Patsenker L.D., Mely Y., Klymchenko A.S. // Chem. Commun. (Camb). 2015. V. 51. P. 17136–17139. <https://doi.org/10.1039/C5CC06094J>
10. Baleeva N.S., Baranov M.S. // Chem. Heterocycl. Comp. 2016. V. 52. P. 444–446. <https://doi.org/10.1007/s10593-016-1909-4>
11. Walker C.L., Lukyanov K.A., Yampolsky I.V., Mishin A.S., Bommarius A.S., Duraj-Thatte A.M., Azizi B., Tolbert L.M., Solntsev K.M. // Curr. Opin. Chem. Biol. 2015. V. 27. P. 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.06.002>
12. Smirnov A.Y., Perfilov M.M., Zaitseva E.R., Zagudaylova M.B., Zaitseva S.O., Mishin A.S., Baranov M.S. // Dyes and Pigments. 2020. V. 177. P. 108258. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108258>
13. Perfilov M.M., Zaitseva E.R., Smirnov A.Y., Mikhaylov A.A., Baleeva N.S., Myasnyanko I.N., Mishin A.S., Baranov M.S. // Dyes and Pigments. 2022. V. 198. P. 110033. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.110033>
14. Perfilov M.M., Zaitseva E.R., Baleeva N.S., Kubliski V.S., Smirnov A.Y., Bogdanova Y.A., Krasnova S.A., Myasnyanko I.N., Mishin A.S., Baranov M.S. // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. P. 9923. <https://doi.org/10.3390/ijms24129923>
15. Braakman I., Hebert D.N. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2013. V. 5. P. a013201. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013201>
16. Viotti C. // Methods Mol. Biol. 2016. V. 1459. P. 3–29. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3804-9_1
17. Fagone P., Jackowski S. // J. Lipid Res. 2009. V. 50 Suppl. P. S311–S316. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800049-JLR200>
18. Clapham D.E. // Cell. 2007. V. 131. P. 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
19. Celik C., Lee S.Y.T., Yap W.S., Thibault G. // Prog. Lipid Res. 2023. V. 89. P. 101198. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2022.101198>
20. Yousuf M.S., Maguire A.D., Simmen T., Kerr B.J. // Mol. Pain. 2020. V. 16. P. 1744806920946889. <https://doi.org/10.1177/1744806920946889>
21. Park S.-J., Li C., Chen Y.M. // Am. J. Pathol. 2021. V. 191. P. 256–265. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.11.006>
22. Jin C., Kumar P., Gracia-Sancho J., Dufour J.-F. // FEBS Lett. 2021. V. 595. P. 1411–1421. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14078>
23. Zeeshan H.M.A., Lee G.H., Kim H.-R., Chae H.-J. // Int. J. Mol. Sci. 2016. V. 17. P. 327. <https://doi.org/10.3390/ijms17030327>
24. Farese R.V., Walther T.C. // Cell. 2009. V. 139. P. 855–860. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.005>
25. Onal G., Kutlu O., Gozuacik D., Dokmeci Emre S. // Lipids Health Dis. 2017. V. 16. P. 128. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0521-7>
26. Datta R., Heaster T.M., Sharick J.T., Gillette A.A., Skala M.C. // J. Biomed. Opt. 2020. V. 25. P. 1–43. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.25.7.071203>
27. Hille C., Berg M., Bressel L., Munzke D., Primus P., Löhmansröben H.-G., Dosche C. // Anal. Bioanal. Chem. 2008. V. 391. P. 1871–1879. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2147-0>
28. Koda K., Keller S., Kojima R., Kamiya M., Urano Y. // Anal. Chem. 2022. V. 94. P. 11264–11271. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c01840>

29. Hille C., Lahn M., Löhmansröben H.-G., Dosche C. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2009. V. 8. P. 319–327. <https://doi.org/10.1039/b813797h>
30. Despa S., Vecer J., Steels P., Ameloot M. // *Anal. Biochem.* 2000. V. 281. P. 159–175. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4560>
31. Jahn K., Hille C. // *PLoS One.* 2014. V. 9. P. e105334. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105334>
32. Wilms C.D., Eilers J. // *J. Microsc.* 2007. V. 225. P. 209–213. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2007.01746.x>
33. Okabe K., Inada N., Gota C., Harada Y., Funatsu T., Uchiyama S. // *Nat. Commun.* 2012. V. 3. P. 705. <https://doi.org/10.1038/ncomms1714>
34. Kuimova M.K. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2012. V. 14. P. 12671–12686. <https://doi.org/10.1039/c2cp41674c>
35. Sha J., Liu W., Zheng X., Guo Y., Li X., Ren H., Qin Y., Wu J., Zhang W., Lee C.-S., Wang P. // *Anal. Chem.* 2023. V. 95. P. 15350–15356. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c03047>
36. Levitt J.A., Chung P.-H., Suhling K. // *J. Biomed. Opt.* 2015. V. 20. P. 96002. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.9.096002>
37. Stöckl M.T., Herrmann A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2010. V. 1798. P. 1444–1456. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.12.015>

The Use of Fluorescence Time-Resolved Microscopy to Increase the Endoplasmic Reticulum Selectivity of Arylidene-Imidazolones Fluorogenic Dyes

A. R. Gilvanov^{*,#}, A. Yu. Smirnov^{*}, S. A. Krasnova^{*}, I. D. Solovyev^{**}, A. P. Savitsky^{**},
Yu. A. Bogdanova^{*}, and M. S. Baranov^{*,***}

[#] E-mail: aidar_gilvanov@mail.ru

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

^{**} A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,
Leninskiy prosp. 33/2, 119071 Moscow, Russia

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

Using fluorescence time-resolved microscopy (FLIM), a number of previously synthesized fluorogenic aryliden-imidazolone analogues, predominantly staining the endoplasmic reticulum (ER) of living cells, were studied. It has been shown that the use of this type of fluorescence microscopy can increase the selectivity of ER staining.

Keywords: arylidene-imidazolones, fluorogens, ER, fluorescence lifetime, FLIM