

ISSN 0132-3423

Том 50, Номер 1

Январь - Февраль 2024



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ



НАУКА

— 1727 —



Российская академия наук

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Том 50 № 1 2024 Январь—Февраль

Журнал основан в январе 1975 г.

Выходит 6 раз в год

ISSN 0132-3423

Журнал издается под руководством

Отделения биологических наук РАН

Главный редактор

С.Н. Кочетков

Международный редакционный совет

А.А. Богданов, А.Н. Гречкин, М.П. Кирпичников,

И.А. Михайлопуло, Н.Ф. Мясоедов,

Ш.И. Салихов, В.А. Стоник, М.С. Юнусов,

Michael G. Blackburn (UK), Jin Han (South Korea),

Amelia Pilar Rauter (Portugal), Chau Van Minh (Vietnam),

Andrei V. Zvyagin (Australia)

Редакционная коллегия

А.С. Арсеньев, С.О. Бачурин, В.В. Веселовский, В.В. Власов,

А.Г. Габибов, Т. Гианик, С.М. Деев, Н.Л. Еремеев, Р.Г. Ефремов,

В.М. Липкин, С.А. Лукьянов (зам. главного редактора),

И.В. Михура (ответственный секретарь), А.Р. Хомутов,

Н.Э. Нифантьев, Т.В. Овчинникова (зам. главного редактора),

Т.С. Орецкая, П.М. Рубцов, Л.Д. Румш, Е.Д. Свердлов,

В.Г. Туманян, А.И. Усов, Yuri V. Kotelevtsev (Scotland),

Vladlen Z. Slepak (USA), Konstantin E. Petrukhin (USA),

Le Thi Hien (Vietnam), Rao Desirazu Narasimha (India)

Заведующий редакцией Н.И. Короленко

Научный редактор М.Е. Субботина

Редактор Е.А. Пантелеева

Верстка Н.И. Короленко

Адрес редакции: 117997 ГСП, Москва, В-437,
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, корп. 32, комн. 509

Телефон: +7 (495) 330-77-83

Электронная почта: rjbc@ibch.ru;

korolenkoibch@yandex.ru

Адрес сайта: <https://www.rjbc.online>

Москва

ФГБУ «Издательство «Наука»

СОДЕРЖАНИЕ

Том 50, номер 1, 2024

Новый подход к получению аналога КЭП-структуры с правильной ориентацией (Anti-Reverse Cap Analog, ARCA) ^{2m} GpppG	
<i>А. Л. Каюшин, К. В. Антонов, Е. В. Дорофеева, М. Я. Берзина, А. О. Арнаутова, И. А. Прохоренко, А. И. Мирошников, И. Д. Константинова</i>	3
Поверхностно-активные вещества как средства доставки репортерной генетической конструкции на основе суицидного гена биназы в опухолевые клетки	
<i>Е. В. Дудкина, Э. А. Васильева, В. В. Ульянова, Л. Я. Захарова, О. Н. Ильинская</i>	11
Участие транскрипционного фактора CREB1 в регуляции работы гена <i>Mdh2</i> , кодирующего малатдегидрогеназу, в печени крыс при аллоксановом диабете	
<i>А. Т. Епринцев, К. Р. Романенко, Н. В. Селиванова</i>	26
Рактеристики и определение острой токсичности водорастворимых полисахаридов из базидиального гриба <i>Ganoderma lucidum</i>	
<i>С. Б. Хайтметова, А. С. Тураев, Г. А. Халилова, Б. И. Мухитдинов</i>	37
Синтез стероидных трейсеров методом оксимного лигирования и их использование в поляризационном флуоресцентном иммуноанализе	
<i>И. А. Прохоренко, Д. А. Глуценко, Е. Л. Гуляк, И. В. Михура, В. А. Коршун, Л. И. Мухаметова, С. А. Еремин</i>	51

ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

Аминокумараноны как хемилюминесцентные индикаторы активности уреазы и перекиси водорода	
<i>А. Ю. Смирнов, Н. С. Балеева, А. С. Мишин, Ю. А. Богданова, М. С. Баранов</i>	65
Флуорогенные красители белка NanoLuc на основе арилиден-имидазолонов	
<i>Э. Р. Зайцева, Ю. А. Богданова, Н. С. Балеева, А. Ю. Смирнов, М. С. Баранов</i>	77
2,5-Диметоксибензилиденроданин и его ациклические аналоги как селективные флуорогенные красители липидных капель живых клеток	
<i>С. А. Краснова, Ю. А. Богданова, А. И. Соколов, И. Н. Мяснянко, А. Ю. Смирнов, М. С. Баранов</i>	87
Правила для авторов журнала “Биоорганическая химия” 2024	98



УДК 577.113.6

НОВЫЙ ПОДХОД К ПОЛУЧЕНИЮ АНАЛОГА КЭП-СТРУКТУРЫ С ПРАВИЛЬНОЙ ОРИЕНТАЦИЕЙ (ANTI-REVERSE CAP ANALOG, ARCA) $^{2m}GpppG$

© 2024 г. А. Л. Каюшин*,[#], К. В. Антонов*, Е. В. Дорофеева*, М. Я. Берзина*,
А. О. Арнаутова*, И. А. Прохоренко*, А. И. Мирошников*, И. Д. Константинова*

* 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 14.09.2023 г.

После доработки 27.09.2023 г.

Принята к публикации 28.09.2023 г.

Предложен новый подход к синтезу ARCA (Anti-Reverse Cap Analog) классической структуры – диметилированного динуклеотида гуанозина $^{2m}GpppG$. Традиционный подход к его получению состоит в конденсации активированного 5'-дифосфата 7,3'-O-диметилгуанозина с 5'-монофосфатом гуанозина. Мы предлагаем использовать 3'-O-метилгуанозин только для синтеза 5'-монофосфата диметилированного гуанозина, а в конденсацию вводить активированный 5'-дифосфат гуанозина. Определены условия фосфорилирования 3'-O-метилгуанозина, позволяющие избежать образования побочного 3'-O-метил-5'-дезоксигуанозин-2'-фосфата. ARCA синтезирован с высоким выходом (89% на стадии конденсации). Разработанный нами вариант синтеза легко масштабируется и удобен для получения граммовых количеств ARCA.

Ключевые слова: ARCA, $^{2m}GpppG$, имидазolid, гуанозин

DOI: 10.31857/S0132342324010015, **EDN:** QSYRGR

ВВЕДЕНИЕ

Процессинг эукариотических мРНК начинается с образования на 5'-конце так называемой кэп-структуры – 7-метилгуанозина, присоединенного через трифосфатный мостик к первому нуклеотиду (А или G) цепи РНК. В клетке кэп играет важнейшую роль в функционировании РНК – регулирует процессы трансляции, сплайсинга и межклеточного транспорта. Эффективность выполняемых функций

напрямую зависит от структуры кэпа и количества метилированных участков.

Синтезировано и изучено большое число аналогов природного N7-метилгуанозинового кэпа [1–5], но исследователи отдают предпочтение работе с метилированным по N7 и O3' атомам динуклеотида гуанозина $^{2m}GpppG$ (рис. 1) [1–5]. Этот кэп можно получить химическим синтезом, предложенным Stepinski et al. в 2001 г. [4].

Сокращения: CDI – карбонилдимидазол; ARCA – аналог кэп-структуры с правильной ориентацией (Anti-Reverse Cap Analog).

[#]Автор для связи: (тел.: +7 (916) 686-45-03; эл. почта: kayushin.alexey@yandex.ru).

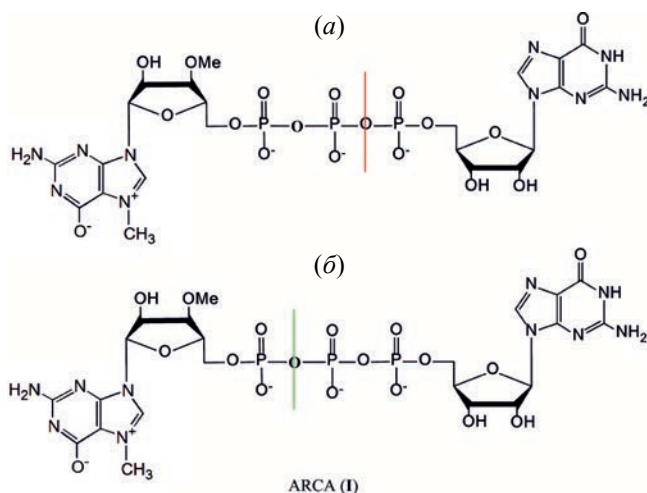


Рис. 1. Сайты конденсации при получении ARCA (**I**): (а) – классический вариант [5] (красная линия); (б) – предложенный нами (зеленая линия).

Общепринятая стратегия синтеза динуклеотидов ARCA (Anti-Reverse Cap Analog) заключается в следующем: 1) получение 5'-полифосфата (в простейшем случае – дифосфата) одного из нуклеозидов; 2) получение 5'-моно- или полифосфата второго нуклеозида; 3) активация одного из этих фосфатов (обычно через фосфоимидазolid) и последующая конденсация с образованием, например, P^1, P^3 -трифосфата или P^1, P^4 -тетрафосфата динуклеотида [1–5].

Как правило, в синтезе динуклеотидов ARCA используется 5'-дифосфат 7-метилгуанозина или его производных по 2'- или 3'-положению (см., например, работы [1–5]) и имидазolid 5'-монофосфата гуанозина (рис. 1а). Однако нуклеотиды, содержащие 7-метилгуанозин, менее стабильны по сравнению с неметилированными нуклеотидами. Кроме того, 3'-O-метилгуанозин – недешевый препарат. Поэтому желательно свести к минимуму число реакций, в которых он участвует.

Основная цель данного исследования – разработка простого и эффективного способа синтеза ARCA, который можно было бы легко масштабировать до получения граммовых количеств

динуклеотида гуанозина $^{2m}GpppG$ в лабораторных условиях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В нашем случае нужно было ответить на два вопроса: во-первых, 5'-дифосфат какого нуклеозида мы получаем – гуанозина или 7,3'-O-диметилгуанозина, и, во-вторых, какой фосфат мы активируем на стадии конденсации – дифосфат или монофосфат (рис. 1).

На последней стадии синтеза мы использовали активированный 5'-дифосфат гуанозина (**IV**) и 5'-монофосфат 7,3'-O-диметилгуанозина (**VI**). Схема синтеза динуклеотида ARCA (**I**) приведена на рис. 2.

Мононуклеотид (**II**) получали обработкой суспензии гуанозина в триэтилфосфате хлорокисью фосфора. В работе Yoshikawa et al. [6] для получения мононуклеотида (**II**) в качестве растворителя использовали триметилфосфат и добавляли воду для предотвращения образования 5',2'- или 5',3'-дифосфатов; в наших условиях дифосфаты не образовывались. Мононуклеотид (**II**) выделяли из реакционной смеси с помощью ионообменной хроматографии в виде триэтиламмониевой соли с выходом 72%.

Взаимодействием мононуклеотида (**II**) с карбонилдиимидазолом в DMF получали соответствующий имидазolid, который без выделения обрабатывали триэтиламмониевой солью ортофосфорной кислоты (получена *in situ* из 1 экв. триэтиламина и 1 экв. кислоты) с образованием 5'-дифосфата (**III**). В качестве катализатора реакции использовали хлористый цинк [7]. Соединение (**III**) выделяли из реакционной смеси с помощью ионообменной хроматографии в виде триэтиламмониевой соли с выходом 57%.

Триэтиламмониевая соль соединения (**IV**) была получена из соединения (**III**) известным методом с использованием 2,2'-дитиодипиридина, трифенил-

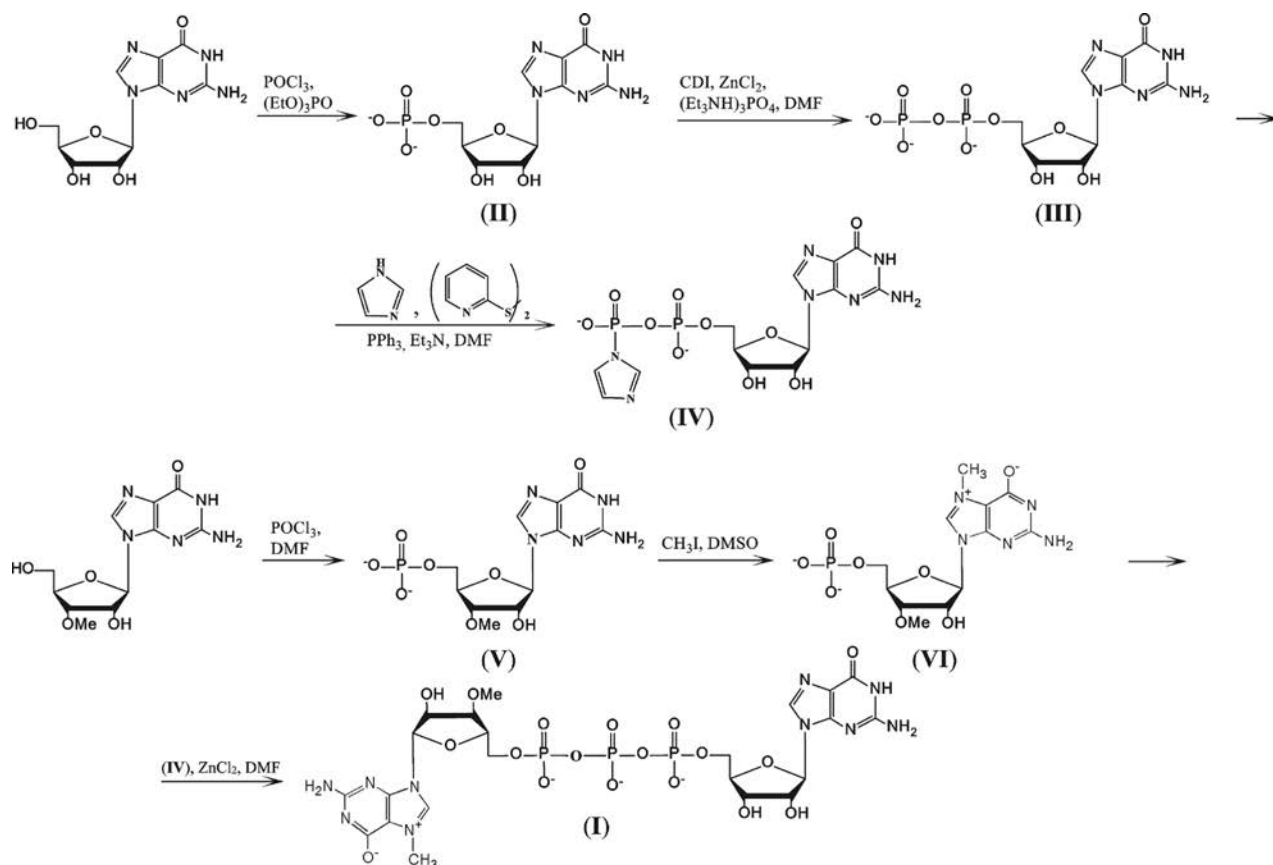


Рис. 2. Схема синтеза ARCA (I).

фосфина, имидазола и триэтиламина [1–5] с выходом 73%. Таким образом, мы синтезировали первый компонент для последней стадии синтеза соединения (I).

Следующим этапом работы был синтез 5'-монофосфата 7,3'-*O*-диметилгуанозина (V). Вначале мы попытались фосфорилировать 3'-*O*-метилгуанозин по той же методике, что и гуанозин, но помимо целевого продукта неожиданно получили 3'-*O*-метил-5'-дезоксигуанозин-2'-фосфат (VII) с выходом 18%. Состав этого соединения подтверждается данными масс-спектропии – два положительных иона с m/z $[M + H]^+$ 396.0469 (100% ^{35}Cl) и 398.0440 (31.8% ^{37}Cl), вычислено 396.0476 (100%) и 398.0446 (32.0%) соответственно. Местоположение фосфатной группы и атома хлора установлено анализом данных ЯМР.

Как следует из данных ЯМР, ароматическая структура остатка гуанина не нарушена, следовательно, модификация прошла по остатку рибозы. Сдвиг сигнала C5' в сильное поле (44.80 м.д. вместо обычных для 5'-фосфатов гуанозина 63–65 м.д.) указывает на то, что этот атом соединен с атомом более электроотрицательным, чем атом кислорода фосфатной группы. Сигналы атомов C1', C2' и C3' расщеплены в дублеты ($J_{\text{C1'-P}} = 5.0$, $J_{\text{C2'-P}} = 3.8$ и $J_{\text{C3'-P}} = 2.1$ Гц) – это характерно для атомов углерода, непосредственно соединенных с атомом кислорода фосфатной группы, и для соседних атомов углерода. Эти факты и результаты анализа двумерных спектров ЯМР однозначно подтверждают структуру соединения (VII) (рис. 3).

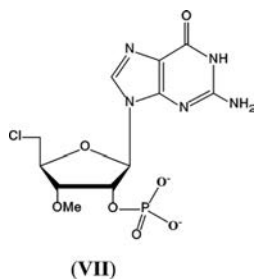


Рис. 3. Структура побочного продукта (VII) в синтезе 5'-монофосфата 7,3'-*O*-диметилгуанозина (V).

Триэтиламмониевая соль соединения (V) была получена тем же методом, что и соединение (II), но без удаления избытка POCl_3 . Выход составил 69%, соединение (VII) не образовывалось. Метилированием соединения (V) в условиях, описанных в работе Jemielity et al. [5], получили триэтиламмониевую соль соединения (VI) с выходом 83%.

Наконец, конденсацией соединений (IV) и (VI) в присутствии ZnCl_2 синтезировали ARCA (I) в виде триэтиламмониевой соли. После перевода этой соли в натриевую выход составил 89%.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы Sigma (США) и Aldrich (США) без дополнительной очистки, 3'-*O*-метилгуанозин (Shanghai Macklin Biochemical Co., Ltd., КНР), DEAE-Sephadex A-25 и CM-Sephadex C-25 (Pharmacia, Швеция), Toyopearl DEAE-650M (Tosoh Corporation, Япония). Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Avance DRX-700 (Bruker, Германия) в $\text{DMSO}-d_6$ или в D_2O при 303 К. Рабочая частота для ^1H -ЯМР – 700 МГц, для ^{13}C – 176 МГц, для ^{15}N – 71 МГц. Химические сдвиги измеряли в м.д. (δ) относительно остаточных сигналов протонов DMSO (2.50 м.д.) или D_2O (4.79 м.д.) в качестве внутреннего стандарта. Константы спин-спинового взаимодействия (J) измеряли в Гц.

Хромато-масс-спектрометрию проводили в системе Agilent 6210 TOF LC/MS (Agilent Technologies, США).

Гуанозин-5'-монофосфат, триэтиламмониевая соль (II). Суспензию 1 г (3.5 ммоль) гуанозина в 10 мл триэтилфосфата охлаждали до 0°C и при интенсивном перемешивании добавляли 1.3 мл (14.1 ммоль) POCl_3 . Инкубировали 3 ч при 0°C и 6 ч при 6°C . Избыток POCl_3 отгоняли, добавляли 25 мл 1 М TEAB и оставляли на 16 ч при комнатной температуре. Добавляли 50 мл воды и наносили на колонку (3×17 см) с DEAE-Sephadex A-25 (HCO_3^- -форма). Элюировали градиентом концентрации TEAB (0.05–0.45 М, 1 л, скорость потока 6 мл/мин). Фракции, содержавшие искомым продукт, объединяли, упаривали, остатки триэтиламина удаляли соупариванием с этанолом (3×100 мл) и лиофилизировали. Выход 1.43 г (2.53 ммоль, 72%).

Вычислено для аниона $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_8\text{P} [\text{M} - \text{H}]^-$ 362.0507, найдено 362.0736.

^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 7.96 (с, 1H, H8), 6.61 (с, 2H, NH_2), 5.69 (д, J 6.5, 1H, H1'), 4.57–4.55 (м, 1H, H2'), 4.18–4.17 (м, 1H, H3'), 3.99–3.98 (м, 1H, H4'), 3.88–3.85 (м, 1H, H5'), 3.83–3.80 (м, 1H, H5').

^{13}C -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 157.31 (C6), 154.24 (C2), 151.98 (C4), 136.25 (C8), 117.00 (C5), 86.80 (C1'), 74.07 (C2'), 84.55 (д, J 7.6, C4'), 71.51 (C3'), 64.67 (д, J 4.1, C5').

^{15}N -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 248.69 (N7), 169.79 (N9), 73.18 (NH_2).

Гуанозин-5'-дифосфат, триэтиламмониевая соль (III). К раствору 98 мг (1 ммоль) безводной H_3PO_4 в 10 мл DMF добавляли 140 мкл (1 ммоль) триэтиламина и выдерживали 30 мин (раствор 1). К суспензии 114 мг (0.2 ммоль) соединения (II) в 4 мл DMF добавляли 162 мг (1 ммоль) CDI и через 1.5 ч добавляли раствор 1. К получившейся суспензии

добавляли раствор 166 мг (1.2 ммоль) ZnCl_2 в 2 мл DMF и оставляли при интенсивном перемешивании на 16 ч. Упаривали досуха, растворяли в 30 мл воды и выливали в суспензию 500 мг (1.69 ммоль) EDTA в 30 мл воды. Нейтрализовали насыщенным водным раствором NaHCO_3 и наносили на колонку (2×18 см) с Toyopearl DEAE-650M (HCO_3^- -форма). Элюировали градиентом концентрации TEAB (0–0.3 М, 800 мл, скорость потока 7 мл/мин). Фракции, содержавшие целевое соединение, объединяли, упаривали, остатки триэтиламина удаляли соупариванием с этанолом (3×100 мл) и лиофилизировали. Выход 72 мг (0.11 ммоль, 57%).

Вычислено для аниона $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{P}_2$ [$M - \text{H}$] $^-$ 442.0171, найдено 442.0580.

^1H -ЯМР (D_2O): 8.07 (с, 1H, H8), 5.89 (д, J 6.1, 1H, H1'), 4.72 (дд, J 5.4, 11.3, 1H, H2'), 4.49 (дд, J 3.6, 5.0, H3'), 4.31 (м, 4.32–4.30, H4'), 4.17 (м, 4.17–4.15, 2H, H5').

^{13}C -ЯМР (D_2O): 158.97 (C6), 153.95 (C2), 151.78 (C4), 137.66 (C8), 116.22 (C5), 86.84 (C1'), 83.84 (д, J 9.0, C4'), 73.74 (C2'), 70.41 (H4'), 65.11 (д, J 5.7, C5').

^{15}N -ЯМР (D_2O): 235.72 (N7), 167.93 (N9).

P²-Имидазолид гуанозин-5'-дифосфата, триэтиламмониевая соль (IV). К суспензии 260 мг (0.40 ммоль) соединения (III) в 5 мл DMF при интенсивном перемешивании добавляли 136 мг (2 ммоль) имидазола, 176 мг (0.8 ммоль) 2,2'-дитиодипиридина, 56 мкл (0.4 ммоль) триэтиламина и 208 мг (0.8 ммоль) трифенилфосфина. Через 16 ч высаживали при 0°C в 30 мл ацетона, содержавшего 200 мг NaClO_4 . Центрифугировали при 5000 g , осадок промывали холодным ацетоном (3×15 мл) и высушивали в вакууме. Выход 174 мг (73%).

Вычислено для аниона $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_7\text{O}_{10}\text{P}_2$ [$M - \text{H}$] $^-$ 492.0439, найдено 492.0434.

^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 10.75 (с, 1H, H1), 7.89 (с, 1H, H8), 7.82 (с, 1H, H5''), 7.23 (с, 1H, H4''), 6.86 (с, 1H, H2''), 6.64 (с, 2H, NH_2), 5.67 (д, J 6.1, H1'), 4.55–4.54 (м, 1H, H2'), 4.17–4.16 (м, 1H, H3'), 3.95–3.93 (м, 1H, H4'), 3.87–3.84 (м, 1H, H5'), 3.79–3.76 (м, 1H, H5').

^{13}C -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 156.84 (C6), 153.60 (C2), 151.32 (C4), 139.16 (д, J 5.3, C5''), 136.08 (C8), 127.48 (д, J 7.7, C2''), 120.20 (д, J 5.5, C4''), 116.78 (C5), 86.77 (C1'), 83.57 (д, J 7.5, C4'), 73.02 (C2'), 70.45 (C3'), 64.85 (д, J 3.0, C5').

^{15}N -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 258.52 (N1''), 248.66 (N7), 194.09 (N3''), 169.62 (N9).

3'-O-Метилгуанозин-5'-монофосфат, триэтиламмониевая соль (V). Суспензию 200 мг (0.67 ммоль) 3'-O-метилгуанозина в 5 мл триэтилфосфата охлаждали до 0°C и при интенсивном перемешивании добавляли 0.3 мл (3.35 ммоль) POCl_3 . Инкубировали 2 ч при 0°C, добавляли 10 мл воды, нейтрализовали насыщенным водным раствором NaHCO_3 и наносили на колонку (3×17 см) с DEAE-Sephadex A-25 (HCO_3^- -форма). Элюировали градиентом концентрации TEAB (0.05–0.45 М, 1.4 л, скорость потока 7 мл/мин). Фракции, содержавшие искомый продукт, объединяли, упаривали, остатки триэтиламина удаляли соупариванием с этанолом (3×100 мл) и лиофилизировали. Выход 266 мг (0.46 ммоль, 69%).

Вычислено для аниона $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_8\text{P}$ [$M - \text{H}$] $^-$ 376.0664, найдено 376.0588.

^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 7.93 (с, 1H, H8), 6.76 (с, 2H, NH_2), 5.69 (д, J 6.4, 1H, H1'), 4.65–4.63 (м, 1H, H2'), 4.10–4.08 (м, 1H, H4'), 3.91–3.88 (м, 1H, H5'), 3.84–3.83 (м, 1H, H5'), 3.83–3.82 (м, 1H, H4'), 3.41 (с, 3H, $\text{O}-\text{CH}_3$).

^{13}C -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 157.14 (C6), 154.43 (C2), 151.96 (C4), 136.95 (C8), 116.98 (C5), 86.81 (C1'), 73.38 (C2'), 81.82 (C4'), 80.64 (C3'), 64.85 (д, J 5.2, C5'), 58.17 (OCH_3).

^{15}N -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 249.93 (N7), 169.22 (N9), 75.10 (NH_2).

7,3'-О-Диметилгуанозин-5'-монофосфат, триэтиламмониевая соль (VI). К раствору 200 мг (0.35 ммоль) соединения (V) в 3.5 мл DMSO добавляли 0.7 мл (12 ммоль) CH_3I . Через 3 ч выливали в 100 мл ледяной воды и экстрагировали эфиром до исчезновения желтой окраски (5×50 мл). Водный слой нейтрализовали насыщенным водным раствором NaHCO_3 и наносили на колонку (2×18 см) с Toyopearl DEAE-650M (HCO_3^- -форма). Элюировали градиентом концентрации TEAB (0–0.2 М, 800 мл, скорость потока 5 мл/мин). Фракции, содержавшие целевое соединение, объединяли, упаривали, остатки триэтиламина удаляли соупариванием с этанолом (3×100 мл) и лиофилизировали. Выход 143 мг (0.30 ммоль, 83%).

Вычислено для $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_8\text{P}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 392.0971, найдено 392.0976.

^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 9.58 (с, 1H, H8), 7.50 (с, 2H, NH_2), 5.82 (уш.сигн, 1H, H1'), 4.66 (уш.сигн, 1H, H2'), 4.16–4.15 (м, 1H, H4'), 4.04–4.02 (м, 1H, H5'; м, 1H, H4'), 4.00 (с, 3H, N- CH_3), 3.84–3.83 (м, 1H, H5'), 3.37 (с, 3H, O- CH_3).

^{13}C -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 158.88 (C6), 149.80 (C4), 136.06 (C8), 107.74 (C5), 89.84 (C1'), 82.70 (д, J 7.6, C4'), 78.80 (C3'), 73.45 (C2'), 62.96 (д, J 3.8, C5'), 58.07 (O- CH_3), 35.92 (N- CH_3).

^{15}N -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 159.80 (N7).

P¹-Гуанозин-5'-P³-(7,3'-О-диметилгуанозин-5')-трифосфат (натриевая соль) (I). К суспензии соединений (VI) (104 мг, 0.21 ммоль) и (IV) (111 мг, 0.16 ммоль) в 3 мл DMF добавляли раствор 250 мг (1.84 ммоль) ZnCl_2 в 1 мл DMF. Через 16 ч прозрачный раствор выливали в суспензию 800 мг (2.72 ммоль) EDTA в 50 мл воды. Нейтрализовали насыщенным водным раствором NaHCO_3 и наносили на колонку

(2×18 см) с Toyopearl DEAE-650M (HCO_3^- -форма). Элюировали градиентом концентрации TEAB (0–0.3 М, 800 мл, скорость потока 5 мл/мин). Фракции, содержавшие целевое соединение, объединяли, упаривали, остатки триэтиламина удаляли соупариванием с этанолом (3×100 мл). Сухой остаток растворяли в 10 мл воды, наносили на колонку (1.5×12 см) с CM-Sephadex C-25 (Na^+ -форма) и элюировали водой (скорость потока 0.5 мл/мин). Элюат лиофилизировали. Выход 165 мг (0.19 ммоль, 89%).

Вычислено для аниона $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_{10}\text{O}_{18}\text{P}_3$ $[\text{M} - \text{H}]^-$ 815.0958, найдено 815.0859.

^1H -ЯМР (D_2O): 7.96 (с, 1H, H8-G), 5.85 (д, J 4.1, 1H, H1'- ^{2m}G), 5.76 (д, J 6.2, 1H, H1'-G), 4.68 (уш.сигн, 1H, H2'- ^{2m}G), 4.66 (уш.сигн, 1H, H2'-G), 4.44 (дд, J 3.6, 5.2, 1H, H3'-G), 4.42–4.39 (м, 1H, H4'- ^{2m}G), 4.38–4.33 (м, 1H, H5'- ^{2m}G), 4.32–4.29 (м, 1H, H4'-G), 4.27–4.23 (м, 1H, H5'-G), 4.21–4.20 (м, 1H, H5'- ^{2m}G), 4.20–4.19 (м, 1H, H5'-G), 4.10–4.08 (м, 1H, H3'- ^{2m}G), 4.03 (с, 3H, N- CH_3), 3.45 (с, 3H, O- CH_3).

^{13}C -ЯМР (D_2O): 158.49 (C6-G), 137.53 (C8-G), 151.52 (C4-G), 149.35 (C4'- ^{2m}G), 137.53 (C8-G), 136.34 (C8- ^{2m}G), 116.09 (C5-G), 108.02 (C5'- ^{2m}G), 89.68 (C1'- ^{2m}G), 86.75 (C1'-G), 83.78 (д, J 8.0, C4'-G), 82.40 (д, J 9.4, C4'- ^{2m}G), 78.57 (C3'- ^{2m}G), 73.59 (C2'- ^{2m}G), 73.53 (C2'-G), 70.33 (C3'-G), 65.46 (д, J 5.3, C5'-G), 64.81 (C5'- ^{2m}G), 58.05 (O- CH_3), 36.09 (N- CH_3).

^{15}N -ЯМР (D_2O): 236.72 (N7-G), 168.09 (N9-G), 160.95 (N7- ^{2m}G).

^{31}P -ЯМР (D_2O , 243 Мгц, относительно H_3PO_4): –11.35 (д, J 17.2, 1P, P¹ или P³), –11.55 (д, J 18.4, 1P, P³ или P¹), от –22.84 до –23.26 (м, 1P, P²).

3'-О-Метил-5'-дезоксигуанозин-2'-фосфат, триэтиламмониевая соль (VII). Суспензию 100 мг (0.34 ммоль) 3'-О-метилгуанозина в 1 мл триэтилфосфата охлаждали до 0°C и при интенсивном

перемешивании добавляли 0.1 мл (1.02 ммоль) POCl₃. Через 3 ч отгоняли избыток POCl₃, добавляли 3 мл насыщенного водного раствора NaHCO₃, 50 мл воды и наносили на колонку (2 × 18 см) с Toyopearl DEAE-650M (HCO₃⁻-форма). Элюировали градиентом концентрации TEAB (0–0.2 М, 800 мл, скорость потока 5 мл/мин). Фракции, содержавшие целевое соединение, объединяли, упаривали, остатки триэтиламина удаляли соупариванием с этанолом (3 × 100 мл) и лиофилизировали. Выход 33 мг (0.06 ммоль, 18%).

Вычислено для C₁₁H₁₆ClN₅O₇P [M + H]⁺ 396.0476, 398.0446, найдено 396.0469, 398.0440.

¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆): 9.42 (уш. сигн, 1H, H1), 7.88 (с, 1H, H8), 6.62 (с, 2H, NH₂), 5.90 (д, *J* 5.4, 1H, H1'), 5.12–5.09 (м, 1H, H2'), 4.18–4.16 (м, 1H, H3'), 4.12–4.09 (м, 1H, H4'), 3.90–3.87 (м, 1H, H5'), 3.80–3.78 (м, 1H, H5'), 3.47 (с, 3H, CH₃).

¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 156.70 (C6), 153.70 (C2), 151.27 (C4), 135.87 (C8), 116.60 (C5), 85.73 (д, *J* 5.0, C1'), 81.46 (C4'), 79.15 (д, *J* 2.1, C3'), 73.49 (д, *J* 3.8, C2'), 57.55 (CH₃), 44.80 (C5').

¹⁵N-ЯМР (DMSO-*d*₆): 248.60 (N7), 168.35 (N9), 148.03 (N1), 74.32 (NH₂).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен новый вариант синтеза ARCA гуанозинового типа, метилированного по N7 и 3'-положениям гуанозина. Реализована схема конденсации 5'-монофосфата 7,3'-*O*-диметилгуанозина и 5'-дифосфата гуанозина, причем проводили активацию имидазолом именно 5'-дифосфата гуанозина. Определены условия фосфорилирования 3'-*O*-метилгуанозина, позволяющие избежать образования побочного 3'-*O*-метил-5'-дезоксид-5'-хлоргуанозин-2'-фосфата. ARCA синтезирован с высоким выходом (89% на стадии конденсации).

Разработанный вариант синтеза ARCA легко масштабируется и может быть использован в практике

биоорганической химии для получения граммовых количеств ARCA.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Соглашения 075-15-2021-1049.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Peng Z.-H., Sharma V., Scott F. Singleton S.F., Paul D. Gershon P.D. // *Org. Lett.* 2002. V. 4. P. 161–164. <https://doi.org/10.1021/ol0167715>
2. Rydzik A.M., Lukaszewicz M., Zuberek J., Kowalska J., Darzynkiewicz Z.M., Darzynkiewicz E., Jemielity J. // *Org. Biomol. Chem.* 2009. V. 7. P. 4763–4776. <https://doi.org/10.1039/B911347A>
3. Grudzien-Nogalska E., Stepinski J., Jemielity J., Zuberek J., Stolarski R., Rhoads R.E., Darzynkiewicz E. // *Methods Enzymol.* 2007. V. 431. P. 203–227. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)31011-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)31011-2)
4. Stepinski J., Waddell C., Stolarski R., Darzynkiewicz E., Rhoads R.E. // *RNA.* 2001. V. 7. P. 1486–1495.
5. Jemielity J., Fowler T., Zuberek J., Stepinski J., Lewdowicz M., Niedzwiecka A., Stolarski R., Darzynkiewicz E., Rhoads R.E. // *RNA.* 2003. V. 9. P. 1108–1122. <https://doi.org/10.1261/rna.5430403>
6. Yoshikawa M., Kato T., Takenishi T. // *Bull. Chem. Soc. Jap.* 1969. V. 42. P. 3505–3508.
7. Kadokura M., Wada T., Urashima C., Sekine M. // *Tetrahedron Lett.* 1997. V. 38. P. 8359–8362. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(97\)10263-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(97)10263-5)

A New Approach to the Synthesis of Anti-Reverse Cap Analog (ARCA) 2m GpppG

A. L. Kayushin^{*,#}, K. V. Antonov^{*}, E. V. Dorofeeva^{*}, M. Ya. Berzina^{*}, A. O. Arnautova^{*},
I. A. Prohorenko^{*}, A. I. Miroshnikov^{*}, and I. D. Konstantinova^{*}

[#] Phone: +7(916)-686-45-03; e-mail: kayushin.alexey@yandex.ru

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

A new approach to the synthesis of Anti-Reverse Cap Analog (ARCA) of the classical structure – dimethylated guanosine dinucleotide 2m GpppG is proposed. The classical approach to obtaining consists in condensation of activated 5'-diphosphate of 7,3'-O-dimethylguanosine with 5'-guanosine monophosphate. We suggest to use a commercially available 3'-O-methylguanosine for the synthesis of 5'-monophosphate of dimethylated guanosine only, and to use an activated 5'-guanosine diphosphate in the condensation. The conditions of 3'-O-methylguanosine phosphorylation were determined to avoid the formation of a side product 3'-O-methyl-5'-deoxy-5'-chloroguanosine-3'-phosphate. ARCA was synthesized with a high yield (89% at the condensation stage). Our approach to the synthesis is easily scaled and can be used for a preparative synthesis of ARCA (several grams).

Keywords: ARCA, 2m GpppG, imidazolidine, guanosine



УДК 602.643:675.043.42

ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА КАК СРЕДСТВА ДОСТАВКИ РЕПОРТЕРНОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ СУИЦИДНОГО ГЕНА БИНАЗЫ В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

© 2024 г. Е. В. Дудкина*, Э. А. Васильева**, В. В. Ульянова*,[#],
Л. Я. Захарова**, О. Н. Ильинская*

* Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета,
Россия, 420008 Казань, ул. Кремлевская, 18

** Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ Казанский научный центр РАН,
Россия, 420088 Казань, ул. Арбузова 8

Поступила в редакцию 18.05.2023 г.

После доработки 21.06.2023 г.

Принята к публикации 22.06.2023 г.

Среди современных генотерапевтических методов борьбы с онкологическими заболеваниями особой значимостью и перспективностью отличается суицидальная генотерапия, основанная на доставке в клетки-мишени цитотоксического агента. В качестве одного из таких агентов может рассматриваться ген рибонуклеазы *Bacillus pumilus* TP – биназы, обладающей высоким противоопухолевым потенциалом и низкой иммуногенностью. Помимо выбора трансгена еще одним фактором, влияющим на эффективность генотерапии, является способ доставки нуклеиновой кислоты в клетки-мишени. Поверхностно-активные вещества (ПАВ) обладают высокой функциональной активностью и представляют собой перспективные средства доставки терапевтических нуклеиновых кислот. Цель данной работы – оценка возможности использования геминальных ПАВ как средств доставки генетической конструкции на основе гена цитотоксичной биназы в опухолевые клетки. Для подбора условий трансфекции была создана репортерная генетическая конструкция, несущая ген биназы, слитый с геном зеленого флуоресцентного белка TurboGFP. Опухолевые клетки аденокарциномы легких человека A549 трансфицировали с использованием коммерческого реагента Липофектамина 3000, эффективность трансфекции оценивала по интенсивности флуоресценции белка TurboGFP. Для устранения токсического действия биназы на клетки-реципиенты в состав генетической конструкции был введен ген ингибитора РНКазы – барстара. Методами динамического светорассеяния и флуоресцентной спектроскопии была показана высокая комплексообразующая способность геминальных ПАВ в отношении репортерной системы. Для ПАВ 16-6-16ОН обнаружена наибольшая трансфицирующая активность при низком уровне цитотоксичности. Таким образом, доказана возможность использования геминальных ПАВ для доставки терапевтических нуклеиновых кислот в опухолевые клетки.

Ключевые слова: трансфекция, зеленый флуоресцентный белок, рибонуклеаза, биназа, цитотоксичность, противоопухолевая активность, геминальные ПАВ

DOI: 10.31857/S0132342324010027, **EDN:** QSMROG

Сокращения: РНКазы – рибонуклеазы; ПАВ – поверхностно-активные вещества; TurboGFP – улучшенный вариант зеленого флуоресцентного белка SorGFP из копеподы *Pontellina plumata*; ЭБ – этидий бромид; D_h – гидродинамический диаметр; ЦТАБ – цетилтри-метиламмоний бромид.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (843) 233-78-65; эл. почта: uyanova_vera@mail.ru).

ВВЕДЕНИЕ

Поиск и разработка новых подходов в борьбе с онкологическими заболеваниями – один из основных вызовов, стоящих перед исследователями всего мира. Несмотря на достижения современной медицины, традиционное лечение рака отличается высокой эффективностью лишь на начальных стадиях заболевания. При прогрессировании болезни стандартные противоопухолевые протоколы теряют свой терапевтический эффект ввиду низкой селективности применяемых препаратов, возникновении лекарственной устойчивости у злокачественных клеток и высокой системной токсичности химиотерапевтических агентов [1].

Среди современных методов лечения рака особые перспективы имеет геновая терапия. Благоприятный терапевтический эффект генотерапии рака достигается путем введения в клетки-мишени терапевтических нуклеиновых кислот с целью замены мутантных генов, модификации их последовательности или регуляции генетической экспрессии при ее нарушениях [2, 3]. Терапевтические гены подбирают с учетом молекулярной патофизиологии болезни для таргетного воздействия на отдельные звенья онкогенеза. Основные подходы генотерапии включают блокирование экспрессии определенных генов с помощью антисмысловых олигонуклеотидов или интерферирующих РНК; редактирование генома с помощью нуклеаз ZFN, TALENs или CRISPR/Cas; суицид опухолевых клеток под действием цитотоксичных белков; онколитическую вирусную терапию и иммунотерапию [4–7]. Для генотерапевтических методов борьбы с онкологическими заболеваниями, как и для других противоопухолевых подходов, необходимо выполнение трех главных условий: генные конструкции и системы их доставки должны обладать низкой иммуногенностью, высокой селективностью и

эффективностью. Еще один важный аспект – минимизация риска возникновения резистентности у раковых клеток.

Одним из многообещающих противоопухолевых агентов, обладающих всеми перечисленными качествами, выступает секретируемая рибонуклеаза (РНКаза) *Bacillus pumilus* 7P – биназа. Противоопухолевый потенциал биназы детально изучен, охарактеризованы ее физико-химические свойства [8, 9]. Фермент отличается низкой иммуногенностью и селективной цитотоксичностью в отношении различных видов опухолевых клеток, экспрессирующих определенные онкогены [10–12]. Гибель раковых клеток происходит по пути апоптоза, а не некроза, что также является преимуществом РНКазы [13]. Кроме того, ферментативная природа белка исключает возможность возникновения резистентности к биназе при ее терапевтическом применении. Согласно приведенным данным, биназа представляется идеальным кандидатом для создания на ее основе суицидальной генетической конструкции, введение которой в опухолевые клетки-мишени будет приводить к их элиминации.

Помимо выбора целевого гена эффективность генотерапевтического подхода лимитируется методом доставки генетического материала в клетки-реципиенты. Для безопасной и эффективной доставки терапевтических нуклеиновых кислот в настоящее время разработаны системы доставки на основе вирусных и невирусных векторов [14], которые защищают нуклеиновую кислоту от деградации, обеспечивают эффективную доставку целевого гена в клетки-мишени и минимизируют воздействие на другие клетки организма [15]. Наиболее часто терапевтическую нуклеиновую кислоту инкапсулируют в полимерные носители или векторы вирусного происхождения [16].

Существуют различные способы доставки трансгена с использованием вирусных и невирусных векторов, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки [14]. Наиболее часто рассматриваются полимерные носители и векторы вирусного происхождения [16]. По состоянию на 2017 г. ~70% всех клинических испытаний генной терапии проведено с использованием вирусных векторов. Однако существует несколько серьезных опасений относительно применения вирусов в качестве носителей, включая иммуногенность, инсерционный мутагенез, а также сообщения о смерти после введения вирусных векторов в организм [17]. Поэтому в последнее время значительное внимание уделяется разработке и применению новых невирусных подходов для специфической доставки терапевтических нуклеиновых кислот к клеткам-мишеням, таким как липидные наночастицы и частицы на основе полимеров полиэтиленimina, полиэтиленгликоля, полилизина, хитозана и др. [18–20].

Амфифильные соединения, прежде всего катионные ПАВ, находят широкое применение при создании и модификации наноконтейнеров для доставки лекарственных веществ, в том числе нуклеиновых кислот [21–23]. Применение наноразмерных носителей позволяет решать проблемы повышения биодоступности лекарств, защиты от преждевременной биodeградации, снижения побочных эффектов и пр. С точки зрения практического использования большой интерес представляют дикатионные геминальные ПАВ, содержащие две головные группы, несущие длинноцепочечные алкильные радикалы, связанные между собой спейсерным фрагментом [23, 24]. Такие ПАВ обладают низкими значениями критической концентрации мицеллообразования [25], что позволяет значительно снижать их дозировки и, соответственно, токсичность лекарственных композиций. В ряде работ была показана зависимость эффективности

трансфекции ДНК от длины спейсерного фрагмента геминальных ПАВ [23, 26, 27]. Лучшие результаты были получены для амфифилов с коротким либо длинным спейсером. В литературе широко освещается влияние структуры головной группы [28] и длины углеводородного радикала ПАВ [29] на комплексообразующую способность амфифилов с макромолекулой ДНК. Функционализация головной группы геминальных ПАВ (например, введение гидроксипропановой группы) может способствовать дополнительным взаимодействиям ПАВ–ДНК за счет водородного связывания.

В связи с вышесказанным целью данной работы была оценка возможности использования геминальных ПАВ как средства доставки генетической конструкции на основе гена цитотоксичной биназы в опухолевые клетки-мишени.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Суицидальная генотерапия – одно из перспективных направлений генотерапии рака, основанное на введении в опухолевые клетки трансгенов, вызывающих клеточный суицид путем инициации в них апоптоза [30]. Чаще всего в качестве целевого гена используют гены, кодирующие ферменты вирусного или бактериального происхождения, способные превращать пролекарство в цитотоксический агент [31]. В настоящее время тестируют гены дифтерийного токсина, рицина, а также комплексы фермент–пролекарство, например, цитозиндеаминазы, превращающей 5-фторцитозин в противоопухолевый агент 5-фторурацил [32–34]. Гены цитотоксичных РНКаз обладают большим потенциалом для использования в суицидальной генотерапии рака. Внедрение гена цитотоксической биназы без добавления пролекарств будет приводить к индукции апоптоза в опухолевых клетках, не оказывая при этом

токсического воздействия на нормальные клетки организма.

Репортерная генетическая конструкция на основе гена биназы. Для подбора условий доставки генотерапевтической конструкции на основе гена биназы в опухолевые клетки нами была создана репортерная генетическая конструкция, несущая ген биназы, слитый с геном зеленого флуоресцентного белка TurboGFP, и ген ингибитора РНКазы барстара. Гены биназы и барстара клонировали в вектор рTurboGFP-С под контроль конститутивного промотора цитомегаловируса $P_{CMV\ IE}$, обеспечивающего высокий уровень экспрессии целевого гена в клетках эукариот. Для этого генетическую кассету, содержащую гены биназы и барстара, получали путем ПЦР-амплификации с плазмиды рML163 (рис. 1). Далее вектор рTurboGFP-С и вставку “биназа–барстар” рестрицировали по сайтам XhoI и BamHI, полученные фрагменты лигировали. Успешность проведенного клонирования подтверждали с помощью ПЦР, рестрикционного анализа и секвенирования. ПЦР полученной генетической конструкции с использованием праймеров F-Bin-Xho и R-Brst-BamH выявила наличие клонируемой вставки “биназа–барстар” в составе вектора рTurboGFP-С. Рестрикция эндонуклеазами XhoI и BamHI подтвердила наличие двух фрагментов, соответствующих размеру вектора и клонированной вставки (рис. 1).

Таким образом, в ходе проведенного клонирования была получена репортерная генетическая конструкция рTurboGFP-Bi-Brst, в которой ген биназы клонирован в одной открытой рамке считывания с геном зеленого флуоресцентного белка TurboGFP и состыкован с геном ингибитора барстара. Такая репортерная система позволяет по интенсивности флуоресценции TurboGFP, отражающей уровень экспрессии слитого с ним трансгена, как качественно, так и количественно оценивать эффективность трансфекции плазмидной

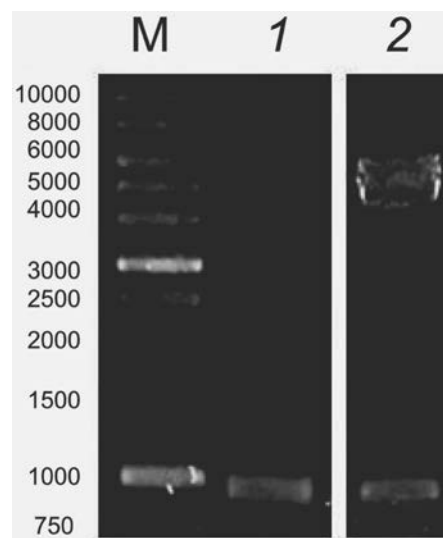


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов клонирования генетической кассеты “биназа–барстар” в вектор рTurboGFP-С: М – маркер длин ДНК 1 кб (Сибэнзим, Россия); 1 – ПЦР-продукт “биназа–барстар”; 2 – полученная генетическая конструкция рTurboGFP-Bi-Brst, рестрицированная по сайтам XhoI и BamHI.

ДНК в опухолевые клетки [35, 36]. Субклонирование гена ингибитора РНКазы на данном этапе обеспечивает защиту реципиентных клеток от цитотоксического действия биназы при подборе условий трансфекции опухолевых клеток. В дальнейших экспериментах при характеристике цитотоксического потенциала суицидальной генетической конструкции на основе гена биназы ген ингибитора РНКазы будет удален из ее состава.

Комплексообразование ПАВ с ДНК. Для оценки возможности использования ПАВ в качестве трансфицирующих агентов на первом этапе нами был проведен анализ характера взаимодействия ПАВ с полученной репортерной конструкцией. Гидродинамический диаметр (D_h) липоплексов ПАВ–ДНК (комплексов ПАВ–ДНК) определяли методом динамического рассеяния света (рис. 2). Размер липоплексов ПАВ–ДНК оценивали при варьировании мольного соотношения компонентов. Так, первичное распределение размеров, усредненных

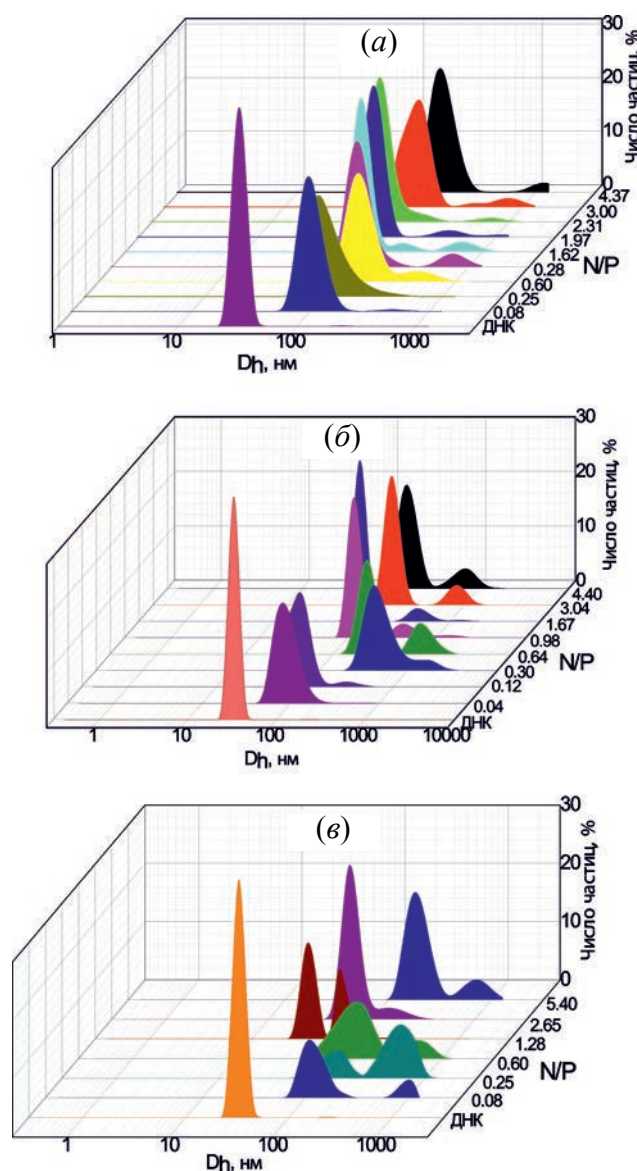


Рис. 2. Распределение агрегатов по размеру, усредненное по числу частиц: 16-6-16ОН/ДНК (а), 16-6-16/ДНК (б) и ЦТАБ/ДНК (в), при различном соотношении ПАВ/ДНК. $C_{\text{ДНК}} = 10 \text{ мкМ}$; 25°C .

по интенсивности, показало наличие двух популяций частиц с гидродинамическим диаметром ~ 33 и $\sim 237 \text{ нм}$ с преобладанием частиц малого размера. D_h индивидуальных мицелл геминальных (16-6-16 и 16-6-16ОН) и монокатионного (ЦТАБ) ПАВ в районе критической

концентрации мицеллообразования (0.01 мМ для 16-6-16 ОН, 0.04 мМ для 16-6-16, 1 мМ для ЦТАБ) составило $5\text{--}10$ и $2\text{--}5 \text{ нм}$ соответственно (рис. 2). Добавление 16-6-16ОН к раствору ДНК (рис. 2а) даже в незначительных количествах приводило к формированию смешанных комплексов большего размера ($\sim 100 \text{ нм}$). Также наблюдалось формирование более крупных смешанных агрегатов размером $500\text{--}700 \text{ нм}$, которые сохранялись во всем диапазоне концентраций. Стоит отметить, что при формировании комплексов 16-6-16ОН/ДНК варьирование мольного соотношения компонентов незначительно влияло на размер смешанных агрегатов. В случае 16-6-16 при низких концентрациях наблюдалось образование частиц с $D_h \sim 100 \text{ нм}$ (рис. 2б). В области нейтрализации заряда ДНК D_h смешанных агрегатов увеличивался до $250\text{--}400 \text{ нм}$ (при соотношении ПАВ/ДНК $0.3\text{--}0.64$), что, вероятно, обусловлено слипанием частиц. При дальнейшем увеличении концентрации ПАВ D_h снова уменьшался до $120\text{--}140 \text{ нм}$.

Оценка заряда смешанных композиций показывает, что с увеличением мольного соотношения ПАВ/ДНК происходит компенсационное изменение ζ -потенциала от -84 мВ (ζ -потенциал индивидуальной макромолекулы ДНК) до $+38 \text{ мВ}$ (рис. 3). Важный параметр – соотношение, соответствующее нулевому значению ζ -потенциала. Величина $(N/P)_0$ уменьшается

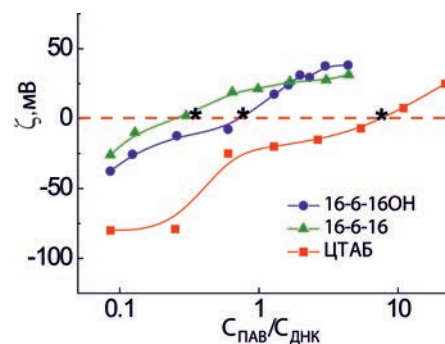


Рис. 3. Изменение электрокинетического потенциала комплексов ПАВ–ДНК при различном соотношении компонентов. $C_{\text{ДНК}} = 10 \text{ мкМ}$; 25°C .

в ряду ЦТАБ > 16-6-16ОН > 16-6-16 ($7.50 > 0.74 > 0.27$). Этот результат свидетельствует о том, что электростатические взаимодействия вносят значительный вклад при комплексообразовании ПАВ/ДНК.

На следующем этапе методом флуоресцентной спектроскопии с использованием зонда-интеркалятора этидий бромид (ЭБ) оценивали степень связывания ПАВ с ДНК. Показано, что при взаимодействии ЭБ с нуклеотидными основаниями ДНК наблюдается рост интенсивности флуоресценции. При конкурентном связывании катионного ПАВ с фосфатными группами ДНК происходит вытеснение ЭБ с поверхности макромолекулы и тушение его флуоресценции. Степень тушения флуоресценции ЭБ зависит от структуры головной группы ПАВ. Как и ожидалось, в случае геминальных ПАВ (рис. 4а, 4б) снижение флуоресценции ЭБ происходит при более низких соотношениях ПАВ/ДНК по сравнению с монокатионным ЦТАБ (рис. 4в). При наличии гидроксиэтильного фрагмента процесс тушения протекает в 2 раза более активно (рис. 4а).

На основании полученных спектров была рассчитана степень связывания ПАВ/ДНК (рис. 5). Для всех изученных амфифилов достигалась высокая степень связывания (90%), однако при различном соотношении компонентов системы. В случае геминальных ПАВ эффективное комплексообразование с ДНК наблюдалось при более низких соотношениях ПАВ/ДНК. Высокая степень связывания между компонентами достигалась при концентрациях геминальных ПАВ меньше концентрации ДНК (ПАВ/ДНК < 1), а в случае ЦТАБ – при 10-кратном превышении концентрации амфифила (соотношение ПАВ/ДНК ≥ 1).

Таким образом, исследованные геминальные ПАВ проявили высокую комплексообразующую способность в отношении ДНК при соотношении

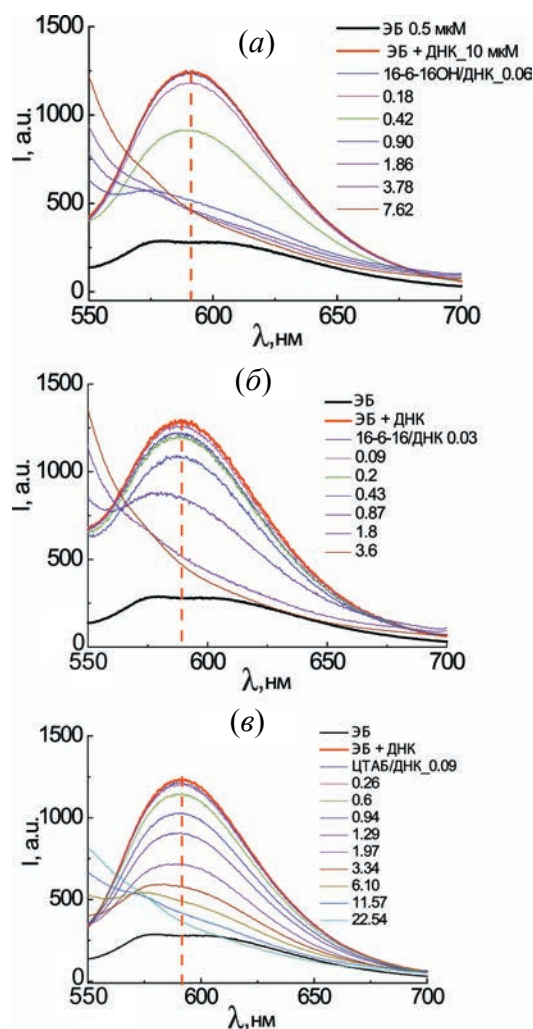


Рис. 4. Спектры флуоресценции комплексов этидий бромид/ДНК в присутствии 16-6-16ОН (а), 16-6-16 (б) и ЦТАБ (в). $C_{\text{ДНК}} = 10 \text{ мкМ}$; $C_{\text{ЭБ}} = 0.5 \text{ мкМ}$; 25°C .

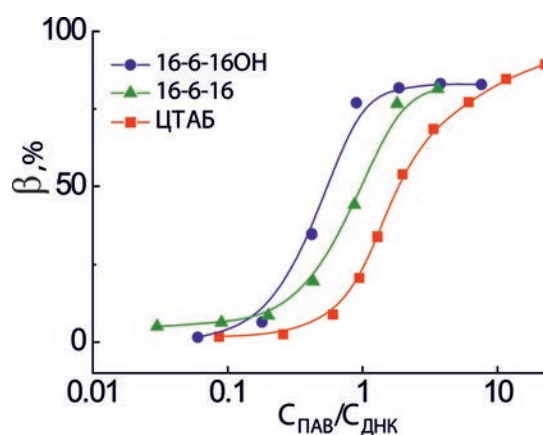


Рис. 5. Зависимость степени связывания ПАВ 16-6-16ОН, 16-6-16 и ЦТАБ с ДНК от соотношения компонентов при 25°C .

ПАВ/ДНК <1 , что подтверждает возможность использования синтезированных ПАВ в качестве трансфицирующих агентов для доставки репортерной генетической конструкции рTurboGFP-Bi-Brst в клетки эукариот.

Эффективность трансфекции опухолевых клеток репортерной генетической конструкцией. Для доставки репортерной генетической конструкции рTurboGFP-Bi-Brst в опухолевые клетки A549 использовали геминальные ПАВ и коммерческий реагент Липофектамин 3000. Первоначально подбирали условия для эффективной трансфекции клеток A549 Липофектамином 3000, варьируя соотношение трансфицирующего агента и ДНК, количество нуклеиновой кислоты и время культивирования. В ходе работы были исследованы стандартные варианты соотношения ДНК и Липофектамина 3000 – 1 : 1, 1 : 3 и 1 : 5. Количество ДНК в лунке составляло 200 нг. Известно, что увеличение коли-

чества ДНК до определенного предела увеличивает эффективность трансфекции [35], в связи с этим нами был также проанализирован вариант доставки трансгена в количестве 500 нг/лунку и соотношении Липофектамина 3000 и ДНК 1 : 1. Клетки выращивали в течение 72 ч, оценивая эффективность трансфекции каждые 24 ч. Качественный анализ эффективности проведенной трансфекции оценивали по интенсивности флуоресценции репортерного белка TurboGFP.

Методом флуоресцентной микроскопии было показано, что максимальный уровень интенсивности флуоресценции репортерного белка в клетках A549 наблюдался на 48 ч инкубации после проведенной трансфекции (рис. 6). При этом наиболее эффективным вариантом для доставки трансгена было соотношение ДНК/Липофектамин 3000 и ДНК 1 : 3 при количестве ДНК 200 нг/лунку (рис. 6).

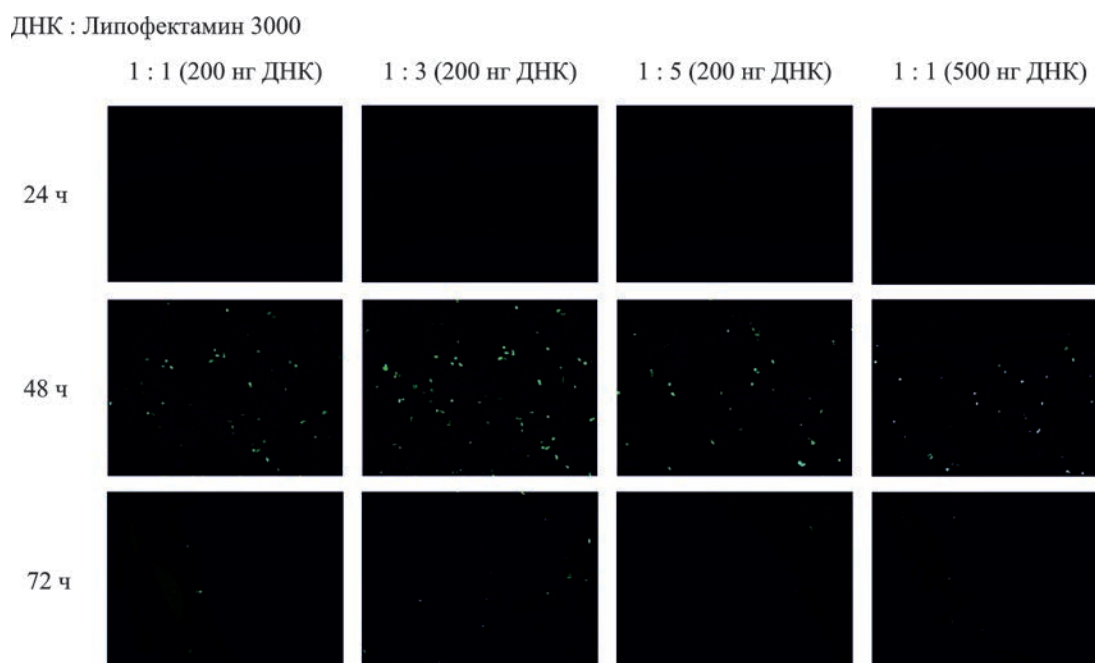


Рис. 6. Оценка эффективности трансфекции Липофектамином 3000 клеток A549 методом флуоресцентной микроскопии с увеличением 100 $\times$.

Для количественной оценки эффективности трансфекции клеток A549 использовали метод проточной цитофлуорометрии, с помощью которого можно оценить количество TurboGFP-позитивных клеток в популяции. В ходе анализа было показано, что доля клеток, экспрессирующих ген флуоресцентного белка TurboGFP, составляет 1%. Окрашивание клеток меропонином 540 позволила оценить количество апоптотических клеток в популяции. Показано, что среди трансфицированных клеток ~25% находится в апоптозе, что указывает на легкую степень токсичности Липофектамина 3000.

В экспериментах с комплексами ДНК–ПАВ клетки A549 трансфицировали комплексом ДНК–ПАВ в соотношении 1 : 3; 1 : 5 и 1 : 7 (для ПАВ 16-6-16ОН и 16-6-16) и 1 : 7; 1 : 10 и 1 : 15 (для ПАВ ЦТАБ) и инкубировали в течение 48 ч. Показано, что трансфекция клеток A549 наиболее эффективно проходила с использованием ПАВ 16-6-16ОН при соотношении ДНК/ПАВ 1 : 10, при котором количество клеток в популяции, экспрессирующих

ген зеленого флуоресцентного белка, составило 3% (табл. 1). Однако данное количество ПАВ значительно снижало жизнеспособность клеток A549: количество апоптотирующих клеток составило 19.4% (табл. 1). При обработке клеток ПАВ 16-6-16 эффективность трансфекции варьировала в диапазоне 0.1–0.6%, при этом цитотоксичность ПАВ при наиболее эффективном варианте трансфекции составила 28.5%. ПАВ ЦТАБ оказался наименее эффективным: количество трансфицированных клеток для него составило всего 0.1–0.2% в популяции (табл. 1), при этом с увеличением количества ПАВ резко возрастала его цитотоксичность. Все данные были получены при культивировании клеток в течение 24 ч, поскольку после 48 ч флуоресценция TurboGFP не детектировалась.

Структурные формулы исследованных катионных ПАВ представлены на рис. 7.

Таким образом, среди исследованных трансфицирующих агентов наиболее эффективным для доставки репортерной генетической конструкции

Таблица 1. Цитофлуорометрический анализ клеток, трансфицированных геминальными ПАВ (16-6-16ОН и 16-6-16) и ЦТАБ

Клетки, %*	ДНК/16-6-16ОН			ДНК/16-6-16			ДНК/ЦТАБ		
	1 : 3	1 : 7	1 : 10	1 : 3	1 : 7	1 : 10	1 : 7	1 : 10	1 : 15
Трансфицированные	2.9	1.0	3.0	0.1	0.4	0.6	0.2	0.1	0.1
Апоптотические	8.7	10.1	19.4	8.4	9.1	28.5	5.0	44.0	75.0

* За 100% принято общее количество клеток в популяции.

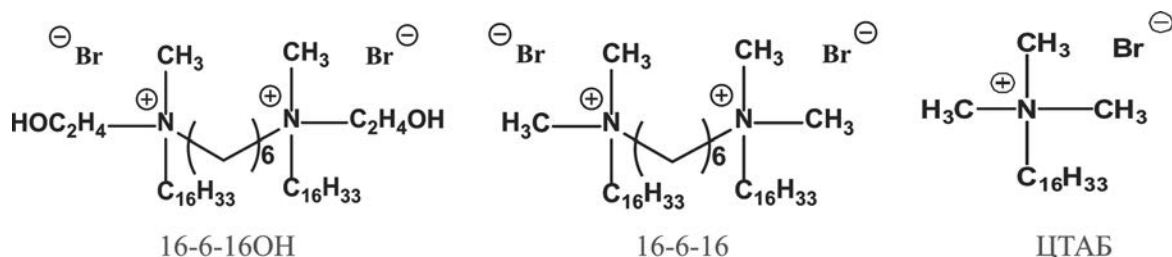


Рис. 7. Структурные формулы исследованных катионных ПАВ.

на основе гена биназы оказалось ПАВ 16-6-16ОН. В соотношении ДНК/ПАВ 1 : 3 эффективность трансфекции составила 2.9% при наименьшей цитотоксичности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Плазмиды и клетки. В работе использовали плазмиду pML163, несущую полноразмерные гены биназы (GenBank: X15545.1) и барстара (GenBank: X53697.1) [37], а также вектор pTurboGFP-C (Евроген, Россия), обеспечивающий экспрессию гена флуоресцентного белка TurboGFP в клетках млекопитающих под контролем промотора цитомегаловируса P_{CMV}IE.

Штамм *Escherichia coli* NEB 5-alpha (New England Biolabs, США) использовали для проведения генно-инженерных манипуляций.

Линии клеток аденокарциномы легких человека A549 были получены из Коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН (ИНИЦ РАН, Санкт-Петербург, Россия).

Условия культивирования. Культивирование бактерий *E. coli* NEB 5-alpha проводили при 37°C в шейкер-инкубаторе Multitron Standart (INFORS HT, Швейцария) в среде Лурия–Бертани до достижения оптической плотности 0.4–0.8. При выращивании штаммов, несущих плазмиды на основе вектора pTurboGFP-C, в среду добавляли канамицин (ПанЭко, Россия) до конечной концентрации 30 мкг/мл.

Опухолевые клетки A549 выращивали при 37°C на стандартной среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% телячьей сыворотки и пенициллина/стрептомицина (по 100 ед.) в атмосфере 5% CO₂ до достижения культурой полного покрытия подложки.

ПЦР. Генетическую кассету “биназа–барстар” амплифицировали с плазмиды pML163 с использованием праймеров F-Bin-Xho: CAGTCGCTCGAG-

GCCGTCATTAATACGTTTG-3’ и R-Bst-BamH: 5’-TAGTCGGGATCCGTTTCCATATTGTTTCATCTCC-3’ и высокоточной полимеразы Pfu-SE (Сибэнзим, Россия) на термочиклере Thermal Cycler T100 (BioRad, США). Программа ПЦР включала первичную денатурацию (95°C – 3 мин); 25 циклов, состоящих из этапов денатурации ДНК (95°C – 30 с), отжига праймеров (52°C – 30 с) и элонгации (72°C – 2 мин); финальную элонгацию (72°C – 5 мин). ПЦР-продукт из реакционной смеси очищали с помощью GeneJet PCR Purification Kit (ThermoScientific, США).

Рестрикция и лигирование. Вектор pTurboGFP-C и ПЦР-фрагмент “биназа–барстар” гидролизovali рестриктазами XhoI и BamHI в течение 3 ч. Рестрицированный ПЦР-продукт очищали от примесей с помощью набора GeneJet PCR Purification Kit (ThermoScientific, США), рестрицированный вектор – с использованием набора LumiPure DNA Gel Extraction Kit (Люмипроб, Россия). Очищенные продукты рестрикции лигировали при 4°C в течение 14–16 ч с использованием T4 ДНК-лигазы (Евроген, Россия).

Электрофорез ДНК. Электрофорез ДНК проводили в горизонтальном 1–1.5%-ном агарозном геле в Tris-ацетатном буфере (pH 8.5) при напряжении 100 В в течение 45 мин. Гель просматривали в УФ-свете при длине волны 365 нм на трансиллюминаторе TCP-20 (Vilber Lourmat, Франция).

Трансформация. Трансформацию химически компетентных клеток *E. coli* NEB 5-alpha плазмидной ДНК осуществляли методом температурного шока. Клетки высевали на агаризованную среду Лурия–Бертани с добавлением канамицина (30 мкг/мл), выращивали 16–18 ч и проводили отбор клонов.

Выделение плазмид. Из отобранных клонов выделяли плазмиды с использованием коммерческого

набора diaGene (Диаэм, Россия) согласно инструкции производителя.

Геминальные ПАВ. Геминальные ПАВ типа m-s-m (где m – длина углеводородного радикала, s – длина спейсера между головными группами) 16-6-16 и его аналог с гидроксипентильным фрагментом 16-6-16ОН были синтезированы в Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова в лаборатории высокоорганизованных сред по ранее описанной методике [38, 39]. Строение полученных соединений было подтверждено данными ИК- и ЯМР-спектроскопии [39]. Монокатионный цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ; Sigma-Aldrich, США) использовали в качестве соединения сравнения без предварительной очистки. Строение полученных соединений было подтверждено данными ИК- и ЯМР-спектроскопии.

Динамическое рассеяние света. Размер частиц и ζ -потенциал липоплексов определяли на фотонном корреляционном спектрометре динамического и электрофоретического рассеяния света ZetaSizer Nano (Malvern, Великобритания). Источником лазерного излучения служил He-Ne газовый лазер мощностью 10 мВт и длиной волны 633 нм. Угол рассеяния света составлял 173°. Гидродинамический радиус r рассчитывали из коэффициентов диффузии D по уравнению Стокса–Эйнштейна для сферических частиц:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r},$$

где k – константа Больцмана; T – абсолютная температура; η – вязкость растворителя; r – гидродинамический радиус.

ζ -Потенциал рассчитывали по уравнению Гельмгольца–Смолуховского:

$$\zeta = \frac{\mu\eta}{\varepsilon},$$

где μ – электрофоретическая подвижность частиц, η – динамическая вязкость жидкости, ε – диэлектрическая проницаемость.

Флуоресцентная спектроскопия. Степень связывания плазмиды ДНК с амфифилами определяли с помощью спектрофлуориметра F-7100 (Hitachi, Япония) с использованием специального флуоресцентного зонда-интеркалятора этидий бромида (ЭБ). В раствор ДНК с концентрацией 10 мкМ (рН 8.0), приготовленный в Tris-HCl-буфере, добавляли ЭБ с концентрацией 10 мкМ. При встраивании ЭБ в ДНК детектировался флуоресцентный сигнал. Далее в эту смесь добавляли исследуемый раствор ПАВ, и происходило тушение флуоресценции ЭБ. Эту процедуру проводили до тех пор, пока не наблюдалось полное тушение флуоресценции ЭБ. Степень связывания ПАВ–ДНК рассчитывали по формуле:

$$\beta = \frac{I_{\text{связ}} - I_{\text{набл}}}{I_{\text{связ}} - I_{\text{своб}}},$$

где β – степень связывания; $I_{\text{связ}}$ – интенсивность флуоресценции связанного ЭБ с ДНК; $I_{\text{набл}}$ – интенсивность флуоресценции при добавлении порции ПАВ; $I_{\text{своб}}$ – интенсивность флуоресценции свободного ЭБ с ДНК.

Трансфекция опухолевых клеток. Доставку генетической конструкции в опухолевые клетки A549 методом липофекции проводили с использованием катионно-липидного реагента Липофектамина 3000 (Invitrogen, США) согласно протоколу производителя. Опухолевые клетки A549 рассеивали в 96-луночные культуральные планшеты по 15 тыс. клеток на лунку и выращивали до достижения конфлюентности 70–90% около 24 ч. Через 24 ч клетки трансфицировали плазмидой pTurboGFP-Bi-Brst. Для подбора оптимальных условий трансфекции были выбраны различные варианты соотношения Липофектамина 3000 и ДНК в лунке, в расчете, что 1 мкл Липофектамина 3000 соответствует 1 мкг ДНК (табл. 2). Клетки выращивали в течение 72 ч.

При использовании ПАВ в качестве трансфицирующего агента клетки A549 рассеивали в 24-луночные планшеты по 50 тыс. клеток на лунку и выращивали

Таблица 2. Условия реакции, используемые при проведении трансфекции клеток A549 плазмидой pTurboGFP-C

Реагенты	Вариант			
	1	2	3	4
ДНК : Липофектамин 3000	1 : 1	1 : 3	1 : 5	1 : 1
ДНК в лунке, нг	200	200	200	500
Липофектамин 3000, мкл	0.2	0.6	1.0	0.5
Реагент Р3000, мкл	0.4	0.4	0.4	1.0

в течение 24 ч до достижения конfluenceности 70%. При проведении эксперимента использовали соотношение pTurboGFP-Bi-Brst и ПАВ 1 : 3, 1 : 5, 1 : 7 (для 16-6-16ОН и 16-6-16) и 1 : 7, 1 : 10, 1 : 15 (для ЦТАБ), при котором ПАВ образуют стабильные комплексы с ДНК. Клетки инкубировали 48 ч.

Эффективность трансфекции оценивали каждые 24 ч. В качестве контроля использовали клетки без добавления трансфицирующих агентов.

Флуоресцентная микроскопия. Детекцию флуоресценции репортерного белка TurboGFP в трансфицированных и нетрансфицированных клетках проводили по истечении 24, 48 и 72 ч культивирования. Клетки промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) и исследовали на флуоресцентном микроскопе Axio Imager 2.0 (Carl Zeiss, Германия) (увеличение 100×). Максимум возбуждения флуоресценции для TurboGFP составляет 482 нм, максимум эмиссии – 502 нм.

Проточная цитометрия. Трансфицированные клетки трипсинизировали с помощью 0.25%-ного раствора трипсин-ЭДТА (Invitrogen, Россия) и собирали центрифугированием при 0.4 g в течение 5 мин. Собранные клетки ресуспендировали в 100 мкл среды DMEM и добавляли к ним раствор мероцианина 540 (Sigma-Aldrich, США) с конечной концентрацией 30 мкМ для детекции клеток, находящихся в апоптозе. Клетки инкубировали в темноте при комнатной

температуре в течение 10 мин. В качестве положительного контроля использовали клетки, обработанные камптотецином (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 10 мкМ. Исследование проводили с использованием цитофлуориметра FACSCanto II (BD, США). Первичную обработку результатов проводили с помощью программы FACSDiva Software (BD, США).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной работы была оценена способность геминальных ПАВ (16-6-16 и 16-6-16ОН) выступать в качестве средств доставки в опухолевые клетки терапевтических генов. Для подбора условий трансфекции была создана репортерная генетическая система на основе вектора pTurboGFP-C, несущего ген зеленого флуоресцентного белка TurboGFP, слитого с геном биназы, и ген ингибитора бар-стара, нивелирующего токсичность РНКазы на данном этапе. Было показано, что геминальные ПАВ обладают высокой комплексообразующей способностью в отношении репортерной конструкции pTurboGFP-Bi-Brst при соотношении ПАВ/ДНК <1. Образование комплексов (липоплексов) обусловлено электростатическим взаимодействием положительно заряженных головных групп ПАВ с полианионом ДНК, сопровождается компенсацией заряда (переходом ζ-потенциала системы из области отрицательных значений в область положительных) и ком-

пактизацией макроиона. ПАВ 16-6-16ОН обеспечило наибольшую эффективность трансфекции репортерной конструкции рTurboGFP-Bi-Brst в опухолевые клетки A549 при низкой цитотоксичности, при этом эффективность коммерческого реагента Липофектамина 3000 оказалась в 3 раза ниже. Таким образом, было установлено, что геминальные ПАВ представляют перспективную и доступную альтернативу коммерческим трансфицирующим агентам.

В дальнейшем ПАВ 16-6-16ОН будет использовано в качестве средства доставки суицидальной генетической конструкции на основе гена биназы в опухолевые клетки для оценки ее цитотоксического потенциала.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность А.Р. Каюмову (д.б.н., доцент кафедры генетики Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета) за возможность проведения исследований на флуоресцентном микроскопе, а также П.В. Зеленихину (к.б.н., доцент кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета) за помощь в проведении цитофлуорометрического анализа.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства “Приоритет-2030” Казанского (Приволжского) федерального университета и поддержана Российским научным фондом (проект № 21-74-10036).

Исследование комплексообразования ДНК самфифилами методами динамического/электрофоретического рассеяния света и флуоресцентной спектроскопии выполнены Э.А. Васильевой и Л.Я. Захаровой в рамках государственного задания Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”.

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. *Maeda H., Khatami M.* // Clin. Transl. Med. 2018. V. 7. P. 11.
<https://doi.org/10.1186/s40169-018-0185-6>
2. *Aiuti A., Roncarolo M.G., Naldini L.* // EMBO Mol. Med. 2017. V. 9. P. 737–740.
<https://doi.org/10.15252/emmm.201707573>
3. *Ye J., Lei J., Fang Q., Shen Y., Xia W., Hu X., Xu Q., Yuan H., Huang J., Ni C.* // Front. Oncol. 2019. V. 9. P. 1251.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01251>
4. *Sun W., Shi Q., Zhang H., Yang K., Ke Y., Wang Y., Qiao L.* // Discov. Med. 2019. V. 27. P. 45–55.
5. *Ginn S.L., Amaya A.K., Alexander I.E., Edelstein M., Abedi M.R.* // J. Gene Med. 2018. V. 20. P. 1–16.
<https://doi.org/10.1002/jgm.3015>
6. *Cao G., He X., Sun Q., Chen S., Wan K., Xu X., Feng X., Li P., Chen B., Xiong M.* // Front. Oncol. 2020. V. 10. P. 1786.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01786>
7. *Nair J., Nair A., Veerappan S., Sen D.* // Cancer Gene Ther. 2020. V. 27. P. 116–124.
<https://doi.org/10.1038/s41417-019-0116-8>
8. *Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N.* // Bioessays. 2008. V. 30. P. 781–790.
<https://doi.org/10.1002/bies.20789>
9. *Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O.* // FEBS J. 2011. V. 278. P. 3633–3643.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08294.x>

10. *Ilinskaya O.N., Zelenikhin P.V., Petrushanko I.Y., Mitkevich V.A., Prassolov V.S., Makarov A.A.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 361. P. 1000–1005.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.07.143>
11. *Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Spirin P.V., Fedorova T.V., Kretova O.V.* // *Cell Cycle.* 2011. V. 10. P. 4090–4097.
<https://doi.org/10.4161/cc.10.23.18210>
12. *Ilinskaya O.N., Singh I., Dudkina E., Ulyanova V., Kayumov A., Barreto G.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. V. 1863. P. 1559–1567.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.04.005>
13. *Mironova N.L., Petrushanko I.Y., Patutina O.A., Sen'kova A.V., Simonenko O.V., Mitkevich V.A., Markov O.B., Zenkova M.A., Makarov A.A.* // *Cell Cycle.* 2013. V. 12. P. 2120–2131.
<https://doi.org/10.4161/cc.25164>
14. *Sung Y.K., Kim S.W.* // *Biomater. Res.* 2019. V. 23. P. 8.
<https://doi.org/10.1186/s40824-019-0156-z>
15. *Paunovska K., Loughrey D., Dahlman J.E.* // *Nat. Rev. Genetics.* 2022. V. 23. P. 265–280.
<https://doi.org/10.1038/s41576-021-00439-4>
16. *Hong S.H., Park S.J., Lee S., Cho C.S., Cho M.H.* // *Expert Opin. Drug Deliv.* 2015. V. 12. P. 977–991.
<https://doi.org/10.1517/17425247.2015.986454>
17. *Bulcha J.T., Wang Y., Ma H., Tai P.W.L., Gao G.* // *Signal Transduct. Target Ther.* 2021. V. 6. P. 53.
<https://doi.org/10.1038/s41392-021-00487-6>
18. *Zhang B., Yueying Z., Yu D.* // *Oncol. Rep.* 2017. V. 37. P. 937–944.
<https://doi.org/10.3892/or.2016.5298>
19. *Lee H.Y., Mohammed K.A., Nasreen N.* // *Am. J. Cancer Res.* 2016. V. 6. P. 1118–1134.
20. *Lee M., Chea K., Pyda R., Chua M., Dominguez I.* // *J. Biomol. Tech.* 2017. V. 28. P. 67–74.
<https://doi.org/10.7171/jbt.17-2802-003>
21. *Kashapov R., Gaynanova G., Gabdrakhmanov D., Kuznetsov D., Pavlov R., Petrov K., Zakharova L., Sinyashin O.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 6961.
<https://doi.org/10.3390/ijms21186961>
22. *Kashapov R., Ibragimova A., Pavlov R., Gabdrakhmanov D., Kashapova N., Burilova E., Zakharova L., Sinyashin O.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 7055.
<https://doi.org/10.3390/ijms22137055>
23. *Gabdrakhmanov D., Vasilieva E., Voronin M., Kuznetsova D., Valeeva F., Mirgorodskaya A., Lukashenko S., Zakharov V., Mukhitov A., Faizullin D., Salnikov V., Syakaev V., Zuev Yu., Latypov Sh., Zakharova L.* // *J. Phys. Chem.* 2020. V. 124. P. 2178–2192.
24. *Chauhan V., Singh S., Kamboj R., Mishra R., Kaur G.* // *J. Colloid Interface Sci.* 2014. V. 417. P. 385–395.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.11.059>
25. *Gonçalves R.A., Holmberg K., Lindman B.* // *J. Mol. Liq.* 2023. V. 375. P. 121335.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.121335>
26. *Gan C., Cheng R., Cai K., Wang X., Xie C., Xu T., Yuan C.* // *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 2022. V. 267. P. 120606.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120606>
27. *Massa M., Rivara M., Donofrio G., Cristofolini L., Peracchia E., Compari C., Bacciottini F., Orsi D., Franceschi V., Fisicaro E.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 3062.
<https://doi.org/10.3390/ijms23063062>
28. *Dasgupta A., Das P.K., Dias R.S., Miguel M.G., Lindman B., Jadhav V.M., Gnanamani M., Maiti S.* // *J. Phys. Chem. B.* 2007. V. 111. P. 8502–8508.
<https://doi.org/10.1021/jp068571m>
29. *Yaseen Z., Rehman S.U., Tabish M., Kabir-ud-Din* // *J. Mol. Liq.* 2014. V. 197. P. 322–327.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2014.05.013>

30. Zarogoulidis P., Darwiche K., Sakkas A., Yarmus L., Huang H., Li Q., Freitag L., Zarogoulidis K., Malecki M. // *J. Genet. Syndr. Gene Ther.* 2013. V. 4. P. 16849. <https://doi.org/10.4172/2157-7412.1000139>
31. Altanerova U., Jakubechova J., Benejova K., Priskakova P., Pesta M., Pitule P., Topolcan O., Kausitz J., Zdurienkova M., Repiska V., Altaner C. // *Int. J. Cancer.* 2019. V. 144. P. 897–908. <https://doi.org/10.1002/ijc.31792>
32. Dai L., Yu X., Huang S., Peng Y., Liu J., Chen T., Wang X., Liu Q., Zhu Y., Chen D., Li X., Ou Y., Zou Y., Pan Q., Cao K. // *Cancer Biol. Ther.* 2021. V. 22. P. 79–87. <https://doi.org/10.1080/15384047.2020.1859870>
33. Qiu Y., Peng G.L., Liu Q.C., Li F.L., Zou X.S., He J.X. // *Cancer Lett.* 2012. V. 316. P. 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.10.015>
34. Rama Ballesteros A.R., Hernández R., Perazzoli G., Cabeza L., Melguizo C., Vélez C., Prados J. // *Cancer Gene Ther.* 2020. V. 9. P. 657–668. <https://doi.org/10.1038/s41417-019-0137-3>
35. Baran Y., Ural A.U., Avcu F., Sarper M., Elçi P., Pekel A. // *Türk. J. Hematol.* 2008. V. 25. P. 172–175.
36. Wang Y.J., Shang S.H., Li C.Z. // *J. Dent. Sci.* 2015. V. 10. P. 414–422.
37. Znamenskaya L.V., Vershinina O.A., Vershinina V.I., Leshchinskaya I.B., Hartley R.W. // *FEMS Microb. Lett.* 1999. V. 173. P. 217–222. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13505.x>
38. Mirgorodskaya A.B., Bogdanova L.R., Kudryavtseva L.A., Lukashenko S.S., Konovalov A.I. // *Russ. J. Gen. Chem.* 2008. V. 78. P. 163–170. <https://doi.org/10.1134/S1070363208020023>
39. Zakharova L.Ya., Gabdrakhmanov D.R., Ibragimova A.R., Vasilieva E.A., Nizameev I.R., Kadirov M.K., Ermakova E.A., Gogoleva N.E., Faizullin D.A., Pokrovsky A.G., Korobeynikov V.A., Cheresiz S.V., Zuev Yu.F. // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2016. V. 140. P. 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.12.045>

Surfactants As a Means of Delivering a Reporter Genetic Construct Based on Binase Suicide Gene to Tumor Cells

E. V. Dudkina*, E. A. Vasilieva**, V. V. Ulyanova*,[#], L. Ya. Zakharova**, and O. N. Ilinskaya*

[#] Phone: +7 (843) 233-78-65; e-mail: ulyanova_vera@mail.ru

* Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University,
ul. Kremlevskaya 18, Kazan 420008 Russia

** Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences,
ul. Akad. Arbuzova 8, Kazan, 420088 Russia

Among modern gene therapy methods for combating oncology, suicidal gene therapy based on the delivery of a cytotoxic agent to target cells is of particular importance and promise. As one of such genes, the gene for ribonuclease of *Bacillus pumilus* 7P, binase, can be considered; the enzyme has a high antitumor potential and low immunogenicity. In addition to the choice of a transgene, another factor influencing the effectiveness of gene therapy is the method of delivering the nucleic acid to target cells. Surfactants have high functional activity and are promising means of delivering therapeutic nucleic acids. The aim of this work was to evaluate the possibility of using geminal surfactants as a means of delivering a genetic construct based on the cytotoxic binase gene into tumor cells. To optimize the transfection conditions, a reporter genetic construct carrying the binase gene fused to the gene for the green fluorescent protein TurboGFP was created, which made it possible to evaluate the delivery efficiency by the fluorescence intensity. To eliminate the toxic effect of binase on recipient cells, the RNase inhibitor gene, barstar, was introduced into the genetic construct. A high complexing ability of geminal surfactants in relation to the reporter system was shown by methods of dynamic light scattering and fluorescence spectroscopy. For surfactant 16-6-16OH, the highest transfecting activity together with a low level of cytotoxicity was found. Thus, the study proved the possibility of using geminal surfactants for the delivery of therapeutic nucleic acids to target cells.

Keywords: *transfection, green fluorescent protein, ribonuclease, binase, cytotoxicity, antitumor activity, geminal surfactants*



УДК 577.152.1:616.36-008.64:616.379-008.64

УЧАСТИЕ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА CREB1 В РЕГУЛЯЦИИ РАБОТЫ ГЕНА *Mdh2*, КОДИРУЮЩЕГО МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗУ, В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ

© 2024 г. А. Т. Епринцев^{*,#}, К. Р. Романенко^{*}, Н. В. Селиванова^{*}

^{*} ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Россия, 394018 Воронеж, Университетская пл., 1

Поступила в редакцию 08.03.2023 г.

После доработки 12.06.2023 г.

Принята к публикации 13.06.2023 г.

Цель данного исследования – изучение роли транскрипционного фактора CREB1 в регуляции экспрессии гена, кодирующего митохондриальную форму малатдегидрогеназы (MDH, КФ 1.1.1.37), в печени крыс при экспериментальном аллоксановом диабете. Показано увеличение скорости работы NAD-зависимой малатдегидрогеназы в клетках печени крыс при развитии экспериментального диабета, связанное с активацией работы кодирующих данный фермент генов *Mdh1* и *Mdh2*. Анализ промоторов этих генов показал, что только в составе гена *Mdh2* присутствует специфический сайт связывания с транскрипционным фактором CREB1. Выяснено, что в печени крыс с диабетом наблюдается увеличение скорости экспрессии гена, кодирующего данный транскрипционный фактор, что коррелирует с транскрипцией гена *Mdh2*. Таким образом, полученные нами данные подтверждают возможность положительной регуляции скорости работы гена *Mdh2*, кодирующего митохондриальную форму малатдегидрогеназы, транскрипционным фактором CREB1.

Ключевые слова: диабет, малатдегидрогеназа, CREB1, транскрипционный фактор, регуляция, промотор

DOI: 10.31857/S0132342324010034, **EDN:** OWSFEY

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет – распространенное заболевание, количество пациентов с таким диагнозом на сегодняшний день превышает 450 млн человек во всем мире [1]. При данной патологии наблюдается углеводное голо-

дание клеток и тканей, что в свою очередь приводит к активации глюконеогенеза [2]. Наиболее активно глюконеогенетические процессы протекают в печени, которая участвует в поддержании гомеостаза глюкозы и является главным метаболически активным органом.

Сокращения: MDH – малатдегидрогеназа; CRE – cAMP-чувствительный элемент (cAMP response element); CREB – транскрипционный фактор, белок, связывающий cAMP-чувствительный элемент (cAMP response element-binding protein); ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени.

[#] Автор для связи: (эл. почта: bc366@bio.vsu.ru).

В процессах адаптации особое место занимает малатдегидрогеназная ферментативная система. Малатдегидрогеназа (MDH, КФ 1.1.1.37) – полифункциональный ферментный комплекс, катализирующий обратимое превращение малата в оксалоацетат с использованием NADH в качестве кофермента [3]. Роль MDH заключается в осуществлении протекания энергетического и конструктивного обмена. В геноме крыс NAD-зависимая MDH кодируется двумя генами: *Mdh1* и *Mdh2*.

В настоящее время регуляция экспрессии MDH освещена недостаточно и нуждается в дальнейшем изучении. Хотя имеются данные, что транскрипционный фактор MdWRKY126 может связываться с промотором гена *MdMDH5*, ответственного за синтез цитоплазматической формы MDH яблони, увеличивая скорость работы гена, кодирующего исследуемый фермент [4]. Ген *Mdh1* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ингибируется глюкозой, причем его регуляция может осуществляться не непосредственно белком-репрессором Mig1p, а опосредованно, т.к. Mig1p регулирует транскрипцию HAP4, активатора этих генов [5]. Shi et al. показали [6], что окислительный стресс может повышать активность гена *Mdh2* митохондриальной малатдегидрогеназы через микроРНК miR-743a при болезни Альцгеймера.

Большое количество процессов ферментативной активности требует многоуровневой регуляции. Один из механизмов подобной регуляции – контроль над экспрессией генов, осуществляемый при помощи транскрипционных факторов и вторичных мессенджеров [7]. Один из таких транскрипционных факторов – CREB (cAMP-response element-binding protein). Этот белок имеет структуру “спираль–петля–спираль”, содержит ДНК-связывающий мотив “лейциновая молния” [8]. CREB был обнаружен благодаря его способности связываться со специфической последовательностью CRE (cAMP response element – TGACGTCA) в промоторе гена нейропептида соматостатина [9]. Известно, что учас-

ток связывания CREB–CRE присутствует в промоторах ключевых ферментов глюконеогенеза: глюкозо-6-фосфатазы, пируваткарбоксилазы и фосфоенолпируваткарбоксикиназы [8]. Участие фактора CREB в регуляции глюконеогенеза было продемонстрировано с использованием трансгенных мышей, экспрессирующих в печени alb-ACREB – селективный ингибитор CREB. Эти животные характеризовались сниженным уровнем глюкозы в крови и подавленной экспрессией генов глюконеогенеза [10]. Кроме того, подавление экспрессии CREB при помощи малых интерферирующих РНК также приводило к снижению уровня глюкозы в крови в моделях *in vivo*, доказывая важную роль этого фактора в физиологическом контроле процесса глюконеогенеза [11]. В литературе имеются сведения, что данный фактор становится наиболее активным в период голодания, и его действие проявляется в широком спектре тканей [8]. Кроме того, Young-Sil Yoon et al. показали, что питание с высоким содержанием жиров активирует путь CREB/CRTC в адипоцитах за счет снижения экспрессии SIK2, Ser/Thr-киназы, которая фосфорилирует и ингибирует cAMP-зависимые транскрипционные коактиваторы [12]. Однако информации о работе данного транскрипционного фактора в условиях сахарного диабета I типа недостаточно, и она довольно разрозненная.

В связи с этим целью данной работы было изучение роли транскрипционного фактора CREB1 в регуляции экспрессии гена митохондриальной малатдегидрогеназы в печени крыс линии Wistar при экспериментальном аллоксановом диабете.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперимент проводили на самцах крыс линии Wistar, которых перед началом эксперимента произвольным образом разделили на две группы ($n = 8$). В группе “Диабет” для индукции патологии животным однократно внутрибрюшинно вводили 5%-ный

раствор аллоксана (доза 150 мг/кг массы тела), предварительно растворенный в 0.9%-ном цитрате натрия. Крысам контрольной группы (Норма) вместо аллоксана осуществляли инъекцию 0.9%-ного цитрата натрия.

К началу постановки эксперимента уровень глюкозы у всех крыс находился в пределах нормы и в среднем составлял 5.1 ± 0.12 ммоль/л. Введение аллоксана вызывало стойкое развитие экспериментального диабета у крыс, о чем свидетельствует повышение уровня глюкозы до 13.5 ± 0.22 ммоль/л на третьи сутки исследования (рис. 1). У группы контрольных здоровых животных уровень сахара в крови колебался в пределах нормы на протяжении всего времени эксперимента и в среднем составлял 4.8–5.4 ммоль/л. Известно, что аллоксан вызывает разрушение клеток поджелудочной железы, способствуя снижению синтеза инсулина, приводя, таким образом, к развитию сахарного диабета I типа [13].

Значения общей активности MDH в печени здоровых крыс и животных с аллоксановым диабетом показаны в табл. 1. Из приведенных данных видно, что в норме MDH представлена только в цитоплазме и митохондриях, тогда как при развитии диабета данный фермент проявляет свою активность еще и в пероксисомальной фракции. Кроме того, анализ полученных данных показал, что

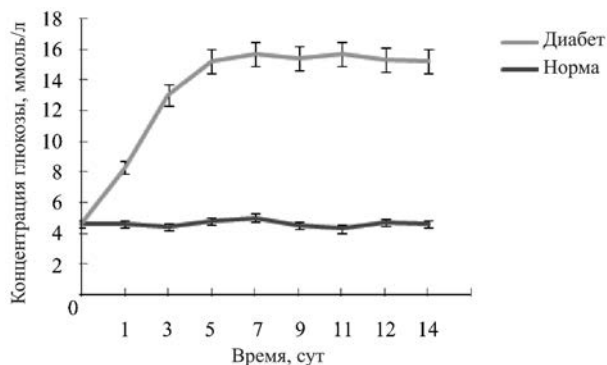


Рис. 1. Концентрация глюкозы в крови здоровых крыс (Норма) и животных с аллоксановым диабетом (Диабет), $p < 0.007$.

митохондриальная форма MDH увеличивает скорость своего функционирования в 3, а цитоплазматическая – в 2 раза. Для проверки достоверности полученных результатов был оценен уровень перекрестного загрязнения. Он составил 3–5%, что считается допустимым при интерпретации данных.

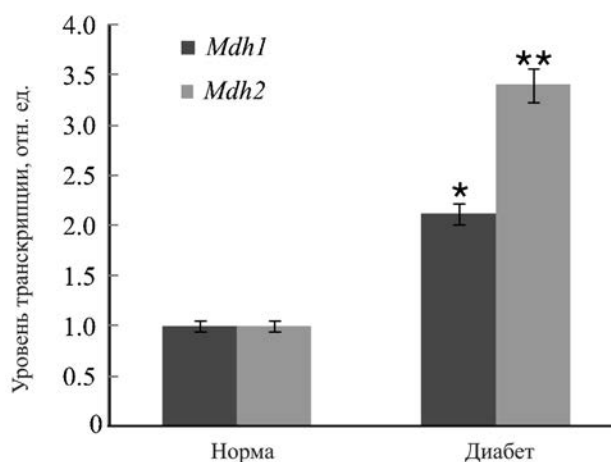
Вероятно, увеличение общей активности MDH в печени крыс с экспериментальным диабетом свидетельствует об активации метаболических путей, в функционировании которых принимает участие данный фермент, однако причины роста активности не до конца понятны и требуют более детального изучения. Одной из причин такого увеличения скорости функционирования может быть повышение экспрессии генов, кодирующих MDH. Результаты исследования ПЦР-РВ приведены на рис. 2. Видно, что в печени крыс при диабете относительный уровень транскрипции исследуемых генов возрастал по сравнению с данным показателем в контрольной группе крыс. Увеличение скорости работы генов, кодирующих MDH у крыс с аллоксановым диабетом, более чем в 2 раза по сравнению с контрольной группой коррелирует с данными о росте активности данного фермента ($r_s = 0.9$). Вероятно, этот факт может быть связан с интенсификацией работы цикла Кребса для синтеза энергетических эквивалентов и интермедиатов в связи с необходимостью адаптации животных к развивающейся патологии. Интересно, что ранее было показано увеличение активности и уровня экспрессии генов, кодирующих сукцинатдегидрогеназу [14].

Одним из механизмов, способствующих изменению скорости транскрипции генов малатдегидрогеназы у крыс при диабете, может выступать CREB1. Известно, что в промоторной части генов, регулируемых данным транскрипционным фактором, присутствует CRE (cAMP response element) – последовательность ДНК, с которой связывается CREB1 (5'-TGACGTCА-3'). Нами были проанализированы промоторы генов крыс, кодирующих

Таблица 1. Общая активность малатдегидрогеназы в различных компартментах клеток печени здоровых крыс (Норма) и животных с аллоксановым диабетом (Диабет)

Показатель	Норма	Диабет
Активность МДН в цитоплазме, ед./г сырой массы	0.98 (0.91–1.1)	1.97 (1.91–2.1)*
Активность МДН в митохондриях, ед./г сырой массы	1.04 (1.01–1.35)	3.15 (3.08–3.42)**
Активность МДН в пероксисомах, ед./г сырой массы	–	0.77 (0.69–0.86)***

* $p \leq 0.004$; ** $p \leq 0.006$; *** $p \leq 0.009$.

**Рис. 2.** Относительный уровень транскриптов генов *Mdh1* и *Mdh2* из печени крыс контрольной группы (Норма) и животных с аллоксановым диабетом (Диабет). При оценке относительного уровня транскрипции исследуемых генов во всех группах исследуемых животных были выявлены статистически значимые различия (* $p < 0.009$; ** $p \leq 0.001$).

изоферменты малатдегидрогеназы. Исследование структуры данных генов выявило наличие одного специфического сайта связывания CREB1 в промоторе гена *Mdh2* (рис. 3), что может обуславливать его регуляцию за счет данного транскрипционного фактора. Наличие такого участка связывания в составе исследуемого гена указывает на возможность регуляции его работы на уровне изменения сродства РНК-полимеразы к промотору данного гена. Интересен тот факт, что регуляторная область гена *Mdh1* подобной последовательности не содержит.

С целью выявления участия транскрипционных факторов семейства CREB в регуляции скорости экспрессии гена *Mdh2* была проведена количественная оценка уровня транскрипта гена *Creb1* в печени здоровых крыс и животных с патологией методом ПЦР-РВ. Результаты исследования ПЦР-РВ приведены на рис. 4. Показано, что в печени крыс при диабете концентрация транскрипта исследуемого гена возросла более чем в 7 раз по сравнению с данным показателем в контрольной группе крыс.

Полученные результаты по скорости транскрипции фактора CREB1 позволяют сделать вывод о том,

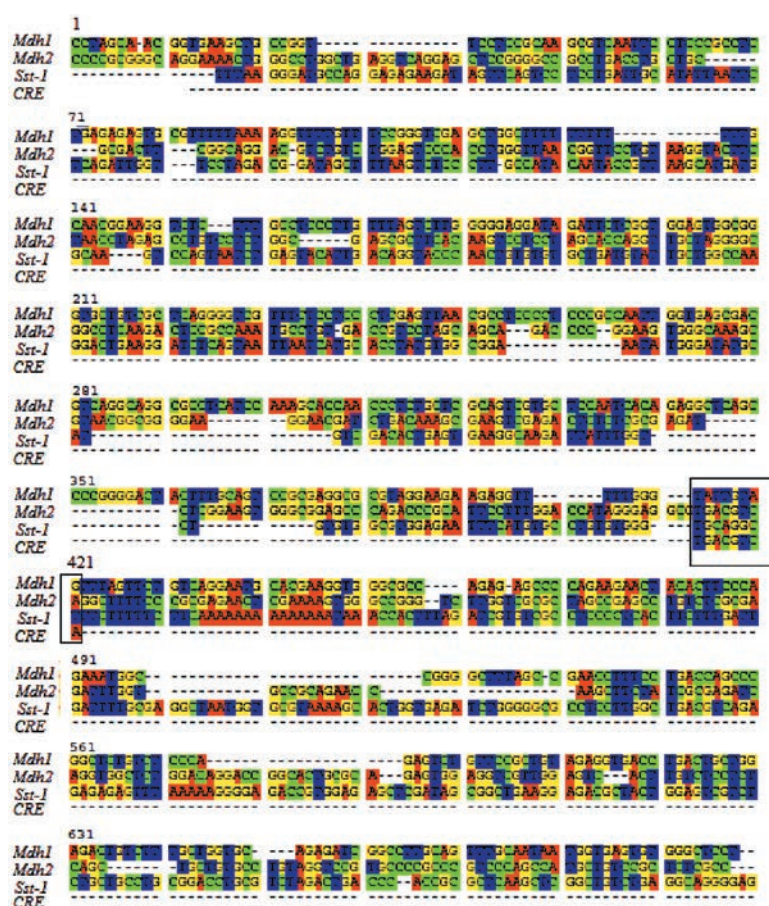


Рис. 3. Выравнивание промоторов генов *Mdh1*, *Mdh2* и *Sst1* (ген соматотропина, находящийся под регуляцией транскрипционного фактора CREB1) крысы. Прямоугольником выделен сайт CRE.

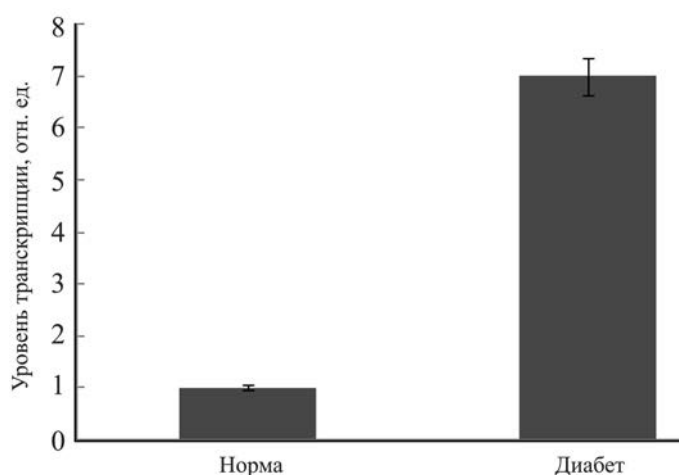


Рис. 4. Относительный уровень транскриптов гена *Creb1* из печени крыс контрольной группы (Норма) и животных с аллоксановым диабетом (Диабет). При оценке относительного уровня транскрипции гена *Creb1* в опытной и контрольной группах животных были выявлены статистически значимые различия ($p < 0.001$).

что в условиях аллоксанового диабета наблюдается увеличение содержания транскрипционного фактора CREB1, что имеет определенную корреляцию с содержанием мРНК гена *Mdh2* ($r_s = 1$). Похожие результаты были получены в исследовании Ling Qi et al., которые показали, что при ожирении в адипоцитах наблюдается активация белка CREB, приводящая к ингибированию работы генов, ответственных за синтез инсулина и белка-транспортера Glut4, приводя таким образом к развитию инсулинорезистентности и, как следствие, к сахарному диабету II типа [15].

Инициация транскрипции – важнейший этап реализации генетической информации. В настоящее время наиболее изучена инициация транскрипции с промоторов, содержащих ТАТА-бокс. На таких промоторах инициация транскрипции начинается с распознавания и связывания ТВР (TATA-binding protein) непосредственно с ТАТА-боксом в коровой части промотора. Однако последовательности ТАТА-бокса обнаруживаются лишь в незначительной части эукариотических промоторов [16]. Так, на рис. 5 показана структура промоторов генов *Mdh1* и *Mdh2* крысы с отмеченными регуляторными

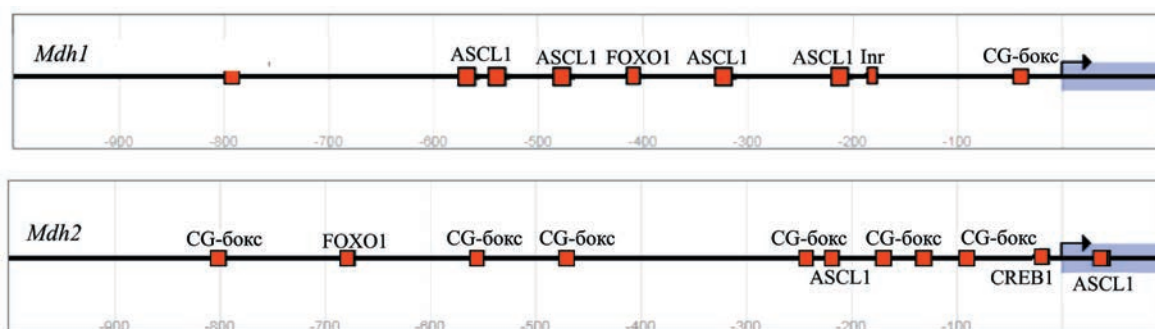


Рис. 5. Структура промоторов генов *Mdh1* (Gene ID: 24551) и *Mdh2* (Gene ID: 81829) в геноме крысы. Inr – инициатор и CG-бокс (регуляторные элементы); показаны сайты посадки для транскрипционных факторов: ASCL1 (achaete-scute complex-like), FOXO1 и CREB1.

элементами и сайтами посадки транскрипционных факторов (в т.ч. CREB1). Видно, что оба гена не содержат ТАТА-бокса. Изучение альтернативных путей инициации и поддержания транскрипции позволит расширить понимание устройства промоторов эукариот, что, в свою очередь, имеет большое фундаментальное и прикладное значение.

Таким образом, регуляция скорости работы гена *Mdh2*, а следовательно, и функционирования митохондриальной формы малатдегидрогеназы, в печени

крыс при аллоксановом диабете осуществляется через транскрипционный фактор CREB1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объект исследования. Объектом исследования выступали самцы белых лабораторных крыс линии Wistar массой 150–200 г ($n = 8$), выведенные в биопитомнике “СМК СТЕЗАР” (г. Владимир, Россия).

Экспериментальная модель. Для индукции экспериментального сахарного диабета однократно вводили 5%-ный раствор аллоксана (Диаэм, Россия),

предварительно растворенный в 0.9%-ном цитрате натрия. Доза составляла 150 мг на 1 кг живой массы. Инъекции производили внутривенно. Животным контрольной группы вместо аллоксана вводили раствор 0.9%-ного цитрата натрия.

Животных содержали в условиях вивария при стандартной температуре с естественным освещением и свободным доступом в течение дня к воде и корму [17].

Измерение уровня глюкозы в крови было необходимо для доказательства индукции сахарного диабета и отслеживания динамики уровня глюкозы в ходе эксперимента. Определение уровня глюкозы в крови проводили при помощи глюкометра Сателлит-Плюс (ООО «Компания «ЭЛТА», Россия). Забор крови осуществляли из хвостовой вены в утренние часы натощак.

Спустя 14 сут после моделирования аллоксанового диабета наркотизированных животных подвергали декапитации с целью анализа биоматериала (печени). Для эвтаназии использовали смесь ксилазина (10 мг/кг, 2%-ный раствор для инъекций; ALFASAN, Нидерланды) и кетамина (90 мг/кг, 5%-ный раствор для инъекций; ПАО «Фармак», Украина) интраперитонеально. После декапитации печень извлекали, трехкратно промывали ледяным физиологическим раствором и гомогенизировали в 10-кратном объеме среды для выделения, содержащей 1 мМ ЭДТА, 2 мМ KCl, 3 мМ ДТТ, 0.35 М сахарозу, 50 мМ Tris-HCl-буфер (pH 7.8). После этого проводили центрифугирование в течение 5 мин при 3000 *g* и температуре 4°C. Далее отбирали супернатант (гомогенат), который в дальнейшем использовали при измерении активности фермента.

Определение активности малатдегидрогеназы. Активность MDH измеряли спектрофотометрически на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ-Спектр, Россия) при 340 нм по изменению оптической плотности реакционных смесей, связанной с расходом NADH. Среда содержала 50 мМ Tris-HCl-буфер

(pH 7.5), 1.5 мМ оксалоацетат, 0.15 мМ NADH, 5 мМ MgCl₂, 4 мМ ДТТ. За единицу активности MDH принимали количество фермента, необходимого для превращения 1 мкмоль субстрата в 1 мин при 25°C. Активность ферментов выражали в виде общей активности (ед./г сырой массы).

Оценка перекрестного загрязнения. Перекрестное загрязнение оценивали с помощью маркерных ферментов цитоплазмы (алкогольдегидрогеназа [18]), митохондрий (сукцинатдегидрогеназа [14]) и пероксисом (каталаза [19]) по опубликованным методикам. Для расчета процента загрязнения выделенных фракций измеряли активность маркерных ферментов в гомогенате печени и принимали полученные значения за 100%. Далее производили анализ активности данных энзимов в каждой из выделенных фракций и пересчитывали процент от активности в гомогенате.

Анализ промоторов. Нуклеотидные последовательности промоторной области гена, кодирующего MDH крысы, были взяты из базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=malate+dehydrogenase+rat>) и проанализированы на наличие сайта связывания CREB1. В качестве референсного был взят ген *Sst-1* (ген соматотропина, находящийся под регуляцией транскрипционного фактора CREB1). Выравнивание последовательностей промоторов генов *Mdh1*, *Mdh2* и *Sst-1* проводили в программе seaview3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview3.html>; см. рис. 3).

Выделение РНК. Суммарную клеточную РНК выделяли из ткани печени методом фенол-хлороформной экстракции с использованием в качестве осадителя LiCl [20], с последующей обработкой ДНКазой 1 (Диаэм, Россия) согласно инструкции производителя.

Анализ качества РНК. Для анализа качества выделенной РНК проводили аналитический электрофорез в 1%-ном агарозном геле (Helicon, Россия). В качестве буфера использовали 50× TAE-буфер,

краситель для визуализации нуклеиновых кислот – бромистый этидий. Гелевую пластинку помещали в электрофоретическую камеру VE-10-v2 (Хеликон, Россия), заполненную 1× ТАЕ-буфером (pH 8.5). Пробы вносили в каждую ячейку в объеме 5 мкл. Электрофорез проводили в течение 40 мин при напряжении 70 В, после чего гель фотографировали в проходящем УФ-свете.

Обратная транскрипция. Обратную транскрипцию мРНК проводили с использованием обратной транскриптазы М-MuLV и праймеров олиго(dT) (СибЭнзим, Россия) для синтеза первой цепи кДНК согласно инструкции производителя. Для проведения реакции брали 2 мкг выделенной суммарной клеточной РНК в соответствии с рекомендацией производителя.

Подбор геноспецифических праймеров. Специфические праймеры подбирали с использованием нуклеотидных последовательностей генов *Mdh1* (Gene ID: 24551), *Mdh2* (Gene ID: 81829) и *Creb1* (Gene ID: 81646) крысы, взятых из международной базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genes/>), с помощью программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Праймеры к гену *Mdh1*: прямой – 5'-gctctactcgttcctcg-3'; обратный – 5'-acgactgtgtatcatgcgg-3'; к гену *Mdh2*: прямой – 5'-accccaaggttgacttcc-3'; обратный – 5'-ttcct-tccattcatggcgt-3'; к гену *Creb1*: прямой – 5'-ttcagtc-tccacaagtccaac-3'; обратный – 5'-gctgaagtctct-tctctgattt-3'; к гену *Eef1a1*: прямой – 5'-ttgagtgaag-ctctgcctgg-3'; обратный – 5'-cgaccaagtggaggtagtc-3'.

ПЦР в реальном времени. ПЦР с геноспецифическими праймерами проводили с помощью набора реактивов AmpliSence (Хеликон, Россия) согласно инструкции производителя на приборе DNA Engine Thermal Cycler Chromo 4 (Bio-Rad, США), используя в качестве красителя SYBR Green (Диаэм, Россия). Параметры амплификации: предварительная денатурация: 95°C – 5 мин; затем 35 циклов: 95°C – 20 с, 58°C – 30 с, 72°C – 40 с (детекция); финальная

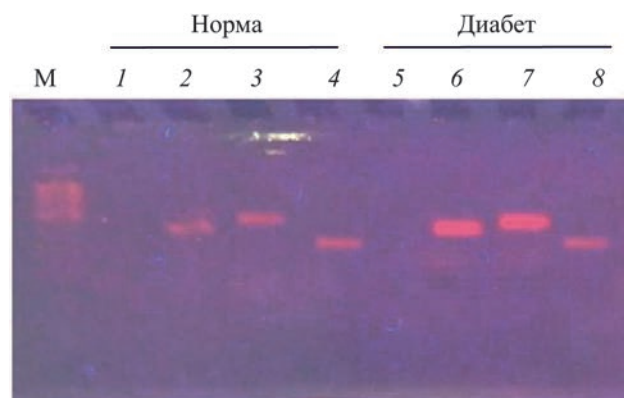


Рис. 6. Электрофореграмма ПЦР-продуктов после ПЦР в реальном времени. М – маркеры длин ДНК 250–1000 п.н. (Диаэм, Россия), 1 и 5 – отрицательный контроль, 2 и 6 – продукты гена *Mdh1*, 3 и 7 – продукты гена *Mdh2*, 4 и 8 – продукты гена *Eef1a1*. Норма – группа контрольных крыс, Диабет – животные с аллоксановым диабетом.

элонгация: 72°C – 10 мин [21]. Количество кДНК контролировали с использованием параллельной амплификации гена *Eef1a1* (Gene ID: 171361), кодирующего в геноме крысы фактор элонгации EF-1α, и разработанных нами геноспецифических праймеров. Отрицательным контролем служила суммарная РНК, не подвергшаяся обратной транскрипции (рис. 6). Относительный уровень экспрессии исследуемых генов определяли при помощи метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [22] и программного обеспечения Opticon Monitor™ Software (Bio-Rad, США).

Для проверки достоверности полученных нами данных все опыты и измерения проводили в четырехкратных биологических и пятикратных аналитических повторностях. Расчеты проводили в программе Microsoft Office Excel 2007, а их дальнейший анализ – в программе StatTech v. 1.2.0 (ООО “Статтех”, Россия). Проверку нормальности распределения осуществляли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Количественные показатели, имеющие нормальное распределение, описывали с помощью средних арифметических величин (М) и стандартных отклонений (SD), границ 95%-ного доверительного интервала (95% ДИ). В случае ненормального распределения изучаемых количественных признаков использовали

непараметрический критерий Манна–Уитни, данные представляли в виде медианы и интерквартильного размаха Me (Q_1 – Q_3). Для выявления взаимосвязей между показателями использовали корреляционный метод с применением коэффициента корреляции Пирсона. Все данные, представленные в данной работе, статистически достоверны ($p < 0.05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе была изучена роль транскрипционного фактора CREB1 в регуляции экспрессии гена *Mdh2*, кодирующего митохондриальную малатдегидрогеназу, в печени крыс при экспериментальном аллоксановом диабете. Выявлено увеличение активности и появление дополнительной пероксисомальной формы малатдегидрогеназы, что, вероятно, связано с увеличением скорости транскрипции кодирующих ее генов. Кроме того, полученные данные позволяют сделать предположение о том, что регуляция скорости работы гена *Mdh2* в печени крыс при аллоксановом диабете осуществляется через транскрипционный фактор CREB1, который положительно регулирует экспрессию исследуемого гена, взаимодействуя со специфическим CRE-участком в составе промотора гена *Mdh2*.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с крысами проводили в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.). Процедуры эксперимента соответствовали требованиям международных правил гуманного отношения к животным, отраженных в санитарных правилах по отбору и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

Протокол исследования одобрен Этическим комитетом по экспертизе биомедицинских исследований в ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» (протокол № 42-04 от 05.09.2022).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cho N.H., Shaw J.E., Karuranga S., Huang Y., da Rocha Fernandes J.D., Ohlrogge A.W., Malanda B. // *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2018. V. 138. P. 271–281.
<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.02.023>
2. Jiang G., Zhang B.B. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003. V. 284. P. E671–E678.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00492.2002>
3. Priestley J.R.C., Pace L.M., Sen K., Aggarwal A., Alves C.A.P.F., Campbell I.M., Cuddapah S.R., Engelhardt N.M., Eskandar M., Garcia P.C.J., Gropman A., Helbig I., Hong X., Gowda V.K., Lusk L., Trapane P., Srinivasan V.M., Suwannarat P., Ganetzky R.D. // *Mol. Genet. Metab. Rep.* 2022. V. 33. P. 100931.
<https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2022.100931>
4. Zhang L., Ma B., Wang Ch., Chen X., Ruan Y.-L., Yuan Y., Ma F., Li M. // *Plant Physiol.* 2022. V. 188. P. 2059–2072.
<https://doi.org/10.1093/plphys/kiac023>
5. Анастасина М.С., Самбук Е.В. // *Вестник Санкт-Петербургского ун-та.* 2009. Сер. 3. Вып. 2. С. 39–52.
6. Shi Q., Gibson G.E. // *J. Neurochem.* 2011. V. 118. P. 440–448.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07333.x>
7. Кулебякин К.Ю., Акопян Ж.А., Кочегура Т.Н., Пеньков Д.Н. // *Сахарный диабет.* 2016. Т. 19. С. 190–198.
<https://doi.org/10.14341/DM2003436-40>
8. Schmoll D., Wasner C., Hinds C.J., Allan B.B., Walther R., Burchel A. // *Biochem. J.* 1999. V. 338. P. 457–463.
9. Gonzalez G.A., Yamamoto K.K., Fischer W.H., Karr D., Menzel P., Biggs W., Vale W.W., Montminy M.R. // *Nature.* 1989. V. 337. P. 749–752.
<https://doi.org/10.1038/337749a0>

10. Herzig S., Long F., Jhala U.S., Hedrick S., Quinn R., Bauer A., Rudolph D., Schutz G., Yoon C., Puigserver P., Spiegelman B., Montminy M. // *Nature*. 2001. V. 413. P. 179–183.
<https://doi.org/10.1038/35093131>
11. Erion D.M., Ignatova I.D., Yonemitsu S., Nagai Y., Chatterjee P., Weismann D., Hsiao J.J., Zhang D., Iwasaki T., Stark R., Flannery C., Kahn M., Carmean Ch.M., Yu X.X., Murray S.F., Bhanot S., Monia B.P., Cline G.W., Samuel V.T., Shulman G.I. // *Cell Metab.* 2009. V. 10. P. 499–506.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.10.007>
12. Yoon Y.-S., Liu W., de Velde S.V., Matsumura Sh., Wiater E., Huang L., Montminy M. // *Commun. Biol.* 2021. V. 4. P. 1214.
<https://doi.org/10.1038/s42003-021-02735-5>
13. Lenzen S. // *Diabetologia*. 2008. V. 51. P. 216–226.
<https://doi.org/10.1007/s00125-007-0886-7>
14. Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Бакарев М.Ю. // *Биомед. химия*. 2022. Т. 68. С. 272–278.
<https://doi.org/10.18097/PBMC20226804272>
15. Qi L., Saberi M., Zmuda E., Wang Y., Altarejos J., Zhang X., Dentin R., Hedrick S., Bandyopadhyay G., Hai T., Olefsky J., Montminy M. // *Cell Metab.* 2009. V. 9. P. 277–286.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.01.006>
16. Smale S.T., Kadonaga J.T. // *Annu. Rev. Biochem.* 2003. V. 72. P. 449–479.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161520>
17. Ighodaro O.M., Adeosun A.M., Akinloye O.A. // *Medicina (Kaunas)*. 2017. V. 53. P. 365–374.
<https://doi.org/10.1016/j.medici.2018.02.001>
18. Jelski W., Laniewska-Dunaj M., Orywal K., Kochanowicz J., Rutkowski R., Szmitkowski M. // *Neurochem. Res.* 2014. V. 39. P. 2313–2318.
<https://doi.org/10.1007/s11064-014-1402-3>
19. Nadeem M.S., Khan J.A., Murtaza B.N., Muhammad Kh., Rauf A. // *South Asian J. Life Sci.* 2015. V. 3. P. 51–55.
<https://doi.org/10.14737/journal.sajls/2015/3.2.51.55>
20. Vennapusa A.R., Somayanda I.M., Doherty C.J., Jagadish S.V.K. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. P. 16887.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-73958-5>
21. Navarro E., Serrano-Heras G., Castaño M.J., Solera J. // *Clin. Chim. Acta*. 2015. V. 439. P. 231–250.
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017>
22. Dhanasekaran S., Doherty T.M., Kenneth J. // *J. Immunol. Methods*. 2010. V. 354. P. 34–39.
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.01.004>

Participation of the Transcription Factor CREB1 in the Regulation of the *Mdh2* Gene Encoding Malate Dehydrogenase in the Liver of Rats with Alloxan Diabetes

A. T. Eprintsev^{*, #}, K. R. Romanenko^{*}, and N. V. Selivanova^{*}

[#] E-mail: bc366@bio.vsu.ru

^{*} Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394018 Russia

The aim of the study was to study the role of transcription factor CREB1 in regulating the expression of the gene encoding the mitochondrial form of malate dehydrogenase (MDH, EC 1.1.1.37) in the liver of rats with experimental diabetes. An increase in the rate of work of NAD-dependent malate dehydrogenase in rat liver cells during the development of experimental diabetes was shown, associated with the activation of the *Mdh1* and *Mdh2* genes encoding this enzyme. The analysis of the promoters of these genes showed that only in the *Mdh2* gene there is a specific binding site with the transcription factor CREB1. It was found that in the liver of rats with pathology, there is an increase in the rate of expression of the gene encoding this transcription factor, which correlates with the expression of the *Mdh2* gene. Thus, the data obtained by us confirm the possibility of positive regulation of the rate of the *Mdh2* gene by the transcription factor CREB1.

Keywords: alloxan diabetes, malate dehydrogenase, CREB1, transcription factor, regulation, promoter



УДК 54.05:54.056:544.1:615.32

ВЫДЕЛЕНИЕ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ИЗ БАЗИДИАЛЬНОГО ГРИБА *Ganoderma lucidum*

© 2024 г. С. Б. Хайтметова*,[#], А. С. Тураев*, Г. А. Халилова*, Б. И. Мухитдинов*

* Институт биоорганической химии им. А.С. Садыкова АН РУз,
Узбекистан, 100125 Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 83

Поступила в редакцию 27.03.2023 г.

После доработки 02.05.2023 г.

Принята к публикации 03.05.2023 г.

Из базидиального сырья *Ganoderma lucidum* выделены разветвленные полисахариды. Установлено, что выделенные фракции содержат разветвленные полисахариды в виде комплексов с меланином. После очистки полисахаридов методом ионообменной хроматографии из базидиального сырья получили две фракции: нейтральные полисахариды GW-1 с выходом 25.71% и анионные полисахариды GW-2 с выходом 5.26%. Изучены физико-химические свойства полученных образцов методами ИК- и УФ-спектроскопии. Установлена степень чистоты полученных фракций разветвленных полисахаридов. Методами газовой хроматографии, одномерной (¹³C-ЯМР, ¹H-ЯМР) и двумерной (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, NOESY) ЯМР-спектроскопии установлены состав и молекулярная структура полученных образцов полисахаридов. Выделенные и очищенные полисахариды представляют собой разветвленные глюканы с 1,4,6- и 1,3,6-связями между глюкопиранозными звеньями. Фармакотоксикологические исследования проводили на белых беспородных мышах. Установлено, что полученные полисахариды относятся к V классу (практически нетоксичные соединения, LD₅₀ ≥ 2000 мг/кг).

Выделенные полисахариды (GW) – перспективные биологически активные компоненты, на основе которых возможно создание лекарственных средств, обладающих гепатопротекторной и противоопухолевой активностью.

Ключевые слова: β-глюкан, базидиальные грибы, плодовое тело, физико-химические характеристики

DOI: 10.31857/S0132342324010041, **EDN:** OWQAJR

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день в мире проводятся научные исследования по поиску природных источников, богатых биологически активными соединениями, выделению из них биологически активных веществ,

а также определению их структуры и биологической активности. Базидиомицеты, или базидиальные грибы (Basidiomycota), в последние годы становятся предметом для глубокого исследования с точки зрения поиска новых противоопухолевых и различных биологически

Сокращения: GW – водорастворимые полисахариды из *Ganoderma lucidum*; GW-1 – нейтральные полисахариды, GW-2 – анионные полисахариды.

[#] Автор для связи: (эл. почта: xsb75@mail.ru).

активных веществ. Особое внимание уделяется разработке методов выделения биологически активных веществ из базидиальных грибов (*Ganoderma lucidum* (Curt Fr.)), созданию лекарственных средств на их основе, обладающих иммуномодулирующей и противоопухолевой активностью.

После получения данных о составе клеточных стенок базидиальных грибов у исследователей появился большой интерес к имеющимся в их составе полисахаридам. Полисахариды – один из важнейших компонентов органических соединений, участвующих во многих биологических процессах. Многочисленные исследования показали, что соединения, проявляющие противоопухолевые свойства, имеют разветвленную структуру [1–4].

Большинство полисахаридов, выделенных из грибов, обладающих противоопухолевыми свойствами, представляют собой глюканы [5]. Глюканы имеют либо линейную, либо разветвленную структуру, состоящую из молекул глюкозы. Боковая цепь содержит остатки различных моносахаров. Показано, что полисахариды, содержащиеся в базидиальных грибах, накапливаются в плодовых телах, спорах. Наибольшая концентрация полисахаридов наблюдается в мицелии. Эти полисахариды, как сказано выше, различаются по своей химической структуре, но все имеют β -(1,3)-глюкановые группы в основной цепи и β -(1,6)-глюкановые группы в разветвленных участках. По-видимому, именно полисахариды, имеющие такие ответвления, и проявляют биологическую активность (рис. 1).

Исследование структурных характеристик полисахаридов представляет собой сложную задачу с точки зрения физико-химических и структурных показателей [6]. Гель-проникающая хроматография – один из основных методов анализа, сочетающийся с детектором многоуглового лазерного рассеяния. При

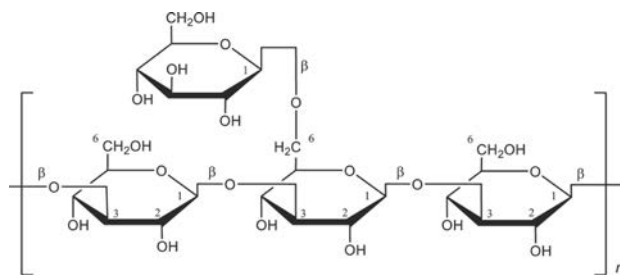


Рис. 1. Структура β -глюканов базидиальных грибов.

гель-хроматографии полисахариды разделяются по молекулярной массе [7].

Для структурного анализа полисахаридов применяют методы гидролиза с последующим анализом продуктов гидролиза методом хромато-масс-спектрометрии. Применение этого метода позволяет получить из одного анализа смеси сведения о временах удерживания ее компонентов, об их относительном содержании в смеси и получить масс-спектры каждого компонента смеси [8].

Анализ состава моносахаридов имеет решающее значение для изучения структуры полисахаридов. Моносахариды, высвобождающиеся в результате гидролиза, могут быть идентифицированы и количественно определены с помощью различных методов, таких как анионообменная, газовая хроматография, обращенно-фазовая ВЭЖХ [9].

Характеристика разветвления полисахаридов – один из важных молекулярных параметров, определяющих различные физико-химические свойства полисахаридов. Разветвленные полисахариды могут иметь различную структуру, положение разветвления может быть случайным или равномерно распределено по основной цепи или цепи разветвления [10]. Для определения структуры полисахаридов применяют ИК-, ЯМР-спектроскопию. ЯМР-спектроскопия подтверждает наличие гликозидных связей в структуре полисахарида и количества моносахаридов в повторяющейся структуре, включая идентификацию моно-

сахарида, α - или β -связи, тип гликозидной связи и повторяющиеся единичные последовательности полисахаридной цепи [11].

Молекулы полисахаридов могут образовывать трехмерные сетчатые структуры через водородные связи, силы Ван-дер-Ваальса, ковалентные связи и т.д. Более того, полисахаридная цепь имеет большую степень свободы и гибкости. Эти особенности делают пространственную конформацию полисахаридов очень сложной. Исследования все чаще показывают, что биологическая активность полисахаридов не только связана с первичными структурами, но также зависит от структуры и разветвления [12, 13]. Поэтому большое значение имеет анализ структуры полисахаридов. В качестве дополнительных методов изучения структуры полисахаридов используют атомно-силовую микроскопию, сканирующую электронную микроскопию, хроматографию с круговым дихроизмом, рентгеновскую дифракцию и др.

Цель данного исследования – выделение разветвленных полисахаридов из природного базидиального гриба *Ganoderma lucidum*, определение их структуры и физико-химических свойств, макромолекулярной структуры и острой токсичности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для предварительной очистки исходного сырья измельченное плодовое тело базидиального гриба *G. lucidum* экстрагировали обезжиривающим реагентом в аппарате Сокслета – смесью хлороформ/этиловый спирт 95% (2 : 1) при соотношении субстрат/растворитель 1 : 10 в течение 24 ч, что приводило к удалению липидов, частично протеинов, моно- и олигосахаридов, красящих веществ и неорганических примесей, при этом выход примесей у базидиального гриба составил 3.6%. После обесмоливания сырья для выделения из него водорастворимых полисахаридов провели последователь-

ную экстракцию сырья водой и лиофилизировали. Выход водорастворимых полисахаридов из базидиального гриба *G. lucidum* (GW) составил 15.16%.

Из литературы известно, что основной компонент водных извлечений из базидиомицетов – меланин, составляющий 50–60% от их сухого остатка [14], при этом разветвленные полисахариды в базидиомицетных грибах находятся в виде меланин-глюканового комплекса [15]. Меланины в основном растворены в глюкановой матриксе. Содержание меланина в виде комплекса с полисахаридами подтверждается УФ-спектроскопическим исследованиям.

Проведен УФ-спектральный анализ содержания меланина в водорастворимых фракциях полисахаридов (GW), выделенных из базидиомицетного сырья (рис. 2). Показано, что в области 320–360 нм наблюдаются полосы поглощения, соответствующие полосам поглощения меланина [16].

Для исследования структуры необходимо использовать чистые фракции полисахаридов. Поэтому полученные водорастворимые полисахариды были дополнительно очищены методами ионообменной и гель-хроматографии.

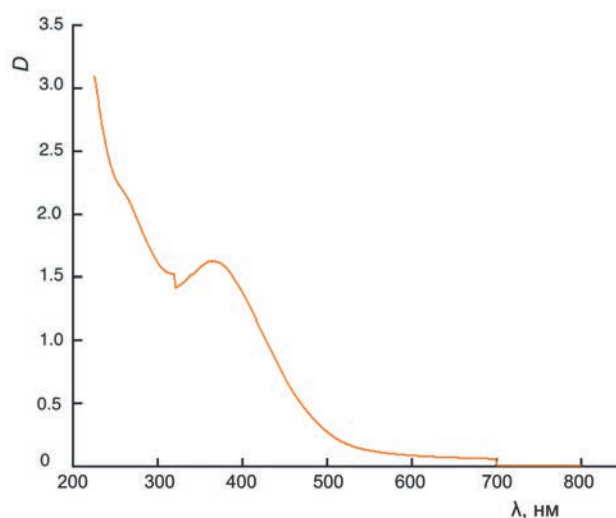


Рис. 2. УФ-спектр водорастворимых фракций полисахаридов, выделенных из базидиального сырья *Ganoderma lucidum*.

Для дальнейшей очистки фракцию GW хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой методами ионного обмена. Элюирование проводили последовательным добавлением воды, элюировалась фракция GW-1, затем 0.1 М раствором NaCl элюировали фракцию GW-2. Со временем концентрация раствора NaCl возрастала до 1.0 М. Нейтральные полисахариды были разделены при элюировании дистиллированной водой, а анионные – градиентом NaCl. При этом выход нейтральных полисахаридов фракции полисахаридов из базидиального гриба *G. lucidum* GW-1 составил 25.71%, анионных полисахаридов GW-2 – 5.26%.

На рис. 3. представлена хроматограмма разделения полученных из базидиомицетного сырья фракций полисахаридов на DEAE-целлюлозном сорбенте, с помощью которого были разделены нейтральные (GW-1) и анионные (GW-2) полисахариды.

Для определения гомогенности фракций исходных полисахаридов, а также очистки их от сопутствующих примесей с целью дальнейшего изучения их состава и строения углеводных цепей проведена гель-хроматография на сефадексе G-75. В процессе разде-

ления было определено, что каждый образец полисахарида состоял из однородных полисахаридов.

После очистки полисахаридов фенол-серно-кислотным методом определили количество углеводов в образцах, результаты представлены в табл. 1. Количество углеводов в нейтральных фракциях было больше, чем в анионных фракциях (табл. 1).

Для дальнейшего анализа структуры полисахаридов были проведены ИК-спектроскопические исследования выделенных фракций. В ИК-спектрах исследуемых образцов обнаружены все полосы поглощения, характерные для β -глюканов и меланинов – для связей О–Н полисахаридов и связей N–H меланинов в области 2900 см^{-1} [17]. Полоса поглощения в интервале $2850\text{--}2900\text{ см}^{-1}$ соответствует валентным колебаниям атома углерода C–H-связей C6 полисахаридов. В интервале $1460\text{--}1650\text{ см}^{-1}$ находятся полосы поглощения, соответствующие валентным колебаниям связи C=C ароматического кольца меланина и связи C=O карбоксильных групп. В области $1170\text{--}1350\text{ см}^{-1}$ наблюдаются полосы поглощения, соответствующие полисахаридам и связи C–O карбоксильных групп. В спектрах отмечены полосы поглощения в интервале $1050\text{--}1150\text{ см}^{-1}$, соответствующие валентным колебаниям связей C–O–C глюкопиранозного кольца полисахаридов. В области $500\text{--}650\text{ см}^{-1}$ присутствуют полосы поглощения, характерные для различных типов колебаний связи

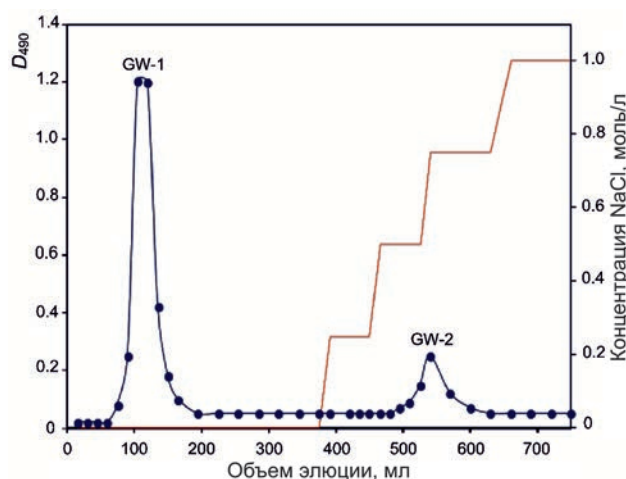


Рис. 3. Хроматограмма разделения полисахаридов GW-1 и GW-2 на ионообменной колонке с DEAE-52-целлюлозой (элюент 0–1 М градиент NaCl, скорость элюирования 1 мл/мин).

Таблица 1. Содержание углеводов, выделенных из базидиального гриба *Ganoderma lucidum*, после фракционирования

Растворитель	Шифр полисахарида	Количество полисахаридов, %	Примеси, %
Вода	GW-1	99.41	0.60
0.1 М NaCl	GW-2	65.01	69.99

C–H (в соответствии с рис. 4). Как видно из рис. 4, в очищенных фракциях GW-1 и GW-2 наблюдаются менее интенсивные полосы поглощения в области 1660 см^{-1} , что говорит об отсутствии меланина в образцах.

Далее были определены молекулярно-массовые характеристики полученных фракций методом гель-фильтрации. Результаты анализа молекулярно-массового распределения методом гель-хроматографии (табл. 2) показали, что молекулярная масса образцов водной фракции (GW, GW-1, GW-2) находится в пределах 10.5–17.7 кДа, молекулярно-

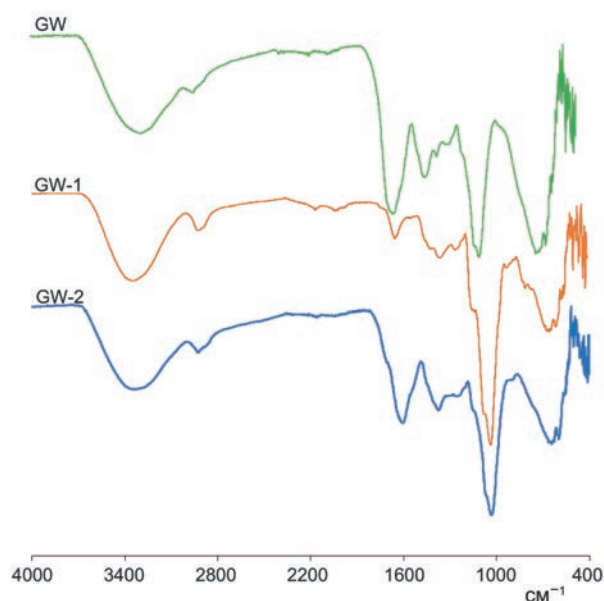


Рис. 4. ИК-спектры образцов неочищенных (GW) и очищенных (GW-1 и GW2) фракций полисахаридов из *Ganoderma lucidum*.

Таблица 2. Молекулярно-массовые параметры полисахаридов, выделенных из базидиального гриба *Ganoderma lucidum*

Фракция	Молекулярная масса, кДа	Молекулярно-массовое распределение (Mw/Mn)
Водорастворимая фракция (GW)	12.3	1.5
Нейтральный полисахарид (GW-1)	17.7	1.4
Анионный полисахарид (GW-2)	10.5	1.5

массовое распределение (Mw/Mn) – в пределах 1.4–1.5. Образцы характеризуются относительно небольшим значением полидисперсности, что указывает на гомогенность полисахаридов (табл. 2).

Для анализа структуры связей полисахаридов широко используется метод метилирования с использованием метилиодида для преобразования всех свободных гидроксильных групп молекул полисахарида в метоксигруппы. Метилированный полисахарид гидролизуют до моносахаридов и восстанавливают с использованием бородейтерида натрия. Восстановленные моносахариды ацетилируют уксусным ангидридом с образованием летучих продуктов – частично метилированных ацетатов альдитов. Для идентификации и количественного определения частично метилированных ацетатов альдитов их анализируют методом газовой хроматографии и масс-спектрометрии (ГХ-МС) [9, 18, 19].

Типы связывания моносахаридных единиц в полисахаридах были идентифицированы посредством метилирования. Индивидуальность и характер фрагментации перметилированных альдитолацетатов детектировали с помощью базы данных масс-спектров (NIST-2017). Процент метилированных сахаров оценивали методом внутренней нормализации. ГХ-МС-анализ перметилированных альдитолацетатов представлен в табл. 3.

Анализ ГХ-МС показал, что перметилированные альдитолацетаты, полученные из фракции GW-1, содержат 1,5-ди-О-ацетил-2,3,4,6-тетра-О-метилглюцитол, 1,3,5-три-О-ацетил-2,4,6-три-О-метилглюцитол, 1,4,5-три-О-ацетил-2,3,6-три-О-метилглюцитол, 1,5,6-три-О-ацетил-2,3,4-три-О-метилглюцитол, 1,4,5,6-тетра-О-ацетил-2,3-ди-О-метилглюцитол и 1,3,5,6-тетра-О-ацетил-2,4-ди-О-метилглюцитол. Полученные результаты доказывают, что полисахарид GW-1 состоит из концевых (1,3)-,

Таблица 3. Результаты ГХ-МС метилированных полисахаридов GW-1, выделенных из базидиального гриба *Ganoderma lucidum*

Метилированный сахар	Гликозидные связи	Молярные соотношения	Основные массовые фрагменты, <i>m/z</i>
2,3,4,6-Me ₄ -Glcр	1-Связанный Glcр	3.0	43, 45, 71, 87, 102, 118, 129, 145, 161, 162, 205
2,4,6-Me ₃ -Glcр	1,3-Связанный Glcр	1.0	43, 45, 71, 87, 101, 118, 129, 161, 174, 217, 234, 277
2,3,6-Me ₃ -Glcр	1,4-Связанный Glcр	1.0	43, 45, 71, 87, 102, 113, 118, 129, 162, 173, 233, 277
2,3,4-Me ₃ -Glcр	1,6-Связанный Glcр	1.0	43, 59, 71, 87, 99, 102, 118, 129, 162, 189, 233
2,3-Me ₂ -Glcр	1,4,6-Связанный Glcр	1.0	43, 85, 102, 118, 127, 162, 201, 261, 305
2,4-Me ₂ -Glcр	1,3,6-Связанный Glcр	2.0	43, 87, 102, 118, 129, 189, 234, 305

(1,4)-, (1,6)-, (1,4,6)- и (1,3,6)-связанных глюкопиранозильных остатков.

На рис. 5 представлены перметилованные альдитолацетали из фракции GW-1.

Показано, что остатки сахаров в полисахаридах фракции GW-1 находятся в молярном соотношении 3 : 1 : 1 : 1 : 1 : 2. Выделенные и очищенные полисахариды представляют собой разветвленные полисахариды β-глюканового типа. Основная цепь

состоит из глюкопиранозных звеньев, связанных 1,4- и 1,3-связью с ответвлениями с 1,6-глюкопиранозными связями.

Спектры ¹³C-ЯМР содержат ценную информацию о функциональном составе полисахаридов, положениях связей между звеньями, размерах циклов моносахаридных остатков, конфигурациях гликозидных связей между звеньями и последовательности моносахаридов в цепи. Из спектров ¹³C-ЯМР можно определить абсолютные конфигурации отдельных моносахаридных остатков (если известны конфигурации соседних звеньев), а также получить данные о регулярном строении полисахаридов. Если известен моносахаридный состав линейного регулярного полисахарида, построенного из повторяющихся олигосахаридных звеньев, то задача установления его полного строения по спектру ЯМР успешно решается с помощью соответствующих компьютерных программ [20]. Поэтому дальнейшее изучение моносахаридных последовательностей и структуры полисахаридов GW-1 были изучены с использованием одномерной (¹³C-ЯМР, ¹H-ЯМР) и двумерной (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, NOESY) ЯМР-спектроскопии.

Химические сдвиги протонов на спектрах ¹H-ЯМР и углеродов на спектрах ¹³C-ЯМР для фракции GW-1 приведены в табл. 4. Спектры ¹H-ЯМР фракции GW-1

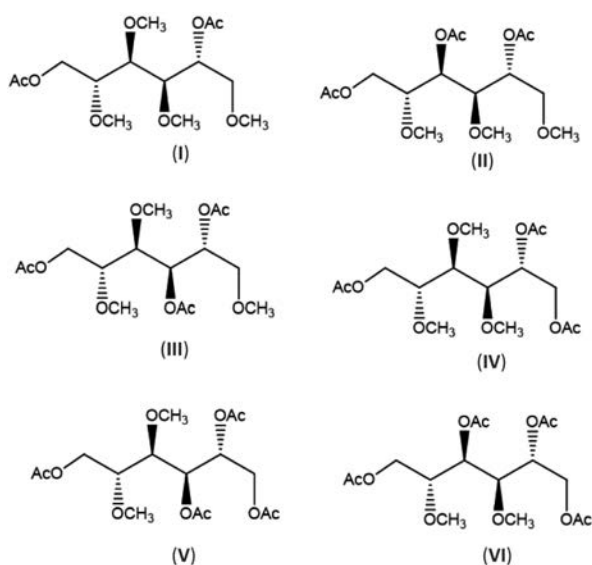


Рис. 5. Перметилованные альдитолацетали: 1,5-ди-О-ацетил-2,3,4,6-тетра-О-метил-глюцитол (I); 1,3,5-три-О-ацетил-2,4,6-три-О-метил-глюцитол (II); 1,4,5-три-О-ацетил-2,3,6-три-О-метил-глюцитол (III); 1,5,6-три-О-ацетил-2,3,4-три-О-метилглюцитол (IV); 1,4,5,6-тетра-О-ацетил-2,3-ди-О-метилглюцитол (V); 1,3,5,6-тетра-О-ацетил-2,4-ди-О-метил-глюцитол (VI).

Таблица 4. Химические сдвиги ^1H -ЯМР и ^{13}C -ЯМР для полисахарида GW-1, выделенного из базидиального гриба *Ganoderma lucidum*

Остаток гликозидной связи	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
1,3-Glcp (A)	4.81/102.30	3.92/80.07	3.73/83.51	3.69/66.68	3.70/77.22	3.75/60.66
1,3,6-Glcp (B)	4.78/102.41	3.68/79.07	3.78/84.06	3.94/66.73	3.67/74.32	3.91/69.30
1,4-Glcp (C)	5.01/97.84	3.33/72.97	3.52/75.68	3.68/79.07	3.49/75.73	3.73/60.64
1,4,6-Glcp (D)	5.09/101.50	3.55/72.56	3.42/75.71	3.83/78.04	3.38/74.35	4.04/69.27
Терминал-Glcp (E)	4.55/102.45	3.86/72.15	3.64/74.75	3.71/71.57	3.86/76.32	4.01/60.16
1,6-Glcp (F)	4.88/100.27	3.80/72.50	3.52/74.68	3.69/69.67	3.51/75.31	3.87/68.26

показали, что полисахарид имеет шесть аномерных сигналов, наблюдаемых при 4.42–5.09 м.д., что указывает на то, что глюкopiранозильные звенья полисахаридов обладают β -конфигурацией [21].

Эти результаты согласуются с результатами анализа методом ИК-спектроскопии. Кроме того, β -конфигурация моносахаридных остатков полисахаридов подтверждается спектрами ^{13}C -ЯМР, в которых характерные сигналы для аномерных атомов углерода C1 появляются при 97.84–102.75 м.д. [22].

Химические сдвиги аномерных протонов остатков 1,3-Glcp (остаток A) GW-1 были обнаружены при 4.81 и 4.42 м.д.. Это указывает на то, что остаток β -связанный. На спектрах ^{13}C -ЯМР и ^1H -ЯМР полисахарида GW-1 видны характерные для группировок атомов сигналы протонов и углеродов с центрами при 1,3-Glcp H2/C2, C3/H3, H4/C4, H5/C5, H6/C6 наблюдаются при 3.92/80.07, 3.73/83.51, 3.69/66.68, 3.70/77.22 и 3.75/60.66 м.д. соответственно (рис. 6). Исследования HMBC и NOESY показали, что остаток 1,3-Glcp GW-1 связан с 1,3,6-Glcp посредством β -(1,3)-гликозидной связи.

В спектрах остатков 1,3,6-Glcp (остаток B) фракции GW-1 специфические сигналы аномерного протона проявлялись при 4.78 и 4.64 м.д., указывая на то, что остатки имеют β -конфигурацию. На спектрах ^{13}C -ЯМР, ^1H -ЯМР полисахарида GW-1 характерные для группировок атомов сигналы протонов и углеро-

дов с центрами при 1,3,6-Glcp H2/C2, C3/H3, H4/C4, H5/C5, H6/C6 появляются при 3.68/79.07, 3.78/84.06, 3.94/66.73, 3.67/74.32, 3.91/69.30 м.д. соответственно. Эксперименты HMBC и NOESY показали, что остатки 1,3,6-Glcp в GW-1 связаны друг с другом и с остатком 1,3-Glcp посредством β -(1,3)-гликозидной связи, 1,4,6-Glcp-остатки связаны с 1,4-Glcp-, 1,6-Glcp-посредством β -(1,6)-, β -(1,6)- и β -(1,4)-гликозидных связей.

Спектроскопические исследования остатков 1,4-Glcp (остаток C) в полисахарида GW-1 показали, что остатки присутствуют в β -конфигурации. В спектрах GW-1 специфические сигналы для 1,3,6-Glcp H1/C1, H2/C2, C3/H3, H4/C4, H5/C5, H6/C6 проявляются при 5.01/97.84, 3.33/72.97, 3.52/75.68, 3.68/79.07, 3.49/75.73, 3.73/60.64 м.д. соответственно. Исследования HMBC и NOESY показали, что остаток 1,4-Glcp в образце GW-1 связан с 1-Glcp- и 1,4,6-Glcp-остатками посредством β -(1,4)- и β -(1,6)-гликозидных связей соответственно.

Дальнейшие исследования показали, что остатки 1,4,6-Glcp (остаток D) полисахарида GW-1 имеют β -конфигурацию. В спектрах GW-1 резонансы 1,4,6-Glcp H1/C1, H2/C2, C3/H3, C4/H4, H5/C5, H6/C6 обнаружены при 5.09/101.50, 3.55/72.56, 3.42/75.71, 3.83/78.04, 3.38/74.35, 4.04/69.27 м.д. соответственно. Анализ HMBC и NOESY показал, что остатки 1,4,6-Glcp в GW-1 связаны с остатками 1,3,6-Glcp-, 1,4-

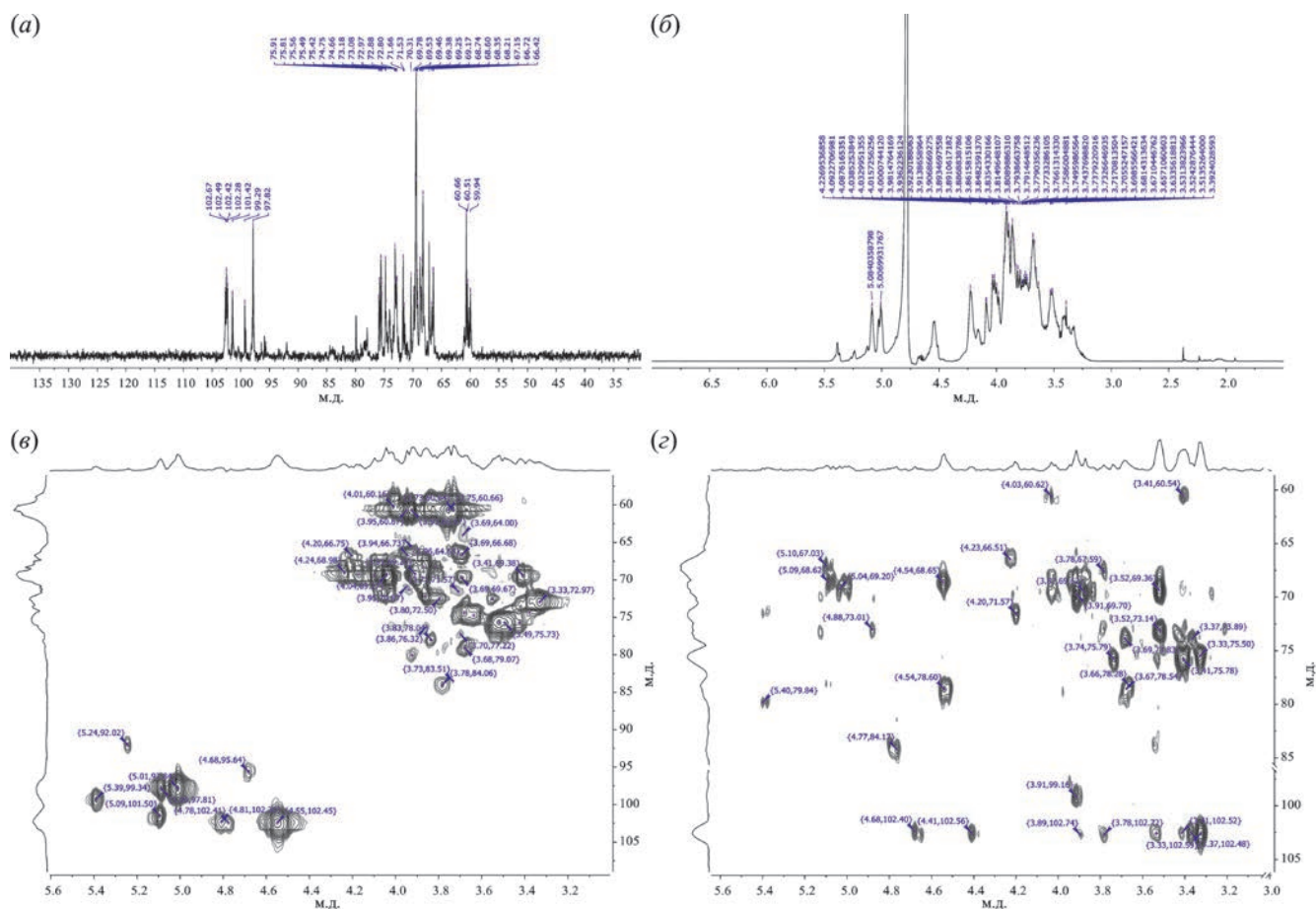


Рис. 6. Спектры ^{13}C -ЯМР (а), ^1H -ЯМР (б), HSQC (в) и HMBC (г) полисахарида GW-1.

Glcр- и 1,3-Glcр по β -(1,4)-, β -(1,6)- и β -(1,3)-гликозидным связям соответственно.

В спектрах GW-1 были обнаружены концевые остатки 1-Glcр (остаток E), имеющие β -конфигурацию. В спектрах GW-1 характерные сигналы для 1-Glcр H1/C1, H2/C2, C3/H3, C4/H4, H5/C5, H6/C6 обнаружены при 4.55/102.45, 3.86/72.15, 3.64/74.75, 3.71/71.57, 3.86/76.32, 4.01/60.16 м.д. соответственно. Эксперименты HMBC и NOESY ясно показали, что концевые остатки в GW-1 связаны с остатками 1,3,6-Glcр-, 1,6-Glcр- и 1,4-Glcр посредством β -(1,6)-, β -(1,6)- и β -(1,4)-гликозидных связей соответственно.

Спектроскопические исследования показали, что полисахариды содержат остатки 1,6-Glcр (остаток F),

имеющие β -конфигурацию. В спектрах GW-1 специфические сигналы для 1,6-Glcр H1/C1, H2/C2, C3/H3, C4/H4, H5/C5, H6/C6 обнаружены при 4.88/100.27, 3.80/72.50, 3.52/74.68, 3.69/69.67, 3.51/75.31, 3.87/68.26 м.д. соответственно. В исследованиях HMBC и NOESY кросс-пики показали, что остатки 1,6-Glcр в образцах GW-1, связаны с 1,3,6-Glcр- и концевыми 1-Glcр-остатками посредством β -(1,6)-гликозидных связей.

На основании результатов анализа метилирования, 1D и 2D ЯМР-спектров были выяснены порядок и последовательность связывания, а также возможные структуры моносахаридных остатков в полисахаридах GW-1. На рис. 7 показан порядок связывания, по-

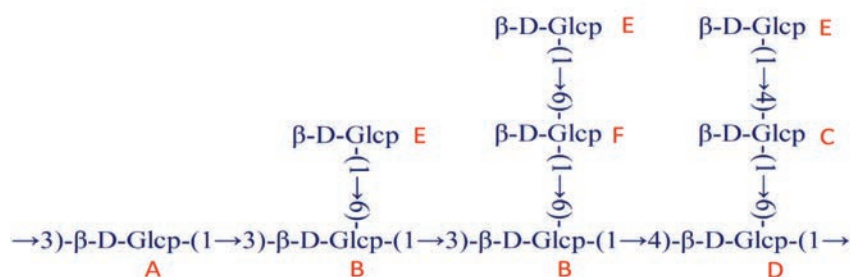


Рис. 7. Порядок связывания, последовательность моносахаридов и возможные структуры полисахаридов GW-1.

следовательность и возможные структуры полисахаридов GW-1. Выясненная структура показывает, что полисахарид GW-1 – разветвленный полисахарид β-глюканового типа. В полисахаридных цепях разветвление происходит за счет остатков 1,3,6-Glcp и 1,4,6-Glcp. Степень разветвления полисахарида GW-1 оказалось равной 0.75.

Ранее была изучена противоопухолевая и гепатопротекторная активность водорастворимого полисахарида (GW) *in vivo* [23, 24]. Установлено, что под влиянием полисахарида (25 мг/кг в сутки в течение 10 сут перарально) наблюдается ингибирование роста солидной опухоли аденокарциномы Эрлиха у мышей на 59.34% по объему и 60.21% по массе. На модели острого токсического гепатита, вызванного введением 50%-ного раствора четыреххлористого углерода, оценена гепатопротекторная активность. По результатам исследования водорастворимый полисахарид (GW) базидиального гриба *Ganoderma lucidum* в дозе 25 мг/кг обладает высокой гепатопротекторной активностью. Показано снижение активности ферментов печени (аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ) и щелочная фосфатаза (ЩФ)) в опытных группах. Полученные данные свидетельствуют о том, что выделенные полисахариды (GW) представляют собой перспективные биологически активные компоненты, на основе которых воз-

можно создание лекарственных средств с гепатопротекторной и противоопухолевой активностью.

Все фармакологические исследования острой токсичности препаратов проводили на здоровых половозрелых животных (мышях), прошедших карантин не менее 14 сут.

В конце эксперимента вычисляли средне-смертельную дозу (LD_{50}) и определяли класс токсичности [25, 26].

Для изучения острой токсичности на мышях препарат GW вводили однократно внутрижелудочно в дозах 500, 1200, 1600 и 2000 мг/кг. Через 510 мин после введения препарата во всех изучаемых дозах у животных наблюдалось умывание, сужение глаз, кучкование и мочеиспускания. Мыши во всех группах возвращались к норме в течение 2–3 ч. Гибели животных во всех использованных дозах препарата не было отмечено (0/5).

Другие изученные показатели: состояние волосяного и кожного покрова, положение хвоста, количество и консистенция фекальных масс, изменения массы тела – во всех использованных дозах на протяжении всего срока исследования (14 сут) не отклонялись от нормы.

Изучение острой токсичности препарата GW (табл. 5) при пероральном введении показало, что препарат при внутрижелудочном введении мышам соответствует $LD_{50} \geq 2000$ мг/кг. Согласно

Таблица 5. Острая токсичность при пероральном введении водорастворимого полисахарида (GW) из базидиального гриба *Ganoderma lucidum*

Препарат	Вид животных, путь введения	Доза, мг/кг	Число погибших/ число животных	LD ₅₀ , мг/кг
Водорастворимый полисахарид (GW) из <i>Ganoderma lucidum</i>	Мыши, перорально	500	0/5	≥2000
		1200	0/5	
		1600	0/5	
		2000	0/5	

модифицированной классификации OECD (Организация экономического содействия и развития), данный препарат при пероральном введении относится к V классу практически нетоксичных соединений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение водорастворимых полисахаридов.

В качестве природного сырья для извлечения водорастворимых полисахаридов нами был выбран базидиальный трутовой гриб трутовик лакированный (также возможны названия Линчжи или Рейши) (лат. *Ganoderma lucidum*) – гриб рода *Ganoderma*, в настоящее время включаемый в семейство Polyporaceae. *Ganoderma lucidum* собран в местах естественного произрастания на территории Узбекистана в Бустанлыкском районе.

Для выделения водорастворимых полисахаридов из природного сырья использовали высушенные, измельченные, обезжиренные трутовые тела. Высушенное сырье взвешивали (100 г) и экстрагировали трижды горячей водой на кипящей водяной бане с обратным холодильником (при суммарном соотношении сырья и экстрагента 1 : 20, 1 : 15, 1 : 10). Суммарная продолжительность трех экстрагирований составляла 6 ч. Полученные водные экстракты объединяли, фильтровали и упаривали на ротаторном испарителе при температуре 50°C до 1/5 первоначального объема и лиофилизировали. Выделенные водорастворимые полисахариды (GW) представляют собой порошок кремового цвета, который хорошо растворяется в воде,

при низкой концентрации образует опалесцирующий раствор, а при высокой концентрации – вязкий раствор.

Ионообменная хроматография. Образец водорастворимого полисахарида (GW) (100 мг) растворяли в 5 мл дистиллированной воды и наносили на колонку (14 × 3 см) с DEAE-целлюлозой 52 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия). Элюирование полисахаридов проводили последовательно 0–1 М градиентным раствором NaCl со скоростью 60 мл/ч. Отбирали фракции объемом по 10 мл. Выход полисахаридов из колонки контролировали фенол-сернокислотным методом [27].

Фракции объединяли, концентрировали, диализовали и лиофильно высушивали.

Фенол-сернокислотный метод. Определение общего содержания сахара проводили фенол-сернокислотным методом. К раствору полисахарида (0.5 мл) добавляли 5%-ный раствор фенола и 2.5 мл концентрированной серной кислоты, помещали смесь на водяную баню на 10 мин. Строили калибровочную кривую для растворов глюкозы (10–120 мкг/мл). Исследования проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-VIS 1280 (Shimadzu Europa GmbH, Германия) при длине волны 490 нм [28].

Эксклюзионно-жидкостная хроматография. Молекулярно-массовые характеристики водорастворимых полисахаридов определяли на жидкостном хроматографе 1260 Infinity (Agilent, США) с использованием хроматографической колонки PL aquagel-OH

MIXED (Англия) длиной 300 мм и внутренним диаметром 8 мм.

ИК-спектроскопия. ИК-спектры исследуемых образцов регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре IRTaser-100 (Shimadzu Corp., Япония) в диапазоне частот 400–4000 см⁻¹ [29].

Исследование структуры полисахаридов методом метилирования. Навеску полисахарида (5 мг) растворяли в 1 мл диметилсульфоксида, добавляли 30–40 мг тонкоизмельченного гидроксида натрия и далее при перемешивании приливали 0.5 мл CH₃I. Реакционную смесь выдерживали 1 ч, приливали 5 мл хлороформа, промывали несколько раз водой, после чего хлороформный раствор упаривали, остаток гидролизovali нагреванием с 1 мл 2 М раствора трифторуксусной кислоты при 100°C в течение 8 ч [17]. Кислоту отгоняли упариванием с этанолом, полученные метилированные производные моносахаридов переводили в ацетаты полиолов и идентифицировали с помощью хромато-масс-спектрометрии [30].

ЯМР-спектроскопия. Спектры ¹H-ЯМР и ¹³C-ЯМР регистрировали на спектрометре JNM-ECZ600R (JEOL, Япония) при рабочей частоте 600 МГц, для ¹H в растворах D₂O. В качестве внутреннего стандарта в спектрах ¹H-ЯМР использовали сигнал воды (4.8 м.д.). Спектры ¹³C-ЯМР регистрировали по стандартным методикам.

Острая токсичность. Для определения параметров острой токсичности использовали метод Литчфилда и Уилкоксона [31]. Острую токсичность препарата изучали на белых беспородных мышах обоих полов массой 20.0 ± 2.0 г из питомника “Центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора” г. Ташкента (Узбекистан), в каждой группе было по шесть животных. Опыты проводили на здоровых половозрелых животных, прошедших

карантин не менее 14 сут. Препарат GW вводили мышам однократно внутрижелудочно в дозах 500, 1200, 1600 и 2000 мг/кг, мышам контрольной группы тем же способом вводили 0.5 мл дистиллированной воды.

За животными осуществляли наблюдение ежедневно в течение первого дня эксперимента в условиях лаборатории, при этом в качестве показателей функционального состояния животных фиксировали общее состояние, возможные судороги, выживаемость и гибель. Далее ежедневно, в течение двух недель в условиях вивария у животных всех групп наблюдали за общим состоянием и активностью, особенностями поведения, частотой и глубиной дыхательных движений, состоянием волосяного и кожного покрова, положением хвоста, количеством и консистенцией фекальных масс, частотой мочеиспускания, изменением массы тела и другими показателями. Всех подопытных животных содержали в одинаковых условиях и на общем рационе питания со свободным доступом к воде и пище [32]. В конце эксперимента вычисляли средне-смертельную дозу (LD₅₀) и определяли класс токсичности [33].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из базидиомицетного сырья *Ganoderma lucidum* выделены разветвленные полисахариды β-глюканового типа. Установлено, что выделенные фракции содержат разветвленные полисахариды в виде комплексов с меланином.

Изучены физико-химические свойства, структурные характеристики выделенных β-D-глюканов. Установлено, что макромолекулярные структуры β-глюканов состоят из ангидроглюкопиранозного звена, связанного посредством β-1,3-, частично β-1,4-гликозидных связей. Разветвленная часть состоит из остатков β-D-глюкозы, которые связаны одной или несколькими β-1,6-гликозидными связями. Доказана степень

разветвления β -D-глюканов для базидиального гриба *Ganoderma lucidum* со значением 0.75.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В настоящей работе все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wasser P., Weis L.* // Int. J. Med. Mushrooms. 1999. V. 1. P. 31–62.
<https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v1.i1.30>
2. *Wasser S.P.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 60. P. 258–274.
<https://doi.org/10.1007/s00253-002-1076-7>
3. *Mizuno T.* // Foods Food Ingred. J. Jpn. 1996. V. 167. P. 69–85.
4. *Mizuno T.* // Food Rev. Int. 1995. V. 11. P. 173–178.
5. *Gorin P.A.J., Barreto-Berger E.* // The Chemistry of Polysaccharides of Fungi and Lichens. In: The Polysaccharides / Ed. Aspinall G.O. New York: Academic Press, 1983. P. 365–409.
6. *Liu W., Lu W., Chai Y., Liu Y., Yao W., Gao X.* // Carbohydr. Polym. 2017. V. 176. P. 140–151.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.071>
7. *Guo Q., Ai L., Cui S.W.* // Strategies for Structural Characterization of Polysaccharides. In: Methodology for Structural Analysis of Polysaccharides. SpringerBriefs in Molecular Science. Springer, Cham, 2018. P. 20–25.
8. *Pan D., Wang L., Chen C., Teng B., Wang Ch., Xu Z., Hu B., Zhou P.* // Food Chem. 2012. V. 135. P. 1097–1103.
9. *Magdeldin S., Moser A.C.* // Affinity Chromatography: Principles and Applications / Ed. Magdeldin S. InTech, 2012. P. 3–28. <http://dx.doi.org/10.5772/39087>
10. *Wang Q., Zhao X., Pu J., Luan X.* // Carbohydr. Polym. 2016. V. 143. P. 296–300.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.023>
11. *Kim Y., Kim B., Cheong Ch., David L., Williams, Kim Ch., Lim S.* // Carbohydr. Res. 2000. V. 328. P. 331–341.
[https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(00\)00105-1](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(00)00105-1)
12. *Patel B.K., Campanella O.H., Janaswamy S.* // Carbohydr. Polym. 2013. V. 92. P. 1873–1879.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.026>
13. *Tao Y., Zhang R., Wei Y., Liu H., Yang H., Zhao Q.* // Carbohydr. Polym. 2015. V. 128. P. 179–187.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.012>
14. *Сушинская Н.В., Кукулянская Т.А., Курченко В.П., Шостак Л.М.* // Химия и технология органических веществ. 2004. № 4. С. 193–196.
15. *Халилова Г.А., Мухитдинов Б.И., Хайтметова С.Б., Нормаматов Н.С., Тураев А.С.* // Узбекский химический журнал 2019. № 2 с. 48–55.
16. *Arun G., Eyini M., Gunasekaran P.* // J. Exp. Biol. 2015. V. 53. P. 380–387.
17. *Wang Y., Liu Y., Yu H., Zhou S., Zhang Z., Wu Di., Yan M., Tang Q., Zhang J.* // Carbohydr. Polym. 2017. V. 167. P. 337–344.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.016>
18. *Ding H.H., Cui S.W., Goff H.D., Chen J., Guo Q., Wang Q.* // Carbohydr. Polym. 2016. V. 151. P. 538–545.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.094>
19. *Ren Y., Bai Y., Zhang Z., Cai W., Del R., Flores A.* // Molecules. 2019. V. 24. P. 3122.
<https://doi.org/10.3390/molecules24173122>
20. *Халилова Г.А., Тураев А.С., Мухитдинов Б.И., Хайтметова С.Б., Азимова Л.Б., Нормаматов Н.С.* // Докл. Акад. наук Респ. Узбекистан. 2020. № 5. С. 55–62.
21. *Manna D.K., Nandi A.K., Pattanayak M., Maity P., Tripathy S., Mandal A.K., Roy S., Tripathy S.S., Gupta N., Islam S.S.* // Carbohydr. Polym. 2015. V. 134. P. 375–384.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.099>

22. Yang B., Prasad K.N., Jiang Y. // Carbohydr. Polym. 2016. V. 137. P. 570–575.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.088>
23. Халилова Г.А., Тураев А.С., Мухитдинов Б.И., Хайтметова С.Б., Норматаматов Н.С. // Хим.-фарм. журн. 2022. Т. 56. С. 21–24.
<https://doi.org/10.30906/0023-1134-2022-56-8-21-24>
24. Хайтметова С.Б., Тураев А.С., Халилова Г.А., Тагайалиева Н.А., Аббасхонова М.О. // Эксп. клин. фарм. 2022. Т. 85. № 12. С. 38–41.
<https://doi.org/10.30906/0869-2092-2022-85-12-38-41>
25. Сидилов К.К. // Токсикология новых промышленных химических веществ. Классификация веществ по токсичности / М.: Медицина, 1973. Вып. 3. С. 47.
26. ГОСТ 32644–2014. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Острая пероральная токсичность – метод определения класса острой токсичности (OECD, Test № 423:2001, IDT). М.: Стандартинформ, 2015.
27. BeMiller J.N. // Food Anal. 2017. Chapter 19. P. 333–360.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_19
28. Masuko T., Minami A., Iwasaki N., Majima T., Nishimura S.I., Lee Y.C. // Anal. Biochem. 2004. V. 339. P. 69–72.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.001>
29. Khaytmetova S.B., Turaeva A.S., Khalilova G.A. // Polymer Sci. Ser. B. 2022. V. 64. P. 500–505.
<https://doi.org/10.1134/S1560090422700221>
30. Björndal H., Hellerqvist C. G., Lindberg B., Svensson S. // Ang. Chem. Int. Ed. English. 1970. V. 9. P. 610–619.
<https://doi.org/10.1002/anie.197006101>
31. Арзамасцев Е.В., Березовская И.В., Верстакова О.Л., Гуськова Т.А., Дурнев А.Д., Иванова А.С., Крепкова Л.В., Сорокина А.В. // Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств / Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. С. 13–24.
32. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей ред. чл.-корр. РАМН, проф. Р.У. Хабриева (2 изд., перераб. и доп.). М.: Медицина, 2005. 832 с.
33. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure. 2001. № 420.
https://ntp.niehs.nih.gov/sites/default/files/iccvm/sup-pdocs/feddocs/oecd/oecd_gl420.pdf

Isolation, Physico-Chemical Characteristics and Acute Toxicity Determination of Water-Soluble Polysaccharide from Basidial Raw Material *Ganoderma lucidum*

S. B. Khaytmetova^{*,#}, A. S. Turaev^{*}, G. A. Khalilova^{*}, and B. I. Muhitdinov^{*}

[#] E-mail: xsb75@mail.ru

^{*} Institute of Bioorganic Chemistry named A.S. Sadykov AS RUz, ul. Mirzo Ulugbek 83, Tashkent, 100125 Uzbekistan

As a result of the study, branched polysaccharides were isolated from the basidiomycete raw materials of *Ganoderma lucidum*. It has been established that the isolated fractions contain branched polysaccharides in the form of complexes with melanin. After purification of polysaccharides by ion-exchange chromatography, two fractions were obtained from basidial raw materials: neutral polysaccharides GW-1 with a yield of 25.71% and anionic polysaccharides GW-2, the yield of which was 5.26%, respectively. The physicochemical properties of the obtained samples were studied by IR and UV spectroscopy. The degree of purity of the obtained fractions of branched polysaccharides was established. Using gas chromatography, one-dimensional (¹³C NMR, ¹H NMR) and two-dimensional (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, NOESY) NMR spectroscopy, the composition and molecular structure of the obtained polysaccharide samples were determined. The results showed that the isolated and purified polysaccharides are branched glucans with 1,4,6- and 1,3,6-bonds between glucopyranose units. Pharmacotoxicological studies were carried out on white outbred mice and it was found that the resulting polysaccharides belong to class V, practically non-toxic compounds (LD₅₀ ≥ 2000 mg/kg). Isolated polysaccharides (GW) are promising biologically active components, on the basis of which it is possible to create drugs with hepatoprotective and antitumor activity.

Keywords: *β-glucan, basidiomycetes, fruit body, physical and chemical characteristics*



УДК 577.175.632+543.645.2

СИНТЕЗ СТЕРОИДНЫХ ТРЕЙСЕРОВ МЕТОДОМ ОКСИМНОГО ЛИГИРОВАНИЯ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ПОЛЯРИЗАЦИОННОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОМ ИММУНОАНАЛИЗЕ

© 2024 г. И. А. Прохоренко^{*,#}, Д. А. Глущенко^{*}, Е. Л. Гуляк^{*}, И. В. Михура^{*},
В. А. Коршун^{*}, Л. И. Мухаметова^{**}, С. А. Еремин^{**}

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

^{**} МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

Поступила в редакцию 07.06.2023 г.

После доработки 20.06.2023 г.

Принята к публикации 21.06.2023 г.

Предложен метод синтеза конъюгатов ряда кетостероидов с 6-карбоксифлуоресцеином с использованием короткого бифункционального реагента аминоксипропиламина. Стереизомеры, образующиеся при получении оксимов стероидов, были разделены с помощью препаративной ТСХ и протестированы в поляризационном флуоресцентном иммуноанализе (FPIA) с применением моноклональных антител. Изучены кинетические параметры связывания полученных флуоресцентных производных с моноклональными антителами к прогестерону. Таким образом, разработан эффективный и универсальный подход к синтезу флуоресцентных конъюгатов для иммуноанализа с оптимальной длиной линкера, который улучшает их аналитические характеристики и упрощает их получение. Продемонстрирована перспективность полученных соединений для практического применения в клинической диагностике и при анализе объектов окружающей среды.

Ключевые слова: стероидные гормоны, гомогенный иммуноанализ, флуоресцентные конъюгаты, оксимное лигирование

DOI: 10.31857/S0132342324010055, **EDN:** OWPZNS

ВВЕДЕНИЕ

Стероидные гормоны играют ключевую роль в регуляции размножения, половой дифференциации, роста, метаболизма и иммунной системы позвоночных [1–3]. Они широко используются в качестве активных компонентов в гормональной терапии, при

лечении, тяжелых форм аллергии, кожных заболеваний, астмы и артрита. Гормональный дисбаланс или отсутствие определенных гормонов может привести к раку, ожирению, диабету и сердечно-сосудистым заболеваниям [1–5]. В связи с этим измерение концентрации различных стероидов в крови или

Сокращения: EDF – этилендиаминфлуоресцеинтиокарбамат; ELISA – иммуноферментный анализ; 6-FAM – 6-карбоксифлуоресцеин; FPIA – поляризационный флуоресцентный иммуноанализ; MAb-3G11 – моноклональные антитела к углеводному антигену Glc9; MAb-Pg – моноклональные антитела к прогестерону.

[#] Автор для связи: (эл. почта: prig67@mail.ru).

моче человека и животных может иметь большое значение для клинической диагностики и во время терапии. В ветеринарии гормоны применяют также для лечения аномалий репродуктивной системы. Кроме того, стероидные гормоны добавляют в корма животным в качестве стимуляторов роста. В составе бытовых и промышленных отходов гормоны попадают в систему сточных вод, что вызывает необходимость контролировать их концентрацию в пищевых продуктах и окружающей среде [6]. Таким образом, разработка быстрого и надежного метода количественного определения стероидных гормонов весьма актуальна для научных и клинических исследований.

На протяжении более 30 лет преобладающим методом для количественного определения стероидных гормонов был иммуноанализ (например, радиоиммуноанализ или иммуноферментный анализ (ELISA)) [5, 7]. Хотя эти виды иммуноанализа обладают высокой чувствительностью, в некоторых случаях они недостаточно специфичны из-за пространственных ограничений, связанных со взаимодействием компонентов на твердой фазе [7, 8]. Однако другой формат иммуноанализа – поляризационный флуоресцентный иммуноанализ (FPIA) – представляет собой гомогенный, простой и быстрый метод обнаружения низкомолекулярных соединений, широко применяющийся для определения концентрации лекарственных препаратов в клинических исследованиях [9]. FPIA основан на конкурентном связывании с антителом свободного антигена и трейсера – антигена, меченного флуоресцентной меткой. Флуоресцентно-меченый антиген служит необходимым компонентом FPIA, при этом чувствительность и специфичность анализа напрямую зависят от характеристик трейсера. Связывание трейсера с антителом измеряется спектроскопическими методами без какого-либо процес-

са разделения. Поляризация флуоресценции чувствительна к изменениям во вращательном движении молекулы, меченной флуоресцентной меткой [10]. Сам низкомолекулярный трейсер обладает способностью к флуоресценции с низкой поляризацией, которая увеличивается при связывании с антителом, что приводит к максимальной степени поляризации. При увеличении концентрации свободного антигена в образце наблюдается уменьшение поляризации флуоресценции, поскольку концентрация комплекса трейсер–антитело снижается, а концентрация свободного трейсера увеличивается.

Для определения стероидных гормонов был разработан ряд методов присоединения линкерной группы к молекуле стероида с флуоресцентной меткой с целью получения трейсеров для FPIA. Один из наиболее распространенных методов модификации кетостероидов – это синтез оксимов в реакции с аминоксиксусной кислотой. Образующиеся карбоксиметильные производные в дальнейшем удобно использовать как для получения конъюгатов для иммунизации, так и для присоединения флуорофоров с аминогруппой на линкере. Так, например, в ряде работ такое карбоксипроизводное прогестерона использовали для получения трейсера соединением через амидную связь с этилендиаминфлуоресцеинтиокарбаматом (рис. 1а). Для стероидов, содержащих гидроксильные группы (например, 11- α -гидроксипрогестерон), ацилирование янтарным ангидридом привело к получению карбоксипроизводного с остатком янтарной кислоты (рис. 1б) [11–13].

Синтез новых стероидов, меченных флуоресцентным красителем, представляет большой интерес для изучения биохимических процессов, анализа биологических проб и продуктов питания. Целью данного исследования была разработка нового универсального метода получения флуоресцентных

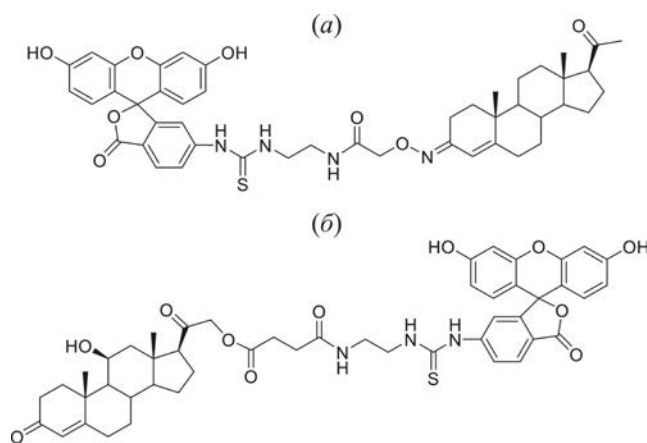


Рис. 1. Структура описанных ранее трейсеров для FPIA на основе стероидных гормонов: (а) – Pg3CMO-EDF (амид карбоксиметилноксима прогестерона с этилендиаминфлуоресцеинтиокарбаматом); (б) – 11- α -гидроксипрогестерон, ацилированный янтарным ангидридом.

трейсеров из биомолекул с карбонильной группой методом оксимного лигирования. Этот метод был использован для получения трейсеров из кетостероидов, протестированных затем в методе FPIA.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы синтезировали бифункциональный реагент (V) (схема 1), содержащий на одном конце аминоксигруппу, защищенную этоксиэтилиденовым остатком, а на другом – аминоксигруппу.

Синтез соединения (I) был описан ранее в литературе [14]. Для повышения выхода данную реакцию обычно проводят при повышенной температуре, иногда с добавлением межфазных катализаторов в

водно-органических смесях (например, ацетон–вода 6 : 1). Было показано [15], что это превращение легко проходит в воде благодаря высокой растворимости исходного бромпропанола. Выход целевого продукта (I), полученного по данной методике, после экстракции эфиром и хроматографической очистки составил 74%.

Далее гидроксильную группу азидпропанола (I) активировали метансульфонилхлоридом при охлаждении в присутствии основания с образованием алкилирующего реагента (II), синтез которого аналогичным методом был описан ранее [16]. Полученный с практически количественным выходом 3-азидпропилмезилат (II) без очистки использовали в следующей стадии.

Введение защищенной аминоксигруппы в соединение (II) осуществляли с помощью реакции нуклеофильного замещения 3-азидпропилмезилата с натриевой солью этил-*N*-гидроксиацетимидата (III). Реакцию проводили с трехкратным избытком этой соли при кипячении в течение 20 ч в смеси изопропанола и *трет*-бутанола. В результате был получен *N*-(3-азидпропилокси)этилацетимидат (IV) с выходом 68%.

Ранее соединение (V) получали аминированием соответствующего хлорпроизводного в довольно жестких условиях [17]. Однако мы выбрали иной синтетический путь и провели восстановление азидо-

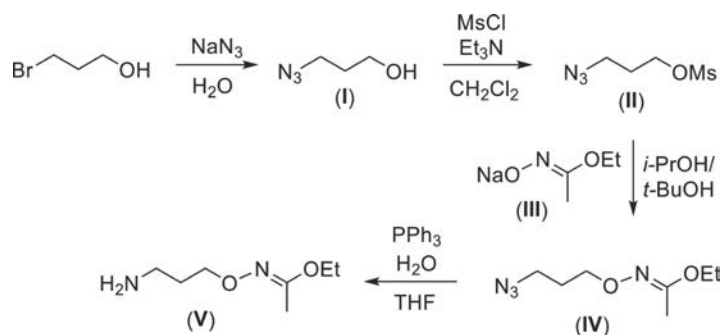


Схема 1. Синтез бифункционального линкерного реагента (V).

группы соединения (**IV**) трифенилфосфин по Штаудингеру в тетрагидрофуране с последующим добавлением рассчитанного количества воды и гидролизом образовавшегося азофосфорана при кипячении [18]. Продукт (**V**) выделили из реакционной смеси колоночной хроматографией с выходом 78%.

С этой целью получен реагент (**V**) с трехуглеродным линкером и защищенной терминальной аминоксигруппой. Его использовали для модификации флуоресцеина по карбоксильной группе и получения конъюгатов флуорофора с кортикостероном и прогестероном посредством оксимного лигирования [19] с одновременным снятием защитной группы. Полученные с помощью данного реагента трейсеры имеют более короткий линкер по срав-

нению с опубликованными ранее аналогичными соединениями (рис. 1).

Соединение (**V**) ацилировали в безводной среде NHS-эфиром 6-карбоксифлуоресцеина в DMF в присутствии ненуклеофильного основания для получения защищенного производного (**VI**) (схема 2). Производное флуоресцеина (**VI**) было выделено колоночной хроматографией с выходом 72%.

Реакцию оксимного лигирования проводили в присутствии эквивалентного количества соляной кислоты со снятием защитной этоксиэтилиденовой группы и быстрой селективной реакцией освободившегося оксимиона с 3-кетогруппой молекулы стероида.

Реакция оксимного лигирования привела к образованию *E/Z*-изомеров по оксимной связи (рис. 2).

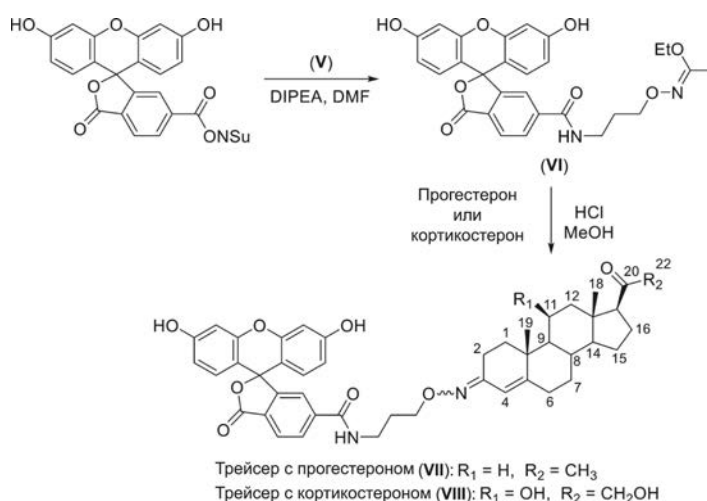


Схема 2. Синтез этоксиэтилидензащищенного аминоксипроизводного (**VI**) 6-карбоксифлуоресцеина (6-FAM) и флуоресцентных трейсеров (**VII**) и (**VIII**).

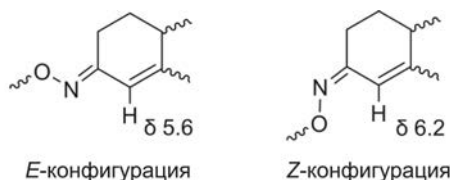


Рис. 2. Стереизомерные фрагменты оксимов (**VII**) и (**VIII**).

Аналогичные флуоресцентные производные оксимов кортикостероидов уже были описаны ранее, а их конфигурация была установлена методом ^1H -ЯМР-спектроскопии на основе анализа химического сдвига протона в 4-м положении остатка стероида [20]. Этот метод в дальнейшем использовали для определения конфигурации полученных изомеров. Индивидуальные изомеры конъюгатов с прогестероном и кортикостероном выделяли с помощью препаративной ТСХ на обращенно-фазовых пластинках RP-18. Анализ чистоты выделенных *Z/E*-стереоизомеров проводили методом ОФ-ВЭЖХ.

Для исследования взаимодействия моноклонального антитела к прогестерону с изомерными трейсерами **E(VII)** и **Z(VII)** измеряли константы их связывания с антителом. Для сравнения был взят трейсер Pg3CMO-EDF (рис. 1а), ранее описанный в работах [11, 12].

Анализ кривых изменения поляризации флуоресценции этих трейсеров при взаимодействии с моноклональным антителом к прогестерону показал

быстрое увеличение сигнала и установление равновесия в системе в течение 2 мин. Конечные значения поляризации при связывании *E/Z*-изомеров трейсеров и соединения Pg3CMO-EDF [10, 11] приведены на рис. 3. Два новых изомерных трейсера **E(VII)** и **Z(VII)** показали более высокий сигнал поляризации флуоресценции, чем Pg3CMO-EDF, что позволило разработать более чувствительный анализ. Кроме того, данные трейсеры специфично связывались только с моноклональным антителом к прогестерону (MAb-Pg) и не связывались с антителом MAb-3G11 к 1,3- β -D-нонаглюкану Glc9, описанному Мухаметовой с соавт. [21].

Для определения K_d моноклонального антитела к прогестерону с трейсерами **E(VII)** и **Z(VII)** была построена зависимость изменения сигнала поляризации флуоресценции от его концентрации, которая представлена на рис. 4. Как видно из графика, при увеличении концентрации антител первоначально наблюдается резкий рост поляризации флуоресценции, который затем замедляется и перестает меняться

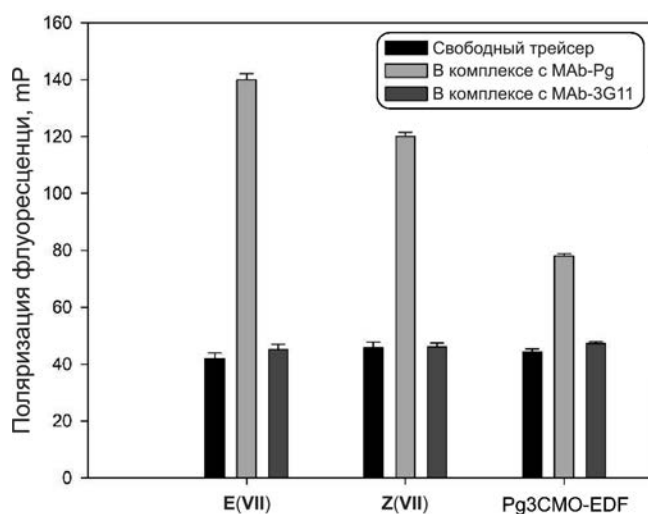


Рис. 3. Изменение сигнала поляризации флуоресценции свободных трейсеров **E(VII)**, **Z(VII)** и Pg3CMO-EDF (2.5 нМ) при образовании комплексов со специфическими антителами к прогестерону MAb-Pg (20 нМ) в сравнении с неспецифическими MAb-3G11 (30 нМ).

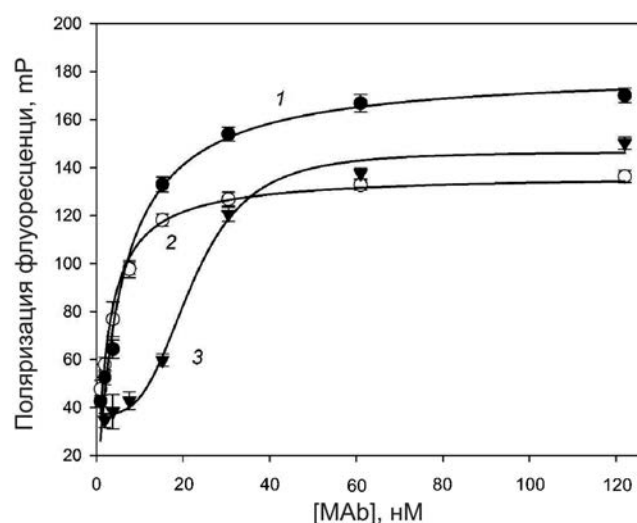


Рис. 4. Зависимость изменения сигнала поляризации флуоресценции от концентрации антител для трейсеров **E(VII)** (кривая 1), **Z(VII)** (кривая 2) и Pg3CMO-EDF (кривая 3) (концентрации трейсеров 2.5 нМ); pH 8.5, 25°C.

с дальнейшим увеличением концентрации антител при полном связывании трейсера. Для трейсеров **E(VII)** и **Z(VII)** данное насыщение происходило при более низких концентрациях, что свидетельствует о более сильном связывании с антителом. Для трейсера Pg3СМО-EDF зависимость выглядит более сложной.

Для количественной оценки связывания полученных трейсеров с антителами определяли K_d комплексов антиген–антитело для трейсеров **E(VII)** и **Z(VII)**.

Взаимодействие моноклонального антитела к прогестерону МАb и трейсера с прогестероном PgFAM описывается уравнением (1):

$$\text{MAb} + \text{PgFAM} = \text{MAb} \cdot \text{PgFAM}, \quad (1)$$

где $\text{MAb} \cdot \text{PgFAM}$ – это комплекс антитела с трейсером.

K_d выражается следующим образом:

$$K_d = \frac{[\text{MAb}][\text{PgFAM}]}{[\text{MAb} \cdot \text{PgFAM}]}. \quad (2)$$

При условии, что исходная концентрация антитела, вводимого в реакцию с трейсером, близка к исходной концентрации трейсера $[\text{PgFAM}]_0$, а текущую концентрацию антител и трейсера выразить так:

$$\begin{aligned} [\text{MAb}] &= [\text{MAb}]_0 - [\text{MAb} \cdot \text{PgFAM}] \\ [\text{PgFAM}] &= [\text{PgFAM}]_0 - [\text{MAb} \cdot \text{PgFAM}] \end{aligned} \quad (3)$$

Тогда формулу (2) для расчета K_d можно записать так:

$$K_d = \frac{([\text{MAb}]_0 - [\text{MAb} \cdot \text{PgFAM}])([\text{PgFAM}]_0 - [\text{MAb} \cdot \text{PgFAM}])}{[\text{MAb} \cdot \text{PgFAM}]}$$

Если обозначить варьируемые концентрации символами, то получится уравнение (4):

$$K_d = \frac{([\text{MAb}]_0 - C_x)(C_0 - C_x)}{C_x}, \quad (4)$$

где C_0 – это исходная концентрация трейсера PgFAM, а C_x – концентрация трейсера, связанного с антителом.

Доля связанного с антителом трейсера F_b (отношение концентрации связанного с антителом трейсера C_x к исходной концентрации трейсера C_0) определяется как:

$$F_b = \frac{C_x}{C_0} = \frac{mP - mP_0}{Q(mP_{\max} - mP) + (mP - mP_0)}, \quad (5)$$

где mP – наблюдаемая степень поляризации образца, mP_0 – поляризация свободного флуоресцентно-меченого антигена, $mP_{\max}$ – поляризация комплекса антитело–антиген при полном связывании, Q – отношение интенсивностей флуоресценции связанной формы к свободной. При измерении сигнала поляризации флуоресценции наших образцов интенсивность трейсера не изменялась при связывании с антителами, поэтому $Q = 1$.

Поскольку выражение (4) можно преобразовать в квадратное уравнение, а C_x выводится как один из его корней, после подстановки этого решения уравнения (4) в выражение (5) получаем:

$$F_b = \frac{a - \sqrt{a^2 - 4C_0[\text{PgFAM}]_0}}{2C_0} = \frac{mP - mP_0}{mP_{\max} - mP_0}, \quad (6)$$

где $a = K_d + C_0 + [\text{MAb}]_0$.

$$mP - mP_0 = (mP_{\max} - mP_0) \left(\frac{a - \sqrt{a^2 - 4C_0[\text{PgFAM}]_0}}{2C_0} \right). \quad (7)$$

Учитывая бивалентность антител, мы рассчитывали K_d , считая концентрацию белка удвоенной. K_d вычисляли по уравнению (7) с помощью программы Sigma Plot 11 (Systat Software Inc., США) [22].

Величины K_d составили 5.5 ± 0.3 и 2.5 ± 0.2 нМ для трейсеров **E(VII)** и **Z(VII)** соответственно. Для ранее описанного трейсера Pg3СМО-EDF величина K_d составила 24.4 ± 0.2 нМ. Таким образом, связывание моноклонального антитела с полученными нами трейсерами **E(VII)** и **Z(VII)** было более сильным, чем с трейсером Pg3СМО-EDF.

Полученные результаты дают возможность использовать синтезированные нами трейсеры **E(VII)** и **Z(VII)** для высокочувствительного определения

прогестерона методом FPIA. Для разработки методики FPIA выбранная концентрация моноклонального антитела должна обеспечивать высокий аналитический сигнал для точного и воспроизводимого анализа, а также низкий предел обнаружения прогестерона. Учитывая эти факторы, была выбрана концентрация антитела, которая обеспечивает 80%-ное связывание с трейсером. Из графика зависимости изменения сигнала поляризации флуоресценции от концентрации антител (рис. 4) были определены оптимальные рабочие концентрации антитела, составившие 3.6 мкг/мл (24 нМ) для двух трейсеров **E(VII)** и **Z(VII)**. Для трейсера Pg3CMO-EDF эта величина составляла 4.3 мкг/мл (29 нМ).

Была построена градуировочная зависимость изменения сигнала поляризации флуоресценции от концентрации прогестерона при взаимодействии с моноклональным антителом в присутствии его флуоресцентных производных **E(VII)** и **Z(VII)** в качестве трейсеров. Для ее построения определили изменение сигнала поляризации флуоресценции, наблюдаемое при смешении рабочих растворов трейсера и антитела, в зависимости от концентрации стандартных растворов прогестерона. Были получены калибровочные зависимости для двух новых трейсеров и трейсера Pg3CMO-EDF с более жестким линкером на основе амида карбоксиметилоксима (рис. 5), а также рассчитаны аналитические характеристики, представленные в табл. 1. Предел обнаружения прогестерона определен как концентрация, при которой происходит 10%-ное снижение сигнала поляризации флуоресценции (IC_{10}), а чувствительность анализа IC_{50} – как концентрация, вызывающая 50%-ное снижение сигнала.

Оба трейсера, **E(VII)** и **Z(VII)**, продемонстрировали возможность их использования для FPIA-анализа прогестерона. Они показали более низкий предел обнаружения и более высокую чувствительность по

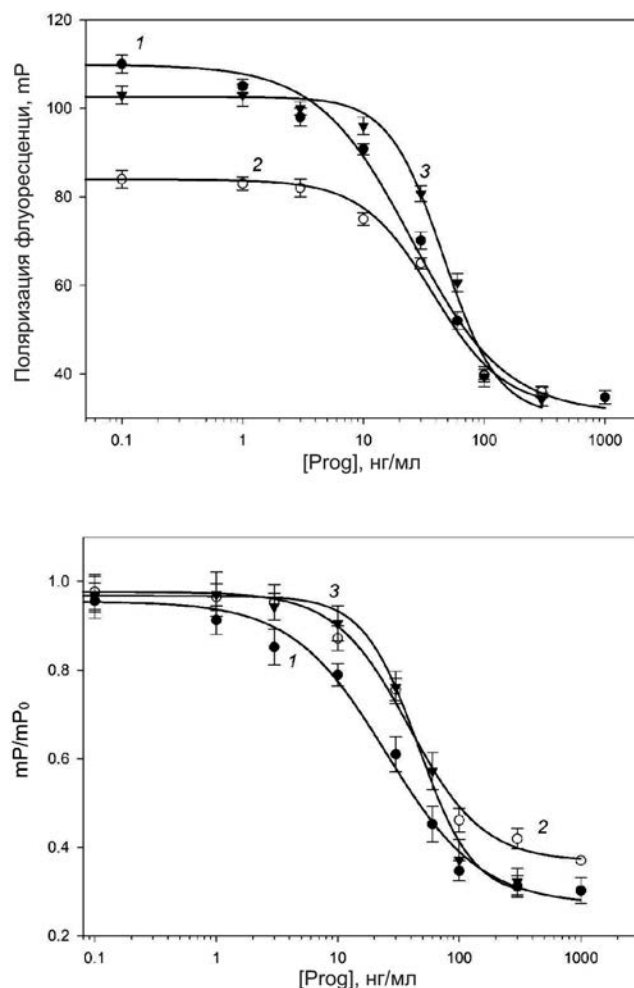


Рис. 5. Градуировочные зависимости (а) и нормированные градуировочные зависимости (б) для трейсеров **E(VII)** (кривая 1), **Z(VII)** (кривая 2) и Pg3CMO-EDF (кривая 3) (концентрации трейсеров 2.5 нМ); pH 8.5, 25°C.

сравнению с описанным ранее трейсером Pg3CMO-EDF (табл. 1). Кроме того, предел обнаружения прогестерона при использовании трейсера **E(VII)** был почти в 2 раза ниже, чем у трейсера **Z(VII)**. Как показано в данной работе, K_d комплекса для трейсера **E(VII)** с МАb в 2 раза выше, чем для трейсера **Z(VII)**, что и объясняет возможность снижения предела обнаружения прогестерона.

Таблица 1. Аналитические характеристики определения прогестерона с помощью моноклонального антитела и трейсеров E(VII), Z(VII) в сравнении с ранее описанным трейсером Prog3CMO-EDF методом FPIA

Аналитическая характеристика	Трейсер		
	E(VII)	Z(VII)	Prog3CMO-EDF
Предел обнаружения (IC ₁₀), нг/мл	3.0 ± 0.3	7.0 ± 0.3	10.0 ± 0.5
Линейный диапазон, нг/мл	6–95	15–95	15–100
Чувствительность анализа (IC ₅₀), нг/мл	22 ± 1	35 ± 2	45 ± 2

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и оборудование. Для синтеза модифицирующих реагентов и флуоресцентных трейсеров использовали реактивы производства Химмед (Россия). Дихлорметан, этилацетат, диметилформамид, изопропиловый и метиловый спирты перед использованием перегоняли. Диэтиловый эфир, тетрагидрофуран перегоняли над LiAlH₄. Использовали азид натрия и метансульфохлорид (Fluka, Швейцария), прогестерон и кортикостерон (Sigma, США).

ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре AVANCE 700 (Bruker BioSpin, Германия) в растворе CDCl₄ или DMSO-*d*₆ при 30°C, химические сдвиги указаны в шкале δ, КССВ – в Гц.

Масс-спектры получали на хроматомасс-спектрометре (хроматограф Agilent 1260, SD, США, совмещенный с масс-спектрометрической приставкой ИЭР G6125) с ионной ловушкой. Измерение проводили в режиме регистрации положительных ионов в диапазоне *m/z* от 100 до 1200. Образцы элюировали 5–95%-ным градиентом CH₃CN в воде с добавлением 0.1% муравьиной кислоты в качестве элюирующей добавки со скоростью потока 1.0 мл/мин. Анализируемый образец растворяли в метаноле до концентрации 10⁻³ мкг/мл. Ввод образца в поток производили через автосамплер (Vialsampler G7129A). Объем вносимой пробы составлял 2 мкл. Данные обрабатывали с помощью программы DataAnalysis 4.0 SP4 (Bruker Daltonik GmbH, Германия).

Для аналитической ТСХ использовали пластинки Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, ФРГ), алифатические соединения проявляли раствором, содержащим KMnO₄ (1%) и Na₂CO₃ (2%) в воде. Для контроля полноты протекания реакций использовали системы следующего состава: дихлорметан–эфир 2 : 3 (А), дихлорметан–этилацетат 9 : 1 (Б), гексан–эфир 19 : 1 (В), дихлорметан–метанол–триэтиламин 18 : 1 : 1 (Г), дихлорметан–метанол 9 : 1 (Д). Препаративную ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 RP-18 F₂₅₄S (Merck, ФРГ). Для колоночной хроматографии использовали силикагель Kieselgel 60 с размером частиц 40–63 мкм.

Анализ чистоты выделенных изомерных трейсеров E(VII), Z(VII) и E(VIII), Z(VIII) проводили при помощи ВЭЖХ на хроматографе (KNAUER Azura HPLC, ФРГ) с использованием колонки EC 250/4.6 NUCLEODUR C₈ Gravity в градиентном режиме и следующих элюентов: элюент А – 0.1%-ный раствор ТФУ в воде, элюент Б – 0.1%-ный раствор ТФУ в CH₃CN (v/v) с расходом 1.0 мл/мин. Ввод образца в поток производили через инжектор Rheodyne 7010 (Rheodyne, США). Сигналы регистрировали УФ-детектором К-2501 при 260 нм.

Исследование синтезированных трейсеров в FPIA проводили на портативном приборе Ellie Sentry-200 (Diachemix, США). В работе использовали 20 mM боратный буфер, содержащий 0.02% NaN₃ и 0.02% Тритона X-100 (буфер А). При анализе

использовали специфические моноклональные антитела к прогестерону (IgG2b, кат. № ХМ207; ХЕМА, Россия,), прогестерон и кортикостерон (Sigma, США). Растворы компонентов вводили в пробирку автоматическими дозаторами Research PhysioCare Concept на 0.5–10, 20–200 и 100–1000 мкл (Eppendorf, США). Концентрацию антител и трейсеров определяли спектрофотометрически с помощью прибора Lightwave II (Biochrom, Великобритания).

3-Азидпропанол (I). 1-Бромпропанол (5.0 г, 36 ммоль) и NaN_3 (5.0 г, 77 ммоль) растворяли в 50 мл воды. Реакционную смесь перемешивали в течение 12 ч при 60°C с обратным холодильником, контролируя полноту протекания реакции по ТСХ (система А). После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь экстрагировали диэтиловым эфиром (3 × 30 мл), эфирный слой промывали насыщенным раствором NaCl (3 × 20 мл) и сушили безводным сульфатом натрия. 3-Азидпропанол выделяли с помощью колоночной хроматографии на силикагеле с использованием градиентного элюирования 0–10% эфира в дихлорметане. Получали 3-азидпропанол в виде бесцветной маслянистой жидкости, выход 3.69 г (74%). R_f 0.38 (система А). Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3): 1.72–1.80 (м, 2H, OCH_2CH_2), 3.38 (т, J 6.9, 2H, CH_2N_3), 3.67 (т, J 6.2, 2H, OCH_2). ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 31.32, 48.29, 59.45.

3-Азидпропилметансульфонат (II). 3-Азидпропанол (I) (2.55 г, 25 ммоль) растворяли в 10 мл дихлорметана и добавляли 3.7 мл триэтиламина (26 ммоль). Метансульфонилхлорид (3.04 г, 26 ммоль) растворяли в 10 мл дихлорметана и медленно по каплям добавляли к реакционной смеси при перемешивании и охлаждении на ледяной бане. По окончании реакции (контроль по ТСХ, система Б) реакционную массу упаривали, остаток растворяли в ТГФ и отфильтровывали выпавший осадок. После упаривания растворителя получили хроматогра-

фически чистый продукт (II), выход 4.77 г (96%). R_f 0.52 (система Б). Полученный продукт без очистки использовали далее для реакции с натриевой солью *N*-гидроксиацетимида (III).

***N*-Гидроксиацетимида натрия соль (III).** При охлаждении в ледяной бане растворяли 11.0 г (0.105 моль) *N*-гидроксиацетимида в 50 мл этилового спирта, к этому раствору добавляли при перемешивании 42.5 мл 2.6 М раствора этилата натрия в этаноле (0.11 моль). Затем охлаждение прекращали, а полученный раствор перемешивали еще 30 мин при комнатной температуре. К полученной смеси добавляли 150 мл сухого диэтилового эфира, фильтровали выпавший осадок, промывали и сушили в вакууме. Получили 10.5 г продукта, выход 95%.

***N*-(3-Азидпропилокси)ацетимидат (IV).** 3-Азидпропилметилат (II) (4.77 г, 25 ммоль) растворяли в смеси изопропилового и *трет*-бутилового спирта (2 : 1 v/v). При перемешивании добавляли натриевую соль гидроксиацетимида (9.375 г, 75 ммоль). Реакционную смесь оставляли перемешиваться при 40°C в течение ночи. Контроль реакции по ТСХ (система В) показал практически полное исчезновение исходного вещества. После этого осадок метилата натрия отфильтровывали, растворитель упаривали в вакууме. Целевое вещество выделяли с помощью флеш-хроматографии в градиенте эфира в гексане 0–3%. Масса 3.59 г (68%). R_f 0.4 (система В). Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3): 1.27 (т, J 7.1, 3H, OCH_2CH_3), 1.85–1.98 (м, 5H, OCH_2CH_2 , CH_3), 3.38 (т, J 6.7, 2H, CH_2N_3), 3.97 (т, J 6.0, 2H, OCH_2), 4.00 (к, J 7.1, 2H, OCH_2CH_3). ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 13.53, 14.32, 28.45, 48.56, 62.15, 70.04, 162.35.

***N*-(3-Аминопропилокси)ацетимидат (V).** Трифенилфосфин (3.64 г, 14 ммоль) при перемешивании добавляли к соединению (IV) (1.66 г, 9 ммоль) в 70 мл ТГФ. По окончании реакции к реакционной

смеси добавляли 5 мл воды и нагревали с перемешиванием при 75°C в течение 2.5 ч. После полного превращения (ТСХ, система Г) мезилата в продукт (V) охлажденную реакционную смесь упаривали досуха, целевой амин выделяли на хроматографической колонке в системе 5% метанола в дихлорметане с градиентом триэтиламина 0–5%. Получали жидкость бледно-желтого цвета массой 1.11 г (78%). R_f 0.44 (система Г). Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3): 3.98 (к, J 7.1, 2H, OCH_2CH_3), 1.24 (т, J 7.1, 3H, OCH_2CH_3), 1.30 (с, 2H, NH_2), 1.71–1.79 (п, 2H, OCH_2CH_2), 1.90 (с, 3H, CH_3), 2.78 (т, J 6.9, 2H, CH_2NH_2), 3.95 (т, J 6.2, 2H, OCH_2). Спектр ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 13.70, 14.49, 33.1, 39.58, 62.23, 71.48, 162.29.

3-(1-Этоксипропилиденаминоокси)пропиламид 6-карбоксифлуоресцеина (VI). *N*-(3-Аминопропилокси)-ацетимидат (V) (7.7 мг, 48 мкмоль) добавляли к раствору активированного NHS-эфира красителя 6-FAM (42 мкмоль) в сухом диметилформамиде (2 мл) в темноте при перемешивании. Затем к реакционной смеси добавляли диизопропилэтиламин (22 мкл, 128 мкмоль), полноту превращения контролировали по ТСХ (система Д). Полученный раствор упаривали досуха, остаток хроматографировали на силикагеле методом градиентного элюирования 0–20% метанола в дихлорметане. Целевое соединение выделяли в виде желтого масла. Выход составил 17.2 мг (72%). R_f 0.52 (система Д). Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 1.17 (т, J 7.0, 3H, OCH_2CH_3), 1.76–1.79 (м, 2H, OCH_2CH_2), 1.80 (с, 3H, CH_3), 3.27 (к, J 6.5, 2H, CH_2NH), 3.83 (т, J 6.2, 2H, OCH_2), 3.90 (к, J 7.1, 2H, OCH_2CH_3), 6.54–6.61 (м, 4H, ArH), 6.70 (д, J 2.3, 2H, ArH), 7.68 (дд, J 1.5, 0.8, 1H, ArH), 8.07 (дд, J 8.2, 0.7, 1H, ArH), 8.17 (дд, J 8.1, 1.4, 1H, ArH), 8.67 (т, J 5.6, 1H, NH), 10.15 (с, 2H, OH). Спектр ^{13}C -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 13.30, 14.16, 25.19, 28.35, 36.74, 61.68, 70.68, 102.23, 109.16, 112.71, 124.78, 128.14, 129.18, 129.35, 140.74, 151.82, 152.62, 159.59, 161.26, 164.39, 168.01, 172.68.

Общая методика получения конъюгатов (VII) и (VIII). К амиду (VI) (2 мг, 3.8 мкмоль) добавляли 4 мкмоль прогестерона или кортикостерона в 200 мкл метанола. Затем в темноте при перемешивании по каплям добавляли 5 мкл раствора концентрированной соляной кислоты в метаноле (9 : 1 v/v). После завершения реакции (контроль по ТСХ, система Д) смесь обрабатывали раствором, содержащим 15% NaCl и 2% NaHCO_3 , затем водную фазу подкисляли до pH 5 и экстрагировали этилацетатом (3×15 мл). Осушенный органический слой упаривали, а полученное соединение очищали от примесей с помощью колоночной хроматографии на силикагеле методом градиентного элюирования от 0 до 10% метанола в дихлорметане. Фракции, содержащие целевые изомеры флуоресцентных трейсеров, собирали, упаривали и далее очищали более селективными методами разделения.

Z/E-изомеры оксимных производных прогестерона и кортикостерона разделяли препаративной ТСХ на пластинке с обращенной фазой. Слой сорбента из окрашенных флуоресцентных пятен, соответствующих целевым изомерам, собирали с пластинки и затем элюировали смесью дихлорметан–метанол (1 : 1). Растворы упаривали, получали стереоизомеры трейсеров **E(VII)** и **Z(VII)** прогестерона в препаративных количествах. Чистоту полученных образцов трейсеров анализировали методом ОФ-ВЭЖХ в градиенте вода–ацетонитрил 0 → 50% за 20 мин.

Выход смеси *Z/E*-изомеров (VII) в реакции с прогестероном составил 2.73 мг (68%). Смесь *Z/E*-изомеров разделяли препаративной ТСХ в системе EtOAc : Et₂O (25 : 1). Анализ ОФ-ВЭЖХ показал, что примесь другого изомера в каждом из образцов прогестерона составляла не более 3% при расчете на основе хроматограмм, записанных при длине волны поглощения детектора 254 нм.

(Z)-3-(Флуоресцеин-6-карбоксамидо)пропил-3-оксим прогестерона Z(VII). Изомер, имеющий Z-конфигурацию, выделили в количестве 1.20 мг (30%), R_f 0.73. Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 0.55 (с, 3H, C_{H18}), 0.81 (уш. дт, 1H, J 3.9, 11.7, C_{H9}), 0.89 (уш. дт, 1H, J 4.1, 12.8, C_{H7}), 1.03 (с, 3H, C_{H19}), 1.08–1.19 (м, 2H, C_{H14} , C_{H15}), 1.29–1.35 (м, 2H, C_{H11}), 1.36–1.43 (м, 1H, C_{H12}), 1.44–1.58 (м, 2H, C_{H1} , C_{H8} , C_{H15}), 1.61 (м, 1H, C_{H16}), 1.73 (м, 1H, C_{H11}), 1.79 (п, J 6.5, 2H, OCH_2CH_2), 1.83 (дт, J 3.5, 13.6, 1H, C_{H7}), 1.98 (м, 2H, C_{H1} , C_{H12}), 2.02 (м, 1H, C_{H16}), 2.05 (с, 3H, C_{H21}), 2.10 (уш. дт, 1H, J 3.5, 14.2, C_{H6}), 2.14 (уш. дт, 1H, J 4.0, 14.8, C_{H2}), 2.22 (дт, 1H, J 4.0, 14.8, C_{H2}), 2.29 (уш. дт, 1H, J 4.1, 14.4, C_{H6}), 2.55 (уш. т, J 9.2, 1H, C_{H17}), 3.26 (уш. п, J 6.5, 2H, CH_2NH), 3.92 (м, 2H, OCH_2), 6.23 (м, 1H, C_{H4}), 6.54–6.59 (м, 4H, ArH), 6.69 (д, J 2.3, 2H, ArH), 7.67 (уш. с, 1H, ArH), 8.07 (д, J 8.1, 1H, ArH), 8.17 (дд, J 1.4, 8.1, 1H, ArH), 8.67 (уш. т, J 5.6, 1H, NH), 10.13 (уш. с, 2H, OH). ESI/MS m/z ($M + \text{H}$) $^+$ 745.4. Время выхода пика на аналитической ВЭЖХ – 12.1 мин.

(E)-3-(Флуоресцеин-6-карбоксамидо)пропил-3-оксим прогестерона E(VII). Изомер, имеющий E-конфигурацию, выделили в количестве 1.17 мг (29%), R_f 0.61. Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 0.55 (с, 3H, C_{H18}), 0.80 (дт, 1H, J 3.9, 11.4, C_{H9}), 0.88 (уш. дт, 1H, J 4.5, 12.5, C_{H7}), 0.98 (с, 3H, C_{H19}), 1.09–1.20 (м, 2H, C_{H14} , C_{H15}), 1.33 (уш. дт, 1H, J 3.6, 13.3, C_{H11}), 1.40 (м, 1H, C_{H12}), 1.44 (м, 1H, C_{H8}), 1.50–1.59 (м, 2H, C_{H1} , C_{H15}), 1.62 (м, 1H, C_{H16}), 1.71 (м, 1H, C_{H11}), 1.79 (м, 3H, OCH_2CH_2 , C_{H7}), 1.94–2.00 (м, 3H, C_{H1} , C_{H12} , C_{H6}), 2.03 (м, 1H, C_{H16}), 2.06 (с, 3H, C_{H21}), 2.16 (м, 1H, C_{H6}), 2.25 (уш. дт, 1H, J 4.2, 16.6, C_{H2}), 2.56 (уш. т, J 9.1, 1H, C_{H17}), 2.74 (уш. дт, 1H, J 3.6, 16.6, C_{H2}), 3.27 (уш. к, J 6.5, 2H, CH_2NH), 3.96 (т, J 6.3, 2H, OCH_2), 5.66 (уш. д, J 1.9, 1H, C_{H4}), 6.54–6.59 (м, 4H, ArH), 6.69 (д, J 2.2, 2H, ArH), 7.68 (уш. с, 1H, ArH), 8.07 (д, J 8.1, 1H, ArH), 8.17 (дд, J 1.4, 8.1, 1H, ArH), 8.67

(т, J 5.6, 1H, NH), 10.13 (уш. с, 2H, OH). ESI/MS m/z 745.3 ($M + \text{H}$) $^+$. Время выхода пика на аналитической ВЭЖХ – 13.8 мин.

Выход смеси Z/E-изомеров (VIII) в реакции с кортикостероном составил 2.3 мг (52%). Смесь Z/E-изомеров разделяли препаративной ТСХ в системе CH_2Cl_2 : EtOAc (5.5 : 4.5). Анализ ОФ-ВЭЖХ показал, что примесь другого изомера в каждом из образцов прогестерона была не более 2%, длина волны поглощения УФ-детектора – 254 нм.

(Z)-3-(Флуоресцеин-6-карбоксамидо)пропил-3-оксим кортикостерона Z(VIII). Выход 0.68 мг (15%), R_f 0.62. Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 0.75 (с, 3H, C_{H18}), 0.79 (уш. дд, J 2.8, 11.8, 1H, C_{H7}), 1.05 (м, 1H, C_{H14}), 1.21–1.27 (с, м, 4H, C_{H15} , C_{H19}), 1.44 (уш. дд, J 3.4, 13.1, 1H, C_{H9}), 1.52 (уш. дт, J 4.2, 13.1, 1H, C_{H8}), 1.54 (м, 1H, C_{H15}), 1.65 (м, 1H, C_{H16}), 1.78–1.87 (м, 4H, OCH_2CH_2 , C_{H1} , C_{H12}), 1.96 (уш. дт, J 4.2, 13.2, 1H, C_{H7}), 2.00 (уш. дд, J 2.6, 13.5, 1H, C_{H12}), 2.03–2.08 (м, 3H, C_{H1} , C_{H6} , C_{H16}), 2.16 (уш. дт, J 4.2, 14.7, 1H, C_{H2}), 2.23 (уш. дт, J 4.0, 14.7, 1H, C_{H2}), 2.33 (уш. ддт, J 1.7, 2.8, 13.2, 1H, C_{H6}), 2.48 (уш. т, J 9.3, 1H, C_{H17}), 3.27 (п, J 6.5, 2H, CH_2NH), 3.94 (м, 2H, OCH_2), 4.01 (уш. с, 2H, HOCH_2), 4.16 (м, 1H, CH_2OH), 4.23 (уш. д, J 3.4, 1H, C_{H1OH}), 6.16 (уш. д, J 1.7, 1H, C_{H4}), 6.30–6.45 (м, 4H, ArH), 6.60 (д, 2H, ArH), 7.61 (уш. с, 1H, ArH), 8.03 (уш. с, 2H, ArH), 8.57 (м, 1H, NH). ESI/MS m/z 777.3 ($M + \text{H}$) $^+$.

(E)-3-(Флуоресцеин-6-карбоксамидо)пропил-3-оксим кортикостерона E(VIII). Выход 1.06 мг (24%), R_f 0.74. Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 0.74–0.79 (с, уш. дд, J 3.4, 11.8, 4H, C_{H7} , C_{H18}), 1.05 (уш. дт, 1H, J 7.1, 11.9, C_{H14}), 1.20–1.27 (с, м, 4H, C_{H15} , C_{H19}), 1.38 (уш. дт, J 4.5, 13.4, 1H, C_{H8}), 1.45 (уш. дд, J 3.2, 13.4, 1H, C_{H9}), 1.50–1.57 (м, 1H, C_{H15}), 1.65 (м, 1H, C_{H16}), 1.75–1.83 (м, 4H, OCH_2CH_2 , C_{H1} , C_{H12}), 1.90 (уш. дт, J 4.5, 13.2, 1H, C_{H7}), (м, 1H), 1.98–2.12 (м, 4H, C_{H1} ,

C_{H6} , C_{H12} , C_{H16}), 2.31 (уш. дт, J 4.0, 16.4, 1H, C_{H2}), 2.49 (уш. т, J 9.5, 1H, C_{H17}), 2.74 (уш. дт, J 4.4, 16.4, 1H, C_{H2}), 3.28 (п, J 6.5, 2H, CH_2NH), 3.98 (т, J 6.2, 2H, OCH_2), 4.02 (уш. с, 2H, $HOCH_2$), 4.16 (м, 1H, CH_2OH), 4.26 (м, 1H, $C_{11}OH$), 5.58 (уш. д, J 1.8, 1H, C_{H4}), 6.30–6.45 (м, 4H, ArH), 6.60 (дд, J 9.0, 2.7, 2H, ArH), 7.60 (уш. с, 1H, ArH), 8.02 (уш. с, 2H, ArH), 8.56 (м, 1H, NH). ESI/MS m/z 777.3 ($M + H$)⁺.

Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ. Определение оптимальной концентрации антител. Получали серию разведений моноклональных антител к соответствующему стероидному гормону разной концентрации (1–120 нМ) в буфере А объемом 0.5 мл. Для этого из концентрата антитела готовили 1 мл исходного раствора в буфере А, а из него последовательным двухкратным разведением делали серию из 10 растворов объемом 0.5 мл. Затем в каждый раствор добавляли по 0.5 мл раствора одного из изомеров трейсеров **E(VII)** или **Z(VII)** в концентрации 5 нМ, выдерживали при комнатной температуре 4–5 мин и измеряли поляризацию флуоресценции. Измерения проводили трижды, результаты представляли в виде средних значений $\pm$ SD.

Построение калибровочных зависимостей для определения прогестерона методом FPIA. Для построения градуировочной кривой готовили стандартные водные растворы прогестерона с концентрациями 0.001, 0.01, 0.033, 0.05, 0.08, 0.1, 0.2, 0.33, 1, 10 и 100 мкг/мл.

В стеклянные кюветы к 50 мкл стандартных растворов прогестерона добавляли 0.5 мл раствора одного из изомеров трейсеров **E(VII)** или **Z(VII)** в концентрации 5 нМ и 0.5 мл раствора антитела в буфере А в рабочем разведении с концентрацией 24 или 29 нМ и выдерживали при комнатной температуре 4–5 мин. Затем измеряли поляризацию

флуоресценции растворов. Измерения проводили трижды, результаты представляли в виде средних значений $\pm$ SD.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы осуществили синтез флуоресцеинового реагента на основе флуорофора 6-FAM с защищенной аминоксигруппой на коротком линкере и использовали его для получения конъюгатов с прогестероном и кортикостероном методом оксимного лигирования, которое происходило одновременно со снятием защитной группы с остатка О-замещенного гидроксилamina на конце линкера. Были получены флуоресцентные трейсеры для анализа методом FPIA стероидов, содержащих карбонильную группу, и их синтетических аналогов. Они обладают перспективными аналитическими характеристиками для определения соответствующих стероидов методом FPIA в биологических пробах и при анализе объектов окружающей среды. Конъюгаты показали высокую эффективность при анализе стероидных гормонов – снижение предела обнаружения прогестерона при сравнении с описанными ранее аналогами. Кроме того, оказалось, что один из стереоизомеров, а именно Z-изомер, более чувствителен в методе FPIA по сравнению с E-изомером. Эти преимущества дают возможность использования таких флуоресцентных производных для разработки тест-систем, диагностикумов и применения их в клиническом анализе гормонов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Г.П. Поповой за квалифицированную помощь в экспериментальной работе и А.А. Михайлову за консультацию при отнесении ЯМР-спектров.

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. *Zamri M.F.M.A., Bahru R., Pramanik S.K., Fattah I.M.R.* // J. Water Proc. Engin. 2021. V. 41. 102017. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102017>
2. *Miller W.L., Auchus R.J.* // Endocr. Rev. 2011. V. 32. P. 81. <https://doi.org/10.1210/ER.2010-0013>
3. *Кудджаев А.М., Андрианова А.Г., Гущина А.Е., Смирнов И.В., Ротанова Т.В.* // Биоорг. химия. Т. 48. С. 381–414. [*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>
4. *Gore A.C.* // JAMA Int. Med. 2016. V. 176. P. 1705–1706. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2016.5766>
5. *Abraham G.E.* // J. Steroid Biochem. 1975. V. 6. P. 261–270. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(75\)90141-7](https://doi.org/10.1016/0022-4731(75)90141-7)
6. *Relave F., Lefebvre R.C., Beaudoin S., Price C.* // Can. Vet. J. 2007. V. 48. P. 823–826.
7. *Stanczyk F.Z., Lee J.S., Santen R.J.* // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2007. V. 16. P. 1713–1719. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0765>
8. *Tate J., Ward G.* // Clin. Biochem. Rev. 2004. V. 25. P. 105–120.
9. *Hall M.D., Yasgar A., Peryea T., Braisted J.C., Jadhav A., Simeonov A., Coussens N.P.* // Methods Appl. Fluoresc. 2016. V. 4. P. 022001. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/4/2/022001>
10. *Smith D.S., Eremin S.A.* // Anal. Bioanal. Chem. 2008. V. 391. P. 1499–1507. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1897-z>
11. *Choi M.J., Choi J., Yoon D.Y., Park J., Eremin S.A.* // Biol. Pharm. Bull. 1997. V. 20. P. 309–314. <https://doi.org/10.1248/bpb.20.309>
12. *Колосова А.Ю., Еремин С.А., Гаврилова Е.М., Егоров А.М.* // Проблемы эндокринологии. 1994. Т. 40. С. 48–51. <https://doi.org/10.14341/probl12147>
13. *Hong J.Y., Choi M.J.* // Biol. Pharm. Bull. 2002. V. 25. P. 1258–1262. <https://doi.org/10.1248/bpb.25.1258>
14. *Quémener D., Davis T.P., Barner-Kowollik C., Stenzel M.H.* // Chem. Commun. 2006. V. 48. P. 5051–5053. <https://doi.org/10.1039/B611224B>
15. *Clède S., Lambert F., Sandt C., Kascakova S., Unger M., Harté E., Plamont M.-A., Saint-Forth R., Deniset-Besseau A., Guerouieb Z., Hirschmugl C., Lecomte S., Dazzi A., Vessières A., Policar C.* // Analyst. 2013. V. 138. P. 5627–5638. <https://doi.org/10.1039/C3AN00807J>
16. *Robinson S.W., Beer P.D.* // Org. Biomol. Chem. 2017. V. 15. P. 153–159. <https://doi.org/10.1039/c6ob02339h>
17. *Khomutov A.R., Vepsäläinen J.J., Shvetsov A.S., Hyvönen T., Keinänen T.A., Pustobaev V.N., Eloranta T.O., Khomutov R.M.* // Tetrahedron. 1996. V. 52. P. 13751–13766. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(96\)00836-8](https://doi.org/10.1016/0040-4020(96)00836-8)
18. *Sapozhnikova A., Misyurin V.A., Ryazantsev D.Y., Kokin E.A., Finashutina Yu.P., Alexeeva A.V., Ivanov I.A., Kocharovskaya M.V., Tikhonova N.A., Popova G.P., Alferova V.A., Ustinov A.V., Korshun V.A., Brylev V.A.* // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 22. P. 12845. <https://doi.org/10.3390/ijms222312845>

19. Kolmer D.K., Cool E.T. // *Chem. Rev.* 2017. V. 117. P. 10358–10376.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00090>
20. Adamczyk M., Chen Y.-Y., Grote J., Mattingly P.G. // *Steroids*. 1999. V. 64. P. 283–290.
[https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(99\)00004-5](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(99)00004-5)
21. Мухаметова Л.И., Крылов В.Б., Соловьев А.С., Яшунский Д.В., Матвеев А.Л., Тикунова Н.В., Еремин С.А., Нифантьев Н.Э. // *Известия Акад. наук. Сер. хим.* 2021. №. 5. С. 975–981.
22. Zhao Q., Bai Y., Wang H. // *Talanta*. 2020. V. 217. P. 121018.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121018>

Synthesis of Steroid Tracers with a Oxyme Ligation Method and Use Thereof in Fluorescent Polarisation Immunoassay

I. A. Prokhorenko^{*,#}, D. A. Glushchenko^{*}, E. L. Gulyak^{*}, I. V. Mikhura^{*}, V. A. Korshun^{*}, L. I. Mukhametova^{**}, and S. A. Eremin^{**}

[#] E-mail: prig67@mail.ru

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

^{**} Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1/3, Moscow, 119991 Russia

A method for the synthesis of ketosteroid oxime conjugates with a fluorescein (6-FAM) derivative connected via a short bifunctional aminooxypropyl linker is proposed. The conjugates were used as tracers for fluorescence polarization immunoassay (FPIA) with monoclonal antibodies. Stereoisomers by the oxime group were separated by preparative RP TLC and HPLC and tested in the FPIA method. Binding parameters of tracers with monoclonal antibodies (mAbs) to progesterone were studied. Tracers showed high efficiency in the analysis of steroid hormones, the detection limit of progesterone being lower than that for a previously described analog. The Z-isomer was found to be more sensitive in the FPIA analysis compared to the E-isomer.

Keywords: antibodies, steroid hormones, homogeneous immunoassay, fluorescent dyes, oxime ligation



УДК 547.728.1

АМИНОКУМАРАНОНЫ КАК ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ ИНДИКАТОРЫ АКТИВНОСТИ УРЕАЗЫ И ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА

© 2024 г. А. Ю. Смирнов*, **, Н. С. Балеева*, #, А. С. Мишин*,
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

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

Поступила в редакцию 27.04.2023 г.

После доработки 13.05.2023 г.

Принята к публикации 14.05.2023 г.

Синтезирован ряд 3-аминокумаранонов. Установлено, что они проявляют яркую хемилюминесценцию при различных условиях. Показано, что введение электронно-донорных групп в кумараноновый фрагмент и увеличение сопряженной π -системы кумаранонов может сместить положение максимумов люминесценции на 30–40 нм в длинноволновую область. Показано, что некоторые 3-аминокумараноны могут быть использованы для определения активности уреазы и перекиси водорода.

Ключевые слова: аминокумараноны, хемилюминесценция, перекись водорода, уреазы

DOI: 10.31857/S0132342324010066, **EDN:** OWILYG

ВВЕДЕНИЕ

Явление хемилюминесценции – испускание света веществом после окисления – известно очень давно [1]. Пожалуй, самое известное вещество, обладающее яркой хемилюминесценцией, – это люминол. Благодаря такому свойству он используется в биологических исследованиях для обнаружения ионов меди(II), железа(II) и цианидов [2], а также широко применяется в судебно-медицинской экспертизе для обнаружения следов крови (по железу) [3]. Данные аналиты

в определенных условиях (например, действие перекиси водорода на ионы железа в щелочной среде) могут вызывать выделение кислорода, который в основных условиях окисляет люминол, в результате чего и наблюдается яркое голубое свечение. Другим примером веществ, обладающих хемилюминесценцией, служат производные 3-аминокумаранона [4]. Хемилюминесценция таких веществ также требует наличия основания и кислорода, который присоединяется к депротонированной молекуле кумаранона (схема 1), после чего происходит окисление

Сокращения: ДБУ – диазабициклоундецен.

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

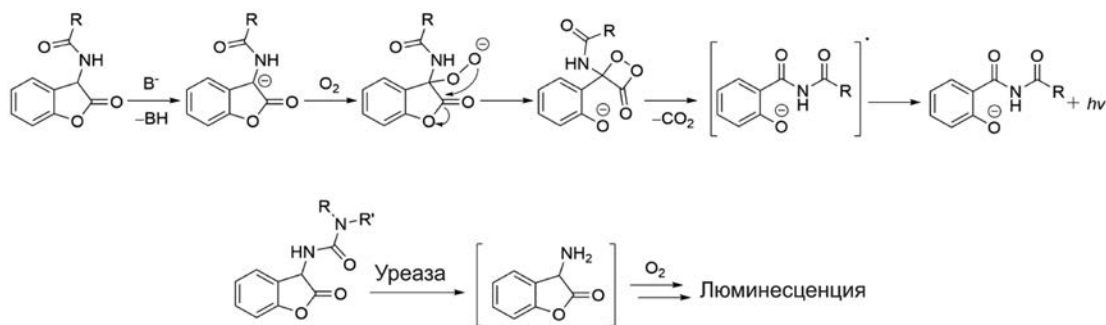


Схема 1. Механизм хемилюминесценции кумаранов при действии кислорода, а также возможный механизм хемилюминесценции под действием уреаз.

кумаранона до производного амида салициловой кислоты с отщеплением молекулы углекислого газа [5]. Этот процесс сопровождается люминесценцией в области 450–550 нм [6, 7]. Однако в литературе встречается не так много работ, посвященных синтезу разных 3-аминокумаранов и их применению на практике [8–10].

В данной работе мы изучили возможность использования 3-аминокумаранов для обнаружения перекиси водорода и определения активности уреазы. Уреаза – это фермент, катализирующий в живых организмах гидролиз мочевины до аммиака и углекислого газа. Активность таких ферментов часто необходимо детектировать при диагностике инфекционных заболеваний человека, например, при анализе на *Helicobacter pylori* [11]. В настоящее время для детекции уреазной активности применяются методы, основанные на использовании ион-селективных электродов, изотопных меток или различных колориметрических тест-систем [12], в то время как хемилюминесцентные методы обнаружения могли бы быть более точными и эффективными. Мы предположили, что введение в молекулы кумаранов фрагмента мочевины могло бы сделать их чувствительными к данному ферменту и вызвать их фермент-зависимую люминесценцию (схема 1). Таким образом, целью данной работы стал синтез

ряда 3-аминокумаранов, изучение их оптических свойств и возможности применения в качестве люминесцентных сенсоров перекиси водорода и определения активности уреазы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы синтезировали ряд производных 3-аминокумаран-2-она, который можно разделить на две группы: амидные производные и производные мочевины. Амидные производные – *N*-ацил-аминокумаран-2-оны – были получены из 4-метилбензиламида, дигидроксиуксусной кислоты и фенола (схема 2, соединения (**Ia–c**)). Исходные 4-метилбензиламид и дигидроксиуксусную кислоту растворяли в смеси уксусной и серной кислот, а через 30 мин перемешивания добавляли необходимый фенол. Полученный таким образом ациклический продукт выделяли, а затем при нагревании в уксусном ангидриде подвергали циклизации в лактоновый цикл. Производные второй группы – *N*-карбомоил-аминокумаран-2-оны – были синтезированы путем смешивания различных замещенных карбамидов с дигидроксиуксусной кислотой в трифторуксусной кислоте с последующим добавлением фенола (схема 2, синтез соединений (**II–VII**)). Так были получены производные симметрично-замещенной 1,3-диизопропилмочевины (соединения (**IIa–d**)) и произ-

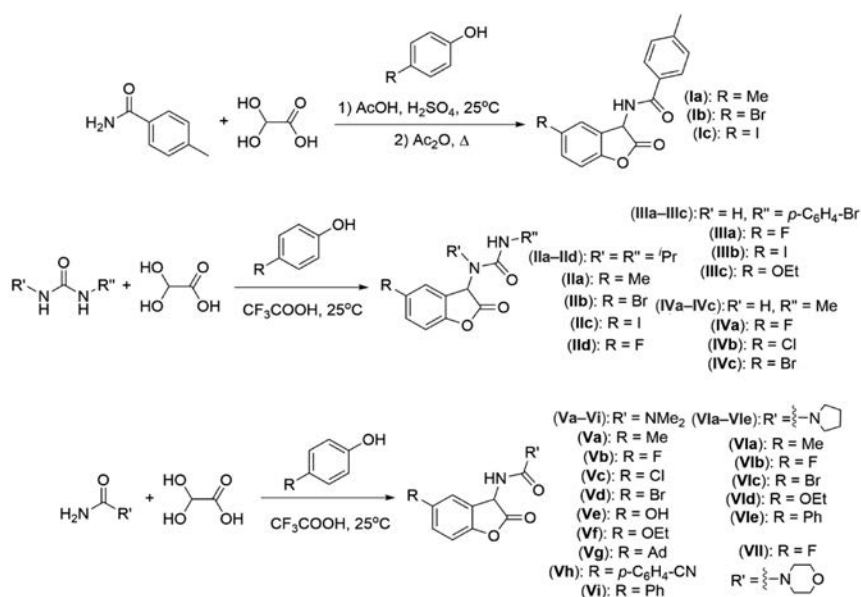


Схема 2. Схема синтеза соединений (I–VII).

водные несимметрично замещенных карбамидов, которые, в свою очередь, можно разделить на производные моно- (соединения (IIIa–c) и (IVa–c)) и ди- (соединения (V–VII)) замещенных карбамидов (схема 2).

Мы изучили оптические свойства всех полученных соединений. Оказалось, что все вещества характеризуются поглощением с максимумами в области 258–297 нм (табл. 1). Некоторые соединения, такие как соединения (IIa, d), (IIIa, c), (IVa, b), (Ve, f, h, i), (VIa, d) и (VII), также ярко флуоресцировали с максимумами в области 310–358 нм (табл. 1). Остальные же соединения характеризуются крайне слабой флуоресценцией.

Затем мы изучили хемилюминесцентные свойства полученных соединений. В первую очередь растворы кумаранонов подвергли действию сильного органического основания – диазабициклоундецена (ДБУ) – в присутствии воздуха и зарегистрировали спектры люминесценции. Такой подход наиболее часто используется для изучения хемилюминесценции кумаранонов [5, 6]. Это позволило нам выявить

соединения, которые обладают слабой люминесценцией в целом, и исключить их из дальнейших экспериментов. Так, мы установили, что производные 1,3-диизопропилмочевина (соединения (IIa–d)) в присутствии ДБУ не проявляют выраженной люминесценции. Остальные производные характеризуются заметной люминесценцией с максимумами в области ~420–500 нм (табл. 1). Наиболее интенсивную люминесценцию проявляют производные *N,N*-дизамещенных несимметричных мочевины (табл. 1, соединения (V–VII)). Заметным bathochromic смещением максимума люминесценции отличаются соединения с расширенной системой кратных связей или содержащие электронно-донорные группы (табл. 1, рис. 1). Также было установлено, что соединения, содержащие атомы хлора, фтора или брома, характеризуются наиболее продолжительной люминесценцией (табл. 1, рис. 2).

На следующем этапе работы мы подвергли соединения (Ia–c) и (III–VII) действию перекиси водорода в щелочной среде. Оказалось, что амидные производные (Ia–c) и производные монозамещен-

Таблица 1. Оптические свойства соединений (I–VII)

Соединение	Максимум абсорбции, нм	Максимум флуоресценции, нм	Хемилюминесценция		
			максимум, нм	интенсивность	продолжительность
(Ia)	~280	–	~450	+	быстро
(Ib)	~280	–	~480	+	медленно
(Ic)	~280	–	~500	+	медленно
(IIa)	284	312	–	–	–
(IIb)	288	–	–	–	–
(IIc)	288	–	–	–	–
(IId)	285	313	–	–	–
(IIIa)	283	314	~450	+	медленно
(IIIb)	286	–	~435	+	средне
(IIIc)	297	~330	~450	+	быстро
(IVa)	284	315	~440	+	медленно
(IVb)	286	316	~440	+	медленно
(IVc)	286	–	~450	+	медленно
(Va)	278	–	425	+++	быстро
(Vb)	278	–	427	+++	медленно
(Vc)	281	–	418	+++	медленно
(Vd)	281	–	419	++	медленно
(Ve)	296	~325	463	++	медленно
(Vf)	294	~325	456	+++	быстро
(Vg)	278	–	420	++	быстро
(Vh)	282	358	453	+++	средне
(Vi)	258	337	428	++	быстро
(VIa)	280	310	422	++	быстро
(VIb)	277	–	424	+++	медленно
(VIc)	281	–	418	++	медленно
(VId)	295	331	451	++	быстро
(VIe)	260	–	426	+++	быстро
(VII)	281	315	427	+++	медленно

Примечание: абсорбция и флуоресценция – в ацетонитриле, хемилюминесценция – в ацетонитриле и 0.1%-ном ДБУ. Относительная интенсивность наблюдаемого сигнала хемилюминесценции обозначена следующим образом: “+++” – максимальное значение; “++” – среднее значение; “+” – минимальное значение; “–” – сигнал не удалось детектировать из-за крайне низкой интенсивности; данная условная шкала применима для относительной оценки интенсивности хемилюминесценции только внутри каждого отдельного столбца.

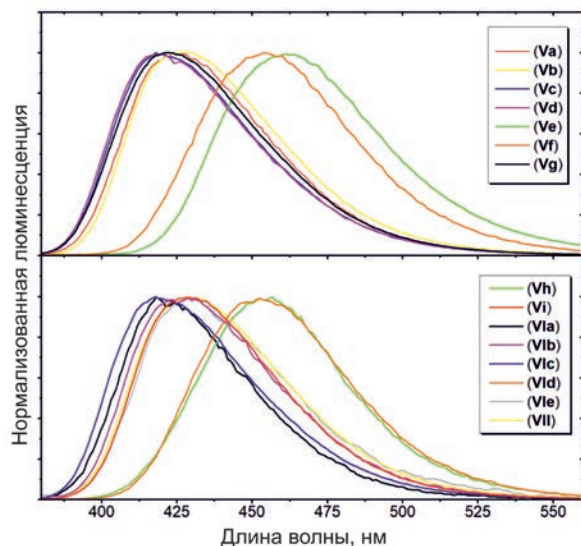


Рис. 1. Нормализованные спектры хемилюминесценции соединений (V–VII) в ацетонитриле после добавления 0.1% ДБУ.

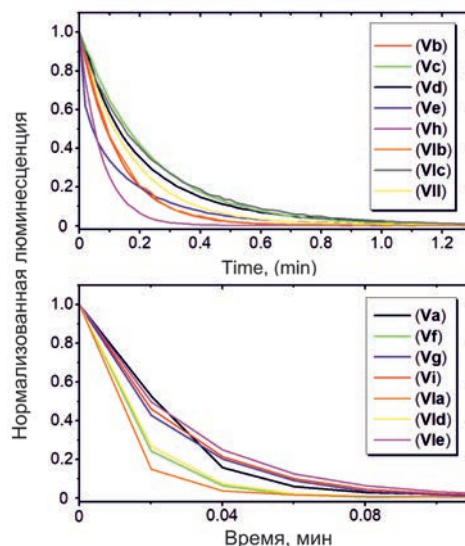


Рис. 2. Графики спада хемилюминесценции соединений (V–VII) в ацетонитриле после добавления 0.1% ДБУ.

ных несимметричных мочеви́н (**IIIa–c**) не проявляют заметной люминесценции в таких условиях, в то время как производные *N,N*-дизамещенных несимметричных мочеви́н (соединения (**V–VII**)) в отдельных случаях характеризуются значительной хемилюминесценцией (табл. 2). Наиболее интенсивная люминесценция под действием перекиси водорода оказалась характерна для соединений (**Vc**) и (**VII**) и производных бифенилфенола (соединения (**Vh, i**) и (**VIe**)). Интересно, что в некоторых случаях люминесценция наблюдалась в водно-щелочных растворах и в отсутствие перекиси водорода (табл. 2), что ранее не было установлено для амидных производных кумаранов и, вероятно, объясняется их меньшей основностью. Однако в любом случае такая люминесценция в водных растворах была на порядок менее интенсивной, чем люминесценция в ацетонитриле с ДБУ.

На заключительном этапе работы мы изучили хемилюминесцентные свойства синтезированных соединений в водных растворах в присутствии уреазы из *Canavalia ensiformis*. Было установлено, что в присутствии уреазы люминесцирует лишь небольшой набор соединений – (**Vc, f, g**) и (**VIa, e**) (табл. 2). Интенсивность наблюдаемой люминесценции оказалась на порядок меньше интенсивности люминесценции в водно-щелочных растворах и, соответственно, на два порядка меньше интенсивности люминесценции в ацетонитриле с ДБУ.

Таким образом, мы установили, что 3-аминокумараноны характеризуются значительной хемилюминесценцией в разных условиях. Некоторые соединения, такие как соединения (**Vc, f, g**) и (**VIa, e**), также проявляют яркую люминесценцию в присутствии уреазы, что позволяет говорить о возможности применения 3-аминокумаранонов в качестве индикаторов ее ферментативной активности.

Таблица 2. Хемилюминесцентные свойства соединений (**V–VII**) в воде

Соединение	В воде при pH 11 + 1% H ₂ O ₂			В воде при pH 11			В воде + уреазы		
	максимум, нм	интенсивность	продолжительность	максимум, нм	интенсивность	продолжительность	максимум, нм	интенсивность	продолжительность
(Va)	460	+	быстро	450	+	медленно	–	–	–
(Vb)	450	+	средне	450	+	медленно	–	–	–
(Vc)	450	+++	средне	~440	+	быстро	435	+++	быстро
(Vd)	445	+	быстро	445	+	средне	–	–	–
(Ve)	~480	+	быстро	–	–	–	–	–	–
(Vf)	475	++	быстро	470	+	средне	465	++	средне
(Vg)	435	++	средне	435	++	средне	440	++	медленно
(Vh)	450	+++	медленно	455	++	быстро	–	–	–
(Vi)	460	+++	средне	460	+++	медленно	–	–	–
(VIa)	445	+	быстро	~445	+	медленно	450	+	быстро
(VIb)	450	+	медленно	~450	+	медленно	–	–	–
(VIc)	440	++	быстро	~450	+	медленно	–	–	–
(VIId)	470	++	быстро	470	++	средне	–	–	–
(VIe)	455	+++	быстро	460	+++	средне	450	++	быстро
(VII)	455	+++	средне	~440	+	медленно	–	–	–

Примечание: относительная интенсивность наблюдаемого сигнала хемилюминесценции обозначена следующим образом: “+++” – максимальное значение; “++” – среднее значение; “+” – минимальное значение; “–” – сигнал не удалось детектировать из-за крайне низкой интенсивности; данная условная шкала применима для относительной оценки интенсивности хемилюминесценции только внутри каждого отдельного столбца.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование. Спектры ЯМР (δ , м.д.; J , Гц) регистрировали на приборах Fourier 300 (300 МГц; Bruker, США) и Avance III NMR (700 МГц; Bruker, США) в DMSO- d_6 (внутренний стандарт – Me₄Si). Спектры поглощения в УФ и видимом диапазоне регистрировали на спектрофотометре Cary 100 Bio (Varian, США). Спектры флуоресценции и хемилюминесценции регистрировали на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США). Температуры плавления определяли на приборе SMP 30 (Stuart Scientific, Великобритания) и не исправляли. Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на приборе TripleTOF 5600⁺ (AB Sciex, США) с ионизацией методом электроспрея (ESI). Напряжение на капилляре составляло 5.5 кВ в режиме регистрации положительных ионов и 4.5 кВ в режиме регистрации отрицательных ионов. Поток газа-носителя – 15 Arb, газа-распылителя – 25 Arb. Ввод проб производили с помощью шприцевого насоса со скоростью потока 20 мкл/мин. Для исследования хемилюминесцентных свойств использовали уреазу (КФ 3.5.1.5) из *Canavalia ensiformis* (type IX, powder, 50 000–100 000 ед./г) (Sigma-Aldrich, США) и перекись водорода (30%-ный водный раствор; Sigma-Aldrich, США).

Синтез *N*-(5-метил-2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)бензамидов (I). 2,2-Дигидроксиуксусную кислоту (184 мг, 2 ммоль) и 4-метилбензамид (270 мг, 2 ммоль) растворяли в смеси уксусной кислоты (5 мл) и концентрированной серной кислоты (0.5 мл). Полученный раствор перемешивали 30 мин при комнатной температуре. Затем к смеси добавляли соответствующий фенол (2 ммоль) и перемешивали в течение 12 ч. Далее реакционную смесь разбавляли водой (50 мл), полученную смесь экстрагировали хлористым метилом (3 × 50 мл). Объединенные органические вытяжки высушивали над безводным

сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении. Полученный остаток растворяли в уксусном ангидриде (5 мл), полученный раствор кипятили в течение 2 ч. Затем реакционную смесь выдерживали при –10°C в течение 10 ч. В случае отсутствия осадка реакционную смесь разбавляли диэтиловым эфиром (10 мл). Полученный осадок отфильтровывали, промывали диэтиловым эфиром (5 мл) и высушивали при пониженном давлении.

Синтез 1-(2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)мочевин (II–VII). 2,2-Дигидроксиуксусную кислоту (184 мг, 2 ммоль) и 4-метилбензамид (270 мг, 2 ммоль) растворяли в трифторуксусной кислоте (3 мл). Полученный раствор перемешивали 30 мин при комнатной температуре. Затем к смеси добавляли соответствующий фенол (2 ммоль) и перемешивали в течение 24 ч. Далее реакционную смесь упаривали при пониженном давлении. Полученный остаток растворяли в этилацетате (100 мл), промывали насыщенным раствором хлорида калия (3 × 50 мл) и упаривали при пониженном давлении. Целевые соединения выделяли из остатка после упаривания с помощью флэш-хроматографии (элюент – этилацетат и гексан, 1 : 1).

4-Метил-*N*-(5-метил-2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)бензамид (Ia). Белый порошок (213 мг, 38%); т. пл. 179–182°C. ¹H-ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): 2.27 (с, 3H, CH₃), 2.36 (с, 3H, CH₃), 5.48 (д, J 6.9, 1H, NHCH), 7.06–7.11 (м, 2H, Ar), 7.15 (д, J 8.4, 1H, Ar), 7.30 (м, J 7.8, 2H, Ar), 7.77 (д, J 8.2, 2H, Ar), 9.63 (д, J 7.1, 1H, NH). ¹³C-ЯМР (176 МГц, DMSO- d_6): 20.5, 20.9, 51.1, 109.9, 124.1, 126.3, 127.4, 129.0, 129.4, 129.7, 133.2, 142.0, 151.5, 165.7, 173.6. HRMS (ESI) m/z : найдено M 282.1128; рассчитано для C₁₇H₁₆NO₃⁺, $[M + H]^+$ 282.1125.

***N*-(5-Бром-2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)-4-метилбензамид (Ib).** Белый порошок (289 мг, 42%);

т. пл. 190–193°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 2.36 (с, 3H, CH_3), 5.52 (д, J 7.1, 1H, NHCH), 7.21 (д, J 8.4, 1H, Ar), 7.30 (д, J 8.0, 2H, Ar), 7.47 (с, 1H, Ar), 7.55 (дд, J 8.5, 2.2, 1H, Ar), 7.78 (д, J 8.2, 2H, Ar), 9.76 (д, J 7.1, 1H, NH). ^{13}C -ЯМР (176 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 21.0, 51.1, 112.5, 115.6, 126.5, 127.5, 129.0, 129.1, 129.4, 131.9, 142.1, 152.8, 165.9, 172.7. HRMS (ESI) m/z : найдено M 346.0078; рассчитано для $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{BrNO}_3^+$, $[\text{M} + \text{H}]^+$ 346.0073.

***N*-(5-Иод-2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)-4-метилбензамид (Ic).** Белый порошок (188 мг, 24%); т. пл. 202–205°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 2.36 (с, 3H, CH_3), 5.50 (д, J 7.1, 1H, NHCH), 7.08 (д, J 8.4, 1H, Ar), 7.31 (д, J 7.8, 2H, Ar), 7.59 (с, 1H, Ar), 7.71 (дд, J 8.5, 1.0, 1H, Ar), 7.76 (д, J 8.2, 2H, Ar), 9.67 (д, J 7.1, 1H, NH). ^{13}C -ЯМР (176 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 21.0, 50.8, 87.3, 112.8, 127.4, 129.0, 129.3, 129.4, 132.0, 137.7, 142.2, 153.3, 165.9, 172.6. HRMS (ESI) m/z : найдено M 393.9939; рассчитано для $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{INO}_3^+$, $[\text{M} + \text{H}]^+$ 393.9935.

1,3-Диизопропил-1-(5-метил-2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)мочевина (IIa). Белый порошок (228 мг, 39%); т. пл. 206–209°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 0.84 (д, J 6.7, 3H, CHCH_3), 1.13 (д, J 6.9, 3H, CHCH_3), 1.31–1.36 (м, 6H, CHCH_3 , CHCH_3), 2.20 (с, 3H, Ar- CH_3), 3.88 (септ, J 6.8, 1H, CHCH_3), 4.19 (септ, J 6.9, 1H, CHCH_3), 5.01 (уш.с., 1H, NCH), 6.69 (д, J 8.0, 1H, Ar), 6.90–7.08 (м, 2H, Ar), 9.51 (уш.с., 1H, NH). ^{13}C -ЯМР (176 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 19.2, 19.4, 19.5, 19.9, 20.5, 42.6, 44.2, 115.4, 121.5, 127.4, 130.3, 153.8, 155.1, 171.9. HRMS (ESI) m/z : найдено M 291.1710; рассчитано для $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_3^+$, $[\text{M} + \text{H}]^+$ 291.1703.

1-(5-Бром-2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)-1,3-диизопропилмочевина (IIb). Белый порошок (250 мг, 35%); т. пл. 210–213°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 0.85 (д, J 6.7, 3H, CHCH_3), 1.13 (д, J 7.1, 3H, CHCH_3), 1.31–1.35 (м, 6H, CHCH_3 , CHCH_3), 3.90

(септ, J 6.8, 1H, CHCH_3), 4.19 (септ, J 6.9, 1H, CHCH_3), 5.08 (уш.с., 1H, NCH), 6.76 (д, J 8.6, 1H, Ar), 7.36 (дд, J 8.6, 2.7, 1H, Ar), 7.47 (уш.с., 1H, Ar), 10.17 (с, 1H, NH). ^{13}C -ЯМР (176 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 19.2, 19.4, 19.5, 20.6, 42.7, 44.3, 109.6, 117.7, 124.4, 132.6, 155.1, 155.6, 171.3. HRMS (ESI) m/z : найдено M 355.0654; рассчитано для $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{BrN}_2\text{O}_3^+$, $[\text{M} + \text{H}]^+$ 355.0652.

1-(5-Иод-2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)-1,3-диизопропилмочевина (IIc). Белый порошок (223 мг, 28%); т. пл. 217–219°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 0.85 (д, J 6.9, 3H, CHCH_3), 1.13 (д, J 6.9, 3H, CHCH_3), 1.31–1.35 (м, 6H, CHCH_3 , CHCH_3), 3.88 (септ, J 6.8, 1H, CHCH_3), 4.19 (септ, J 6.9, 1H, CHCH_3), 5.05 (уш.с., 1H, NCH), 6.64 (д, J 8.4, 1H, Ar), 7.50 (дд, J 8.5, 2.2, 1H, Ar), 7.60 (уш.с., 1H, Ar), 10.14 (с, 1H, NH). ^{13}C -ЯМР (176 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 19.2, 19.4, 19.5, 20.6, 42.7, 44.3, 80.3, 106.2, 118.2, 124.9, 138.4, 153.8, 155.0, 171.3. HRMS (ESI) m/z : найдено M 403.0515; рассчитано для $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{IN}_2\text{O}_3^+$, $[\text{M} + \text{H}]^+$ 403.0513.

1-(5-Фтор-2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)-1,3-диизопропилмочевина (IIId). Белый порошок (173 мг, 29%); т. пл. 203–205°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 0.84 (д, J 6.9, 3H, CHCH_3), 1.14 (д, J 6.9, 3H, CHCH_3), 1.31–1.35 (м, 6H, CHCH_3 , CHCH_3), 3.92 (септ, J 6.9, 1H, CHCH_3), 4.19 (септ, J 6.9, 1H, CHCH_3), 5.08 (уш.с., 1H, NCH), 6.78 (дд, J 8.8, 4.6, 1H, Ar), 7.04 (дд, J 8.6, 3.1, 1H, Ar), 7.14 (уш.с., 1H, Ar), 9.82 (с, 1H, NH). ^{13}C -ЯМР (75 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 19.2, 19.4, 19.5, 20.6, 42.7, 44.3, 116.2 (д, J 22.4), 116.4 (д, J 6.0), 123.1 (д, J 6.7), 152.6, 155.0 (д, J 233.9), 155.2, 171.4. HRMS (ESI) m/z : найдено M 295.1458; рассчитано для $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{BrN}_2\text{O}_3^+$, $[\text{M} + \text{H}]^+$ 295.1452.

1-(4-Бромфенил)-3-(5-фтор-2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)мочевина (IIa). Белый порошок (314 мг, 43%); т. пл. 230–233°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 5.29 (с, 1H, NHCH), 6.82 (дд, J 8.9, 4.7, 1H, Ar), 7.06 (тд, J 8.6, 3.2, 1H, Ar), 7.20 (дд, J 9.0, 3.1,

1H, Ar), 7.35–7.38 (м, 2H, Ar), 7.69–7.72 (м, 2H, Ar), 8.65 (с, 1H, NHCH), 9.98 (с, 1H, NH-Ar). ^{13}C -ЯМР (176 МГц, DMSO- d_6): 57.4, 116.1 (д, J 22.8), 116.5 (д, J 8.0), 117.3 (д, J 23.4), 120.4, 123.3 (д, J 7.4), 128.5, 131.7, 131.9, 152.2 (д, J 1.7), 155.1 (д, J 234.7), 155.5, 171.8. HRMS (ESI) m/z : найдено M 364.9930; рассчитано для $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{BrFN}_2\text{O}_3^+$, $[M + \text{H}]^+$ 364.9932.

1-(4-Бромфенил)-3-(5-иод-2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)мочевина (IIIb). Белый порошок (313 мг, 33%); т. пл. 221–223°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): 5.27 (с, 1H, NHCH), 6.68 (д, J 8.4, 1H, Ar), 7.35 (д, J 8.6, 2H, Ar), 7.52 (дд, J 8.4, 2.3, 1H, Ar), 7.64 (д, J 2.1, 1H, Ar), 7.70 (д, J 8.6, 2H, Ar), 8.61 (с, 1H, NHCH), 10.31 (с, 1H, NH-Ar). ^{13}C -ЯМР (176 МГц, DMSO- d_6): 57.3, 80.5, 118.3, 120.4, 125.0, 128.4, 131.7, 131.9, 138.4, 139.2, 155.4, 155.8, 171.9. HRMS (ESI) m/z : найдено M 472.8991; рассчитано для $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{BrIN}_2\text{O}_3^+$, $[M + \text{H}]^+$ 472.8992.

1-(4-Бромфенил)-3-(5-этокси-2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)мочевина (IIIc). Белый порошок (173 мг, 22%); т. пл. 199–202°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): 1.29 (т, J 6.9, 3H, CH_2CH_3), 3.94 (кв, J 7.0, 2H, CH_2CH_3), 5.22 (с, 1H, NHCH), 6.71–6.75 (м, 1H, Ar), 6.77–6.81 (м, 1H, Ar), 6.87 (д, J 3.1, 1H, Ar), 7.35 (м, 2H, Ar), 7.69 (м, 2H, Ar), 8.60 (с, 1H, NHCH), 9.45 (с, 1H, NH-Ar). ^{13}C -ЯМР (176 МГц, DMSO- d_6): 14.8, 58.0, 63.5, 115.8, 116.3, 117.2, 120.3, 122.6, 128.4, 131.7, 132.0, 149.5, 151.2, 155.5, 172.2. HRMS (ESI) m/z : найдено M 391.0292; рассчитано для $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{BrN}_2\text{O}_4^+$, $[M + \text{H}]^+$ 391.0288.

1-(5-Фтор-2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)-3-метилмочевина (IVa). Белый порошок (183 мг, 41%); т. пл. 205–207°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): 2.86 (с, 3H, CH_3), 5.16 (с, 1H, NHCH), 6.79 (дд, J 8.8, 4.8, 1H, Ar), 6.98–7.07 (м, 2H, Ar), 8.31 (с, 1H, NHCH), 9.78 (с, 1H, NHCH $_3$). ^{13}C -ЯМР (176 МГц, DMSO- d_6): 24.2, 56.9, 115.8 (д, J 22.4), 116.4 (д, J 12.4), 116.5 (д, J 19.1),

123.4 (д, J 7.4), 152.1 (д, J 1.3), 155.1 (д, J 234.2), 157.3, 173.0. HRMS (ESI) m/z : найдено M 225.0670; рассчитано для $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{FN}_2\text{O}_3^+$, $[M + \text{H}]^+$ 225.0670.

1-(5-Хлор-2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)-3-метилмочевина (IVb). Белый порошок (163 мг, 34%); т. пл. 213–215°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): 2.87 (с, 3H, CH_3), 5.17 (с, 1H, NHCH), 6.82 (д, J 8.6, 1H, Ar), 7.20–7.25 (м, 2H, Ar), 8.30 (с, 1H, NHCH), 10.10 (с, 1H, NHCH $_3$). ^{13}C -ЯМР (176 МГц, DMSO- d_6): 24.2, 56.8, 117.2, 122.2, 124.1, 129.3, 129.8, 154.8, 157.2, 172.9. HRMS (ESI) m/z : найдено M 241.0377; рассчитано для $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{ClN}_2\text{O}_3^+$, $[M + \text{H}]^+$ 241.0374.

1-(5-Бром-2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)-3-метилмочевина (IVc). Белый порошок (152 мг, 27%); т. пл. 223–225°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): 2.86 (с, 3H, CH_3), 5.16 (с, 1H, NHCH), 6.77 (д, J 8.4, 1H, Ar), 7.28–7.40 (м, 2H, Ar), 8.29 (с, 1H, NHCH), 10.12 (с, 1H, NHCH $_3$). ^{13}C -ЯМР (75 МГц, DMSO- d_6): 24.2, 56.8, 109.7, 117.7, 124.6, 132.3, 132.7, 155.2, 157.3, 173.0. HRMS (ESI) m/z : найдено M 284.9871; рассчитано для $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{BrN}_2\text{O}_3^+$, $[M + \text{H}]^+$ 284.9869.

1,1-Диметил-3-(5-метил-2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)мочевина (Va). Белый порошок (167 мг, 36%); т. пл. 201–203°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): 2.28 (с, 3H, CH_3), 2.78 (с, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 5.10 (д, J 6.1, 1H, NHCH), 7.00 (д, J 8.0, 1H, Ar), 7.03 (с, 1H, Ar), 7.10 (д, J 8.4, 1H, Ar), 7.61 (д, J 7.1, 1H, NHCH). ^{13}C -ЯМР (176 МГц, DMSO- d_6): 20.5, 35.7, 51.8, 109.7, 124.0, 127.6, 128.9, 132.8, 151.3, 156.8, 174.7. HRMS (ESI) m/z : найдено M 235.1077; рассчитано для $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3^+$, $[M + \text{H}]^+$ 235.1077.

3-(5-Фтор-2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)-1,1-диметилмочевина (Vb). Белый порошок (161 мг, 34%); т. пл. 210–213°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): 2.78 (с, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 5.16 (д, J 6.7, 1H, NHCH), 7.09 (дд, J 7.6, 1.7, 1H, Ar), 7.11–7.18 (м, 2H, Ar), 7.67 (д, J 6.9, 1H, NHCH). ^{13}C -ЯМР (176 МГц, DMSO- d_6):

35.7, 52.3, 111.0 (д, J 25.1), 111.3 (д, J 8.4), 115.0 (д, J 24.4), 129.6 (д, J 8.7), 149.4, 156.8, 158.7 (д, J 239.3), 174.5. HRMS (ESI) m/z : найдено M 239.0827; рассчитано для $C_{11}H_{12}FN_2O_3^+$, $[M + H]^+$ 239.0826.

3-(5-Хлор-2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)-1,1-диметилмочевина (Vc). Белый порошок (189 мг, 37%); т. пл. 214–216°C. 1H -ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): 2.78 (с, 6H, $N(CH_3)_2$), 5.15 (д, J 6.7, 1H, $NHCH$), 7.17 (д, J 8.4, 1H, Ar), 7.26 (с, 1H, Ar), 7.36 (дд, J 8.5, 2.2, 1H, Ar), 7.68 (д, J 6.9, 1H, $NHCH$). ^{13}C -ЯМР (176 МГц, DMSO- d_6): 35.7, 52.0, 111.8, 123.5, 127.6, 128.5, 130.1, 152.1, 156.8, 174.0. HRMS (ESI) m/z : найдено M 255.0526; рассчитано для $C_{11}H_{12}ClN_2O_3^+$, $[M + H]^+$ 255.0531.

3-(5-Бром-2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)-1,1-диметилмочевина (Vd). Белый порошок (156 мг, 26%); т. пл. 221–223°C. 1H -ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): 2.78 (с, 6H, $N(CH_3)_2$), 5.16 (д, J 6.7, 1H, $NHCH$), 7.13 (д, J 8.6, 1H, Ar), 7.38 (с, 1H, Ar), 7.50 (д, J 9.9, 1H, Ar), 7.67 (д, J 6.7, 1H, $NHCH$). ^{13}C -ЯМР (176 МГц, DMSO- d_6): 35.7, 51.9, 112.3, 115.3, 126.3, 130.5, 131.4, 152.6, 156.8, 173.8. HRMS (ESI) m/z : найдено M 299.0027; рассчитано для $C_{11}H_{12}BrN_2O_3^+$, $[M + H]^+$ 299.0026.

3-(5-Гидрокси-2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)-1,1-диметилмочевина (Ve). Белый порошок (112 мг, 24%); т. пл. 230–233°C. 1H -ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): 2.78 (с, 6H, $N(CH_3)_2$), 5.07 (д, J 6.7, 1H, $NHCH$), 6.62 (д, J 2.3, 1H, Ar), 6.65 (дд, J 8.6, 2.5, 1H, Ar), 6.91 (д, J 8.6, 1H, Ar), 7.56 (д, J 6.9, 1H, $NHCH$), 9.22 (с, 1H, OH). ^{13}C -ЯМР (176 МГц, DMSO- d_6): 35.7, 52.3, 110.5, 110.7, 114.6, 128.4, 145.9, 153.8, 156.9, 174.9. HRMS (ESI) m/z : найдено M 237.0867; рассчитано для $C_{11}H_{13}N_2O_4^+$, $[M + H]^+$ 237.0870.

3-(5-Этокси-2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)-1,1-диметилмочевина (Vf). Белый порошок (99 мг, 19%); т. пл. 175–177°C. 1H -ЯМР (700 МГц,

DMSO- d_6): 1.30 (т, J 7.0, 3H, CH_2CH_3), 2.78 (с, 6H, $N(CH_3)_2$), 3.92–4.04 (м, 2H, CH_2CH_3), 5.11 (д, J 6.5, 1H, $NHCH$), 6.77 (д, J 1.7, 1H, Ar), 6.83 (дд, J 8.7, 2.6, 1H, Ar), 7.03 (д, J 8.8, 1H, Ar), 7.59 (д, J 6.9, 1H, $NHCH$). ^{13}C -ЯМР (176 МГц, DMSO- d_6): 14.6, 35.7, 52.3, 63.6, 110.2, 110.5, 114.0, 128.7, 147.1, 155.2, 156.9, 174.8. HRMS (ESI) m/z : найдено M 265.1185; рассчитано для $C_{13}H_{17}N_2O_4^+$, $[M + H]^+$ 265.1183.

3-(5-(Адамантан-1-ил)-2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)-1,1-диметилмочевина (Vg). Белый порошок (190 мг, 27%); т. пл. 243–245°C. 1H -ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): 1.67–1.77 (м, 6H, Ad), 1.84 (д, J 2.7, 6H, Ad), 2.05 (уш.с., 3H, Ad), 2.79 (с, 6H, $N(CH_3)_2$), 5.16 (д, J 6.1, 1H, $NHCH$), 7.05 (д, J 8.4, 1H, Ar), 7.20 (с, 1H, Ar), 7.31 (дд, J 8.7, 1.6, 1H, Ar), 7.57 (д, J 6.9, 1H, $NHCH$). ^{13}C -ЯМР (75 МГц, DMSO- d_6): 28.3, 35.6, 35.7, 36.1, 42.8, 52.0, 109.6, 119.8, 125.1, 127.2, 146.7, 151.3, 156.9, 174.8. HRMS (ESI) m/z : найдено M 355.2023; рассчитано для $C_{21}H_{27}N_2O_3^+$, $[M + H]^+$ 355.2016.

3-(5-(4-Цианофенил)-2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)-1,1-диметилмочевина (Vh). Белый порошок (114 мг, 18%); т. пл. 233–236°C. 1H -ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): 2.79 (с, 6H, $N(CH_3)_2$), 5.22 (д, J 6.7, 1H, $NHCH$), 7.28 (д, J 8.4, 1H, Ar), 7.59 (с, 1H, Ar), 7.69–7.73 (м, 2H, Ar, $NHCH$), 7.85 (м, 2H, Ar), 7.90 (м, 2H, Ar). ^{13}C -ЯМР (75 МГц, DMSO- d_6): 35.7, 51.9, 109.7, 110.8, 118.9, 122.2, 127.4, 127.9, 129.0, 132.9, 134.1, 144.1, 154.0, 156.9, 174.4. HRMS (ESI) m/z : найдено M 322.1192; рассчитано для $C_{18}H_{16}N_3O_3^+$, $[M + H]^+$ 322.1186.

3-(5-Фенил-2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)-1,1-диметилмочевина (Vi). Белый порошок (295 мг, 50%); т. пл. 183–185°C. 1H -ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): 2.79 (с, 6H, $N(CH_3)_2$), 5.21 (д, J 6.5, 1H, $NHCH$), 7.22 (д, J 8.4, 1H, Ar), 7.35 (т, J 7.3, 1H, Ar), 7.46 (т, J 7.7, 2H, Ar), 7.48 (с, 1H, Ar), 7.58–7.63 (м, 3H, Ar, $NHCH$), 7.68 (д, J 6.9, 1H, Ar). ^{13}C -ЯМР

(176 МГц, DMSO- d_6): 35.7, 51.9, 110.5, 121.8, 126.5, 127.2, 127.2, 128.6, 128.9, 136.1, 139.7, 153.1, 156.9, 174.5. HRMS (ESI) m/z : найдено M 297.1239; рассчитано для $C_{17}H_{17}N_2O_3^+$, $[M + H]^+$ 297.1234.

***N*-(5-Метил-2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)пирролидин-1-карбоксамид (VIa).** Белый порошок (181 мг, 35%); т. пл. 208–210°C. 1H -ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): 1.80 (уш.с., 4H, NCH_2CH_2 , NCH_2CH_2), 2.29 (с, 3H, CH_3), 3.20 (уш.с., 4H, NCH_2CH_2 , NCH_2CH_2), 5.12 (д, J 6.5, 1H, $NHCH$), 7.00 (д, J 8.0, 1H, Ar), 7.05 (с, 1H, Ar), 7.10 (д, J 8.2, 1H, Ar), 7.42 (д, J 7.1, 1H, $NHCH$). ^{13}C -ЯМР (75 МГц, DMSO- d_6): 20.5, 25.0, 45.3, 51.6, 109.7, 124.1, 127.6, 128.9, 132.8, 151.3, 155.1, 174.7. HRMS (ESI) m/z : найдено M 261.1237; рассчитано для $C_{14}H_{17}N_2O_3^+$, $[M + H]^+$ 261.1234.

***N*-(5-Фтор-2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)пирролидин-1-карбоксамид (VIb).** Белый порошок (180 мг, 34%); т. пл. 210–212°C. 1H -ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): 1.80 (уш.с., 4H, NCH_2CH_2 , NCH_2CH_2), 3.20 (уш.с., 4H, NCH_2CH_2 , NCH_2CH_2), 5.18 (д, J 6.7, 1H, $NHCH$), 7.10 (дд, J 7.5, 2.2, 1H, Ar), 7.12–7.18 (м, 2H, Ar), 7.47 (д, J 7.1, 1H, $NHCH$). ^{13}C -ЯМР (75 МГц, DMSO- d_6): 25.0, 45.3, 52.1, 111.1 (д, J 25.3), 111.3 (д, J 8.2), 115.0 (д, J 23.8), 129.7 (д, J 8.9), 149.4, 155.1, 158.7 (д, J 239.2), 174.5. HRMS (ESI) m/z : найдено M 265.0987; рассчитано для $C_{12}H_{14}FN_2O_3^+$, $[M + H]^+$ 265.0983.

***N*-(5-Бром-2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)пирролидин-1-карбоксамид (VIc).** Белый порошок (245 мг, 38%); т. пл. 238–240°C. 1H -ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): 1.80 (уш.с., 4H, NCH_2CH_2 , NCH_2CH_2), 3.20 (уш.с., 4H, NCH_2CH_2 , NCH_2CH_2), 5.18 (д, J 6.9, 1H, $NHCH$), 7.13 (д, J 8.4, 1H, Ar), 7.39 (д, J 1.9, 1H, Ar), 7.46–7.52 (м, 2H, Ar, $NHCH$). ^{13}C -ЯМР (75 МГц, DMSO- d_6): 24.9, 45.3, 51.7, 112.3, 115.4, 126.4, 130.5, 131.5, 152.6, 155.1, 173.9. HRMS (ESI) m/z : найдено

M 325.0185; рассчитано для $C_{13}H_{14}BrN_2O_3^+$, $[M + H]^+$ 325.0182.

***N*-(5-Этоксид-2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)пирролидин-1-карбоксамид (VIId).** Белый порошок (180 мг, 31%); т. пл. 197–199°C. 1H -ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): 1.30 (т, J 7.0, 3H, CH_2CH_3), 1.80 (уш.с., 4H, NCH_2CH_2 , NCH_2CH_2), 3.20 (уш.с., 4H, NCH_2CH_2 , NCH_2CH_2), 3.93–4.04 (м, 2H, CH_2CH_3), 5.14 (д, J 6.7, 1H, $NHCH$), 6.76–6.81 (м, 1H, Ar), 6.83 (дд, J 8.8, 2.7, 1H, Ar), 7.03 (д, J 8.8, 1H, Ar), 7.40 (д, J 7.1, 1H, $NHCH$). ^{13}C -ЯМР (75 МГц, DMSO- d_6): 14.7, 25.0, 45.3, 52.1, 63.6, 110.3, 110.6, 114.0, 128.7, 147.1, 155.2, 174.8. HRMS (ESI) m/z : найдено M 291.1345; рассчитано для $C_{15}H_{19}N_2O_4^+$, $[M + H]^+$ 291.1339.

***N*-(2-Оксо-5-фенил-2,3-дигидробензофуран-3-ил)пирролидин-1-карбоксамид (VIe).** Белый порошок (315 мг, 49%); т. пл. 210–212°C. 1H -ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): 1.79 (уш.с., 4H, NCH_2CH_2 , NCH_2CH_2), 3.22 (уш.с., 4H, NCH_2CH_2 , NCH_2CH_2), 5.24 (д, J 6.7, 1H, $NHCH$), 7.23 (д, J 8.2, 1H, Ar), 7.35 (т, J 7.3, 1H, Ar), 7.46 (т, J 7.6, 2H, Ar), 7.47–7.51 (м, 2H, Ar, $NHCH$), 7.58–7.64 (м, 3H, Ar). ^{13}C -ЯМР (75 МГц, DMSO- d_6): 24.9, 45.3, 51.7, 110.5, 122.0, 126.5, 127.2, 128.6, 129.0, 136.1, 139.7, 153.0, 155.2, 174.6. HRMS (ESI) m/z : найдено M 323.1383; рассчитано для $C_{19}H_{19}N_2O_3^+$, $[M + H]^+$ 323.1390.

***N*-(5-Фтор-2-оксо-2,3-дигидробензофуран-3-ил)морфолин-4-карбоксамид (VII).** Белый порошок (224 мг, 40%); т. пл. 205–207°C. 1H -ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): 3.23–3.27 (м, 4H, OCH_2 , OCH_2), 3.54 (т, J 4.8, 4H, NCH_2 , NCH_2), 5.22 (д, J 6.7, 1H, $NHCH$), 7.11 (дд, J 7.4, 1.7, 1H, Ar), 7.12–7.16 (м, 1H, Ar), 7.16–7.20 (м, 1H, Ar), 7.91 (д, J 6.9, 1H, $NHCH$). ^{13}C -ЯМР (75 МГц, DMSO- d_6): 43.7, 52.2, 65.7, 111.1 (д, J 26.1), 111.4 (д, J 8.2), 115.2 (д, J 23.8), 129.4 (д, J 8.9), 149.5, 156.3, 158.7 (д, J 239.2), 174.4. HRMS (ESI) m/z :

найдено M 281.0934; рассчитано для $C_{12}H_{14}FN_2O_4^+$, $[M + H]^+$ 281.0932.

Регистрация спектров хемилюминесценции.

Растворы соединений (**I–VII**) в ацетонитриле или дистиллированной воде смешивали с ДБУ, гидроксидом натрия (из 6 М раствора), перекисью водорода или уреазой (см. табл. 1 и 2) и сразу регистрировали спектр люминесценции. Конечная концентрация соединений (**I–VII**) составляла 0.2 мМ, ДБУ – 6.5 мМ, гидроксида натрия – 150 мМ, перекиси водорода – 300 мМ, уреазы – 1000 ед./мл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе синтезирована серия 3-аминокумаранонов. Установлено, что амидные производные (**Ia–c**) и производные несимметрично замещенных мочеви (**III–VII**) обладают значительной хемилюминесценцией при различных условиях. Присутствие электронно-донорных групп или заместителей, увеличивающих систему кратных связей в молекулах синтезированных соединений, приводит к заметному батохромному смещению максимума их люминесценции. На примере производных N,N -дизамещенных несимметричных мочеви (**V–VII**) показано, что интенсивность люминесценции снижается в ряду: ацетонитрил с ДБУ > вода (рН 11) с перекисью водорода > вода (рН 11) > вода с уреазой.

Показано, что производные N,N -дизамещенных несимметричных мочеви могут быть использованы для определения перекиси водорода, а соединения (**Vc, f, g**) и (**VIa, e**), благодаря яркой люминесценции в присутствии уреазы, могут также найти применение в качестве индикаторов ее ферментативной активности.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской

Федерации (проект № FFEU-2024-0055) в рамках базовой части государственного задания.

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. *Vasil'ev R.F., Tsaplev Yu.B.* // Russ. Chem. Rev. 2006. V. 75. P. 989–1002.
<https://doi.org/10.1070/RC2006v075n11ABEH003631>
2. *Khan P., Idrees D., Moxley M.A., Corbett J., Ahmad F., Figura G., Sly W., Waheed A., Hassan M.I.* // Appl. Biochem. Biotechnol. 2014. V. 173. P. 333–355.
<https://doi.org/10.1007/s12010-014-0850-1>
3. *Specht W.* // Ang. Chem. 1937. V. 50. P. 155–157.
<https://doi.org/10.1002/ange.19370500803>
4. *Matuszczak B.* // J. Prakt. Chem. 1998. V. 340. P. 20–25.
<https://doi.org/10.1002/PRAC.19983400104>
5. *Schramm S., Navizet I., Prasad Karothu D., Oesau P., Bensmann V., Weiss D., Beckert R., Naumov P.* // Phys. Chem. Chem. Phys. 2017. V. 19. P. 22852–22859.
<https://doi.org/10.1039/C7CP03425C>
6. *Ciscato L.F., Bartoloni F.H., Colavite A.S., Weiss D., Beckert R., Schramm S.* // Photochem. Photobiol. Sci. 2014. V. 13. P. 32–37.
<https://doi.org/10.1039/c3pp50345c>
7. *Schramm S., Weiss D., Navizet I., Roca-Sanjuán D., Brandl H., Beckert R., Helmar Görls H.* // Arkivoc. 2013. V. 3. P. 174–188.
<https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0014.314>
8. *Schramm S., Ciscato L.F., Oesau P., Krieg R., Richter J.F.,*

- Navizet I., Roca-Sanjuán D., Weiss D., Beckert R.* // Chem. 2016. V. 4. P. 678–681.
Arkivoc. 2015. V. 5. P. 44–59.
<https://doi.org/10.3998/ark.5550190.p009.044>
9. *Krieg R., Hoffmann B., Weiss D., Biskup C.* // HCA. 2019. V. 102. P. e1800243.
<https://doi.org/10.1002/hlca.201800243>
10. *Schramm S., Navizet I., Naumov P., Nath N.K., Berraud-Pache R., Oesau P., Weiss D., Beckert R.* // Eur. J. Org. Chem. 2016. V. 4. P. 678–681.
<https://doi.org/10.1002/ejoc.201501515>
11. *Mobley H.L., Island M.D., Hausinger R.P.* // Microbiol. Rev. 1995. V. 59. P. 451–480.
<https://doi.org/10.1128/mr.59.3.451-480.1995>
12. *Dore M.P., Pes G.M.* // J. Clin. Med. 2021. V. 10. P. 2091.
<https://doi.org/10.3390/jcm10102091>

Aminocoumaranones As Chemiluminescence Indicators of the Urease Activity and Hydrogen Peroxide

A. Yu. Smirnov^{*, **}, N. S. Baleeva^{*, #}, A. S. Mishin^{*}, Yu. A. Bogdanova^{*}, and M. S. Baranov^{*, **}

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

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

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

We report a series of 3-aminocoumaranones possess significant chemiluminescence under various conditions. The introduce of the electron-donor groups in the coumaranone moiety and increasing of the conjugated π -system of coumaranones allow to shift 30–40 nm of the chemiluminescence maxima to the long-wavelength region. We showed that some 3-aminocoumaranones can be used for detecting of the urease and hydrogen peroxide.

Keywords: aminocoumaranones, chemiluminescence, hydrogen peroxide, ureases



УДК 547.782

ФЛУОРОГЕННЫЕ КРАСИТЕЛИ БЕЛКА NanoLuc НА ОСНОВЕ АРИЛИДЕН-ИМИДАЗОЛОНОВ

© 2024 г. Э. Р. Зайцева*, **, Ю. А. Богданова*, Н. С. Балеева*, #,
А. Ю. Смирнов*, **, М. С. Баранов*, **

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

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

Поступила в редакцию 15.05.2023 г.

После доработки 16.06.2023 г.

Принята к публикации 17.06.2023 г.

Синтезирован ряд *орто*-замещенных арилиден-имидазолонов и их стирольных производных. Установлено, что такие соединения можно применять в качестве флуорогенных лигандов для белка NanoLuc. В паре с этим белком они могут быть использованы для генетически-кодируемого мечения живых клеток во флуоресцентной микроскопии, что было показано путем окрашивания клеток НЕК293.

Ключевые слова: арилиден-имидазолон, флуороген-активирующий белки, флуорогены

DOI: 10.31857/S0132342324010073, **EDN:** OWHWEG

ВВЕДЕНИЕ

Последнее время во флуоресцентной микроскопии все чаще и чаще используются так называемые флуорогенные красители [1]. Красители такого типа в свободном виде в растворе не обладают выраженной флуоресценцией. Однако яркость флуоресценции этих веществ многократно увеличивается в результате их связывания с определенными объектами. Среди всего множества флуорогенных красителей отдельное место занимают арилиден-имидазолон – хромофоры флуоресцентных белков [2]. Они используются для флуорогенного окрашивания нуклеиновых кис-

лот [3, 4] и других клеточных компонентов [5, 6], а также крайне эффективны в качестве лигандов для флуороген-активирующих белков [7, 8]. Такие белки, в отличие от флуоресцентных белков, не формируют внутренний хромофор из собственных аминокислот, а образуют флуоресцентный комплекс с флуорогеном, который добавляется в систему извне [9]. Так, ранее на основе арилиден-имидазолонов и их стирольных производных была синтезирована линейка разноцветных флуорогенов для популярного флуороген-активирующего белка FAST и его мутантных форм [10, 11].

Сокращения: GFP – зеленый флуоресцентный белок; PEI – полиэтиленимин.

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

Недавно нами было показано, что гетероциклические производные таких красителей также могут быть использованы для флуорогенного мечения белка NanoLuc [12]. В настоящей работе мы решили расширить возможность их применения в данной роли.

Белок NanoLuc (одна из самых известных люцифераз) катализирует реакцию биолюминесценции – процесс окисления органических молекул, сопровождающийся испусканием света [13]. Белок NanoLuc был разработан на основе люциферазы глубоководной креветки *Oplophorus gracilirostris*. Субстрат люциферазы глубоководной креветки – целентеразин, а белка NanoLuc – фуримазин. Эти соединения по строению очень похожи на такие арилиден-имидазолы, как хромофоры белков GFP и Kaede (схема 1). Ранее такое структурное подобие позволило нам выявить несколько флуорогенных лигандов,

содержащих в арилиденовой части пиррольную группу (схема 1), которые связывались с белком NanoLuc с образованием флуоресцентных комплексов [12]. Анализ полученных данных позволил предположить, что аналогичными свойствами будут обладать не только гетероциклические производные, но и соединения, содержащие в арилиденовом фрагменте бензольное кольцо с донорными заместителями в *орто*-положении. В связи с этим целью настоящей работы стал синтез ряда таких более отдаленных производных хромофоров белков GFP и Kaede и анализ возможности их применения в качестве флуорогенов для белка NanoLuc.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы мы синтезировали ряд арилиден-имидазолонов, содержащих разные заместители в *орто*-положении бензилиденового

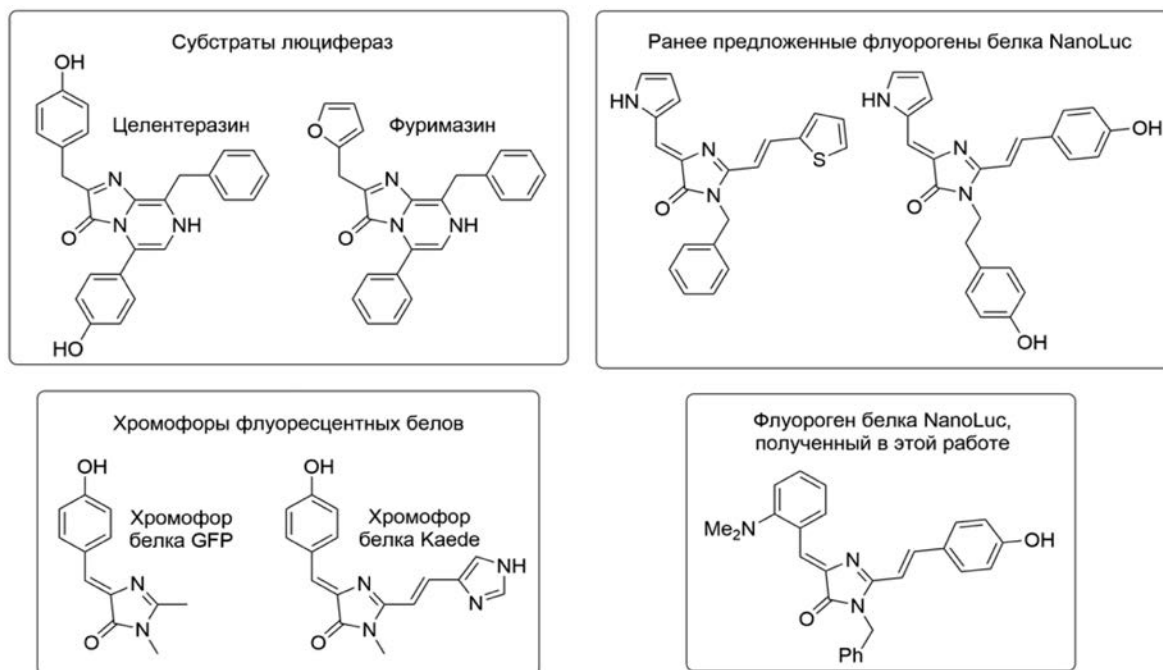


Схема 1. Структуры субстратов люцифераз, хромофоры флуоресцентных белков, ранее предложенные нами флуорогены для белка NanoLuc и флуороген для белка NanoLuc, полученный в этой работе.

фрагмента (схема 2, соединения (I)). Производные (I) были получены при взаимодействии исходных ароматических альдегидов с иминоэфиром и бензил-амином или тирамином. Затем из полученных арилиден-имидазолонов были синтезированы производные хромофора белка Kaede (схема 2, соединения (II)). Имидазолон конденсировали с бензальдегидом или 4-гидроксibenзальдегидом в пиридине в присутствии пиперидина.

Далее были изучены флуорогенные свойства всех полученных соединений. Сначала мы проверили, будет ли увеличиваться интенсивность флуоресценции соединений в присутствии белка NanoLuc. Было установлено, что для подавляющего большинства соединений добавление белка приводит лишь к незначительному (примерно трехкратному) усилению флуоресцентного сигнала. Однако для пары производных, содержащих диметиламинную или метоксигруппы в *орто*-положении, а также бензиль-

ный заместитель в имидазолоновом кольце и гидроксигруппу в *пара*-положении стирольного фрагмента (соединения (IIc) и (IIf)), наблюдалось заметное увеличение интенсивности флуоресценции более чем на порядок.

Далее мы изучили, насколько эффективно эти два соединения связываются с белком NanoLuc. Оказалось, что соединение с диметиламинной группой в *орто*-положении бензилиденового фрагмента (соединение (IIc)) обладает высокой аффинностью ($K_d = 0.05$ мкМ), в то время как производное, содержащее в том же положении метоксигруппу (соединение (IIf)), характеризуется очень слабым связыванием с белком ($K_d > 5$ мкМ).

На финальном этапе данного исследования мы изучили возможность окрашивания живых клеток с использованием соединения (IIc), которое обладает высокой аффинностью к белку и формирует комплекс с наиболее интенсивной флуоресценцией. Для этой

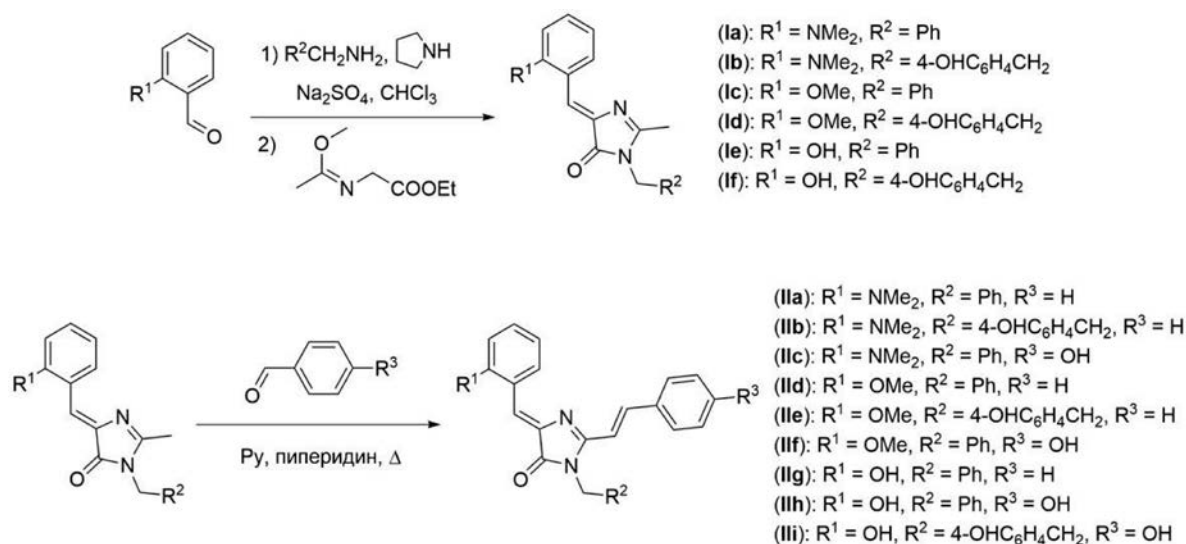


Схема 2. Схема синтеза соединений (I) и (II).

цели были использованы клетки НЕК293, трансфицированные конструкцией NanoLuc-H2B. Конструкт экспрессировался клетками как единая полипептидная цепь под управлением CMV-промотора. Гистоны H2B – типичная модель для изучения генетически-кодируемого флуоресцентного мечения, т.к. в этом случае наблюдается достаточно яркий сигнал с четкой локализацией. Более того, такая локализация флуороген-активирующего белка также позволяет сразу оценить проницаемость красителя, поскольку для выраженного мечения ему необходимо проникнуть в ядро клетки. Мы показали, что при добавлении предложенного нами соединения (IIc) к соответствующим образом трансфицированным клеткам наблюдается выраженное целевое мечение при отсутствии сильного фонового окрашивания (рис. 1).

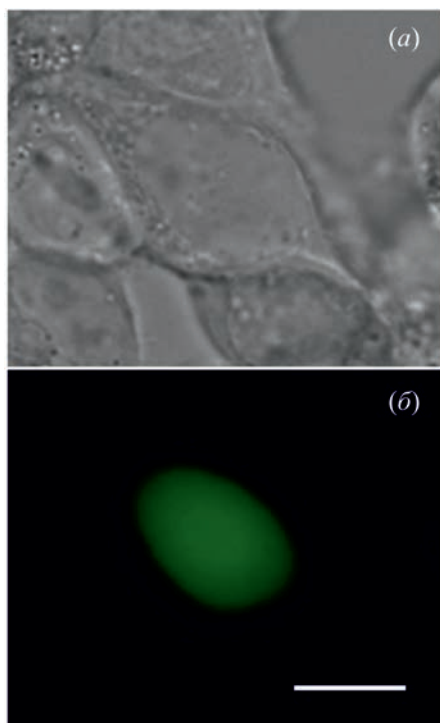


Рис. 1. Микрофотографии живых клеток НЕК293, экспрессирующих локализирующуюся в ядре конструкцию H2B-NanoLuc в присутствии 5 мкМ соединения (IIc): (a) – изображение, полученное в проходящем свете; (б) – та же область, визуализированная с использованием куба TxDyeRed. Масштабный отрезок – 10 мкм.

Таким образом, мы показали, что производные хромофора Kaede на основе *орто*-замещенных бензилиден-имидазолонов и белок NanoLuc могут быть использованы для флуоресцентного мечения живых клеток во флуоресцентной микроскопии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование. Спектры ЯМР (δ , м.д.; J , Гц) регистрировали на приборах Fourier 300 (300 МГц; Bruker, США) и Avance III NMR (700 МГц; Bruker, США) в DMSO- d_6 (внутренний стандарт – Me $_4$ Si), спектры флуоресценции – на 96-луночном микропланшетном ридере Tecan Infinite 200 Pro M Nano (Tecan Trading AG, Швейцария). Температуры плавления определяли на приборе SMP 30 (Stuart Scientific, Великобритания) и не исправляли. Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на приборе TripleTOF 5600 $^+$ (AB Sciex, США) с ионизацией методом электроспрея (ESI). Напряжение на капилляре 5.5 кВ в режиме регистрации положительных ионов, 4.5 кВ в режиме регистрации отрицательных ионов. Поток газа-носителя – 15 Arb, газа-аспылителя – 25 Arb. Ввод проб производили с помощью шприцевого насоса со скоростью потока 20 мкл/мин.

Синтез (Z)-5-бензилиден-3-арил-2-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-онов (I). Соответствующий ароматический альдегид (10 ммоль) растворяли в хлороформе (50 мл) и смешивали с соответствующим амином (10.5 ммоль), пирролидином (7 мг, 0.1 ммоль) и безводным сульфатом натрия (10 г). Полученную смесь перемешивали в течение 72 ч при комнатной температуре, отфильтровывали и высушивали над безводным сульфатом натрия. Растворитель упаривали при пониженном давлении. Полученный остаток смешивали с этил((метокси)амино)ацетатом (12 ммоль), при необходимости добавляли 5–10 мл метанола для равномерного смешивания. Полученную смесь перемешивали 72 ч при комнатной темпера-

туре. Растворитель упаривали при пониженном давлении. Полученный продукт дополнительно очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент хлороформ–этанол 20 : 1).

Синтез (Z)-5-бензилиден-3-арил-2-((E)-стирил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-онов (II). К раствору соответствующего (Z)-5-бензилиден-3-арил-2-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-она (1 ммоль) в пиридине (5 мл) добавляли пиперидин (0.02 мл) и соответствующий ароматический альдегид (5 ммоль). Полученную реакционную смесь кипятили 5–48 ч, прохождение реакции отслеживали с помощью тонкослойной хроматографии (элюент хлороформ–этанол 20 : 1). Далее реакционную смесь упаривали при пониженном давлении. Полученный остаток растворяли в этилацетате (35 мл), промывали фосфатным буфером (pH 7.0, 3 × 15 мл), насыщенным раствором хлорида калия (3 × 25 мл), высушивали над безводным сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении. Полученный продукт дополнительно очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент хлороформ–этанол 20 : 1).

(Z)-5-(2-(Диметиламино)бензилиден)-3-бензил-2-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (Ia). Желтый порошок (2.07 г, 65%); т. пл. 135–137°C. ¹H-ЯМР (700 МГц, DMSO-*d*₆): 8.57 (дд, *J* 7.9, 1.2, 1H), 7.33–7.40 (м, 4H), 7.30 (т, *J* 7.4, 1H), 7.26 (д, *J* 7.2, 2H), 7.14 (д, *J* 8.0, 1H), 7.08 (т, *J* 7.5, 1H), 4.84 (с, 2H), 2.73 (с, 6H), 2.27 (с, 3H). ¹³C-ЯМР (176 МГц, DMSO-*d*₆): 170.1, 162.8, 154.8, 137.3, 136.7, 132.7, 130.8, 128.8, 127.5, 126.9, 126.6, 122.3, 122.0, 118.4, 45.0, 43.0, 15.5. HRMS (ESI) *m/z*: найдено *M* 320.1753; рассчитано для C₂₀H₂₂N₃O⁺, [*M* + H]⁺ 320.1757.

(Z)-5-(2-(Диметиламино)бензилиден)-3-(4-гидроксибензил)-2-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (Ib). Желтый порошок (2.55 г, 73%); т. пл. 172–174°C. ¹H-ЯМР (700 МГц, DMSO-*d*₆): 9.22

(с, 1H), 8.52 (дд, *J* 7.8, 1.3, 1H), 7.34 (т, *J* 8.5, 1H), 7.25 (с, 1H), 7.13 (д, *J* 7.6, 1H), 7.06 (т, *J* 7.5, 1H), 6.98 (д, *J* 8.4, 2H), 6.68 (д, *J* 8.6, 2H), 3.72 (т, *J* 7.2, 2H), 2.75 (т, *J* 7.1, 2H), 2.72 (с, 6H), 2.07 (с, 3H). ¹³C-ЯМР (75 МГц, DMSO-*d*₆): 170.0, 163.2, 156.0, 154.7, 137.6, 132.7, 130.7, 129.8, 128.3, 126.7, 122.1, 121.5, 118.4, 115.3, 45.0, 42.1, 33.5, 15.0. HRMS (ESI) *m/z*: найдено *M* 350.1862; рассчитано для C₂₁H₂₄N₃O₂⁺, [*M* + H]⁺ 350.1863.

(Z)-5-(2-(Метоксибензилиден)-3-бензил-2-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (Ic). Желтый порошок (2.40 г, 79%); т. пл. 123–125°C. ¹H-ЯМР (700 МГц, DMSO-*d*₆): 8.72 (дд, *J* 7.8, 1.1, 1H), 7.39–7.43 (м, 2H), 7.37 (т, *J* 7.5, 2H), 7.30 (т, *J* 7.3, 1H), 7.24 (д, *J* 7.4, 2H), 7.09 (д, *J* 8.2, 1H), 7.04 (т, *J* 7.5, 1H), 4.83 (с, 2H), 3.89 (с, 3H), 2.27 (с, 3H). ¹³C-ЯМР (75 МГц, DMSO-*d*₆): 169.9, 163.3, 158.5, 137.9, 136.7, 132.2, 132.0, 128.8, 127.5, 126.8, 122.2, 120.6, 118.7, 111.3, 55.7, 43.0, 15.6. HRMS (ESI) *m/z*: найдено *M* 307.1483; рассчитано для C₁₉H₁₉N₂O₂⁺, [*M* + H]⁺ 307.1441.

(Z)-5-(2-(Метоксибензилиден)-3-(4-гидроксибензил)-2-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (Id). Желтый порошок (2.18 г, 65%); т. пл. 105–107°C. ¹H-ЯМР (700 МГц, DMSO-*d*₆): 9.22 (с, 1H), 8.68 (дд, *J* 7.7, 1.4, 1H), 7.40 (т, *J* 8.7, 1H), 7.30 (с, 1H), 7.08 (д, *J* 8.4, 1H), 7.02 (т, *J* 7.5, 1H), 6.96 (д, *J* 8.4, 2H), 6.67 (д, *J* 8.4, 2H), 3.89 (с, 3H), 3.72 (т, *J* 7.1, 2H), 2.74 (т, *J* 7.1, 2H). ¹³C-ЯМР (75 МГц, DMSO-*d*₆): 169.8, 163.7, 158.4, 156.0, 138.1, 132.1, 131.8, 129.8, 128.2, 122.3, 120.6, 117.7, 115.3, 111.3, 55.7, 42.0, 33.4, 15.1. HRMS (ESI) *m/z*: найдено *M* 337.1551; рассчитано для C₂₀H₂₁N₂O₃⁺, [*M* + H]⁺ 337.1547.

(Z)-5-(2-Гидроксибензилиден)-3-бензил-2-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (Ie). Желтый порошок (2.57 г, 88%); т. пл. 136–138°C. ¹H-ЯМР (700 МГц, DMSO-*d*₆): 11.49 (с, 1H), 8.26 (д, *J* 7.8, 1H), 7.37 (т, *J* 7.5, 2H), 7.34 (с, 1H), 7.32–7.27 (м, 2H),

7.26 (д, J 7.0, 2H), 6.91–6.85 (м, 2H), 4.85 (с, 2H), 2.29 (с, 3H). ^{13}C -ЯМР (75 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 169.0, 161.6, 157.7, 136.6, 135.5, 133.7, 132.6, 128.8, 127.6, 126.9, 122.8, 120.4, 119.4, 116.7, 43.1, 15.5. HRMS (ESI) m/z : найдено M 293.1287; рассчитано для $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2^+$, $[M + \text{H}]^+$ 293.1285.

(Z)-5-(2-Гидроксibenзилиден)-3-(4-гидрокси-фенэтил)-2-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (If). Желтый порошок (2.19 г, 68%); т. пл. 221–223°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 11.71 (с, 1H), 9.23 (с, 1H), 8.15 (д, J 7.0, 1H), 7.27 (т, J 8.6, 1H), 7.23 (с, 1H), 6.97 (д, J 8.5, 2H), 6.90–6.83 (м, 2H), 6.67 (д, J 8.5, 2H), 3.74 (т, J 7.1, 2H), 2.75 (т, J 7.1, 2H), 2.06 (с, 3H). ^{13}C -ЯМР (75 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 168.7, 161.7, 157.6, 156.0, 135.4, 133.9, 132.6, 129.9, 128.2, 122.5, 120.3, 119.3, 116.9, 115.3, 42.2, 33.4, 14.9. HRMS (ESI) m/z : найдено M 323.1396; рассчитано для $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3^+$, $[M + \text{H}]^+$ 323.1390.

5-((Z)-2-(Диметиламино)бензилиден)-3-бензил-2-((E)-стирил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (Па). Оранжевый порошок (360 мг, 89%); т. пл. 153–155°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 8.75 (дд, J 7.9, 1.7, 1H), 7.97 (д, J 15.6, 1H), 7.76 (д, J 6.6, 2H), 7.46–7.40 (м, 4H), 7.40–7.35 (м, 3H), 7.32 (д, J 7.0, 2H), 7.27 (т, J 7.2, 1H), 7.22 (д, J 15.7, 1H), 7.16 (д, J 8.3, 1H), 7.14 (т, J 7.2, 1H), 5.08 (с, 2H), 2.76 (с, 6H). ^{13}C -ЯМР (75 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 170.3, 159.4, 155.0, 140.2, 138.0, 137.3, 134.9, 133.0, 131.0, 130.2, 129.0, 128.8, 128.3, 127.5, 127.0, 126.9, 122.5, 122.3, 118.5, 113.9, 45.2, 42.6. HRMS (ESI) m/z : найдено M 408.2069; рассчитано для $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}^+$, $[M + \text{H}]^+$ 408.2070.

5-((Z)-2-(Диметиламино)бензилиден)-3-(4-гидроксифенэтил)-2-((E)-стирил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (Пб). Красный порошок (326 мг, 54%); т. пл. 136–138°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 9.13 (с, 1H), 8.70 (дд, J 7.7, 1.4, 1H), 7.88 (д, J 16.0, 1H), 7.75 (д, J 7.2, 2H), 7.47–7.43 (м, 3H), 7.37 (т, J 7.9,

1H), 7.30 (с, 1H), 7.15 (д, J 8.3, 1H), 7.12 (т, J 7.8, 1H), 7.02 (д, J 8.5, 2H), 6.93 (д, J 15.7, 1H), 6.64 (д, J 8.5, 2H), 3.98 (т, J 7.0, 2H), 2.78 (т, J 7.2, 2H), 2.75 (с, 6H). ^{13}C -ЯМР (176 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 170.1, 159.7, 156.0, 154.9, 139.7, 138.2, 135.1, 132.9, 130.8, 130.0, 129.9, 128.9, 128.3, 128.1, 127.1, 122.2, 121.7, 118.4, 115.1, 113.8, 45.1, 41.2, 34.1. HRMS (ESI) m/z : найдено M 438.2172; рассчитано для $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_2^+$, $[M + \text{H}]^+$ 438.2176.

5-((Z)-2-(Диметиламино)бензилиден)-3-бензил-2-((E)-4-гидроксистирил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (Пс). Красный порошок (233 мг, 55%); т. пл. ~200°C с разложением. ^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 10.04 (с, 1H), 8.75 (дд, J 7.7, 1.7, 1H), 7.89 (д, J 15.7, 1H), 7.61 (д, J 8.8, 2H), 7.38–7.33 (м, 4H), 7.31 (д, J 6.8, 2H), 7.27 (т, J 7.3, 1H), 7.16–7.11 (м, 2H), 6.96 (д, J 15.6, 1H), 6.82 (д, J 8.7, 2H), 5.05 (с, 2H), 2.75 (с, 6H). ^{13}C -ЯМР (75 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 170.4, 159.9, 159.8, 154.8, 140.6, 138.3, 137.4, 132.9, 130.7, 130.4, 128.7, 127.5, 127.3, 126.9, 126.2, 122.3, 121.1, 118.4, 115.9, 110.0, 45.1, 42.5. HRMS (ESI) m/z : найдено M 424.2016; рассчитано для $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_2^+$, $[M + \text{H}]^+$ 424.2020.

5-((Z)-2-Метоксибензилиден)-3-бензил-2-((E)-стирил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (Пд). Оранжевый порошок (183 мг, 47%); т. пл. 196–198°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 8.91 (дд, J 7.8, 1.8, 1H), 7.99 (д, J 15.8, 1H), 7.77 (д, J 6.5, 2H), 7.48 (с, 1H), 7.46–7.41 (м, 4H), 7.36–7.34 (м, 2H), 7.30 (д, J 7.1, 2H), 7.26 (т, J 7.2, 1H), 7.21 (д, J 15.8, 1H), 7.13–7.09 (м, 2H), 5.08 (с, 2H), 3.92 (с, 3H). ^{13}C -ЯМР (75 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 170.1, 159.8, 158.7, 140.5, 138.6, 137.3, 134.9, 132.5, 132.1, 130.3, 129.0, 128.8, 128.3, 127.5, 126.9, 122.7, 120.9, 118.7, 113.8, 111.3, 55.8, 42.6. HRMS (ESI) m/z : найдено M 395.1757; рассчитано для $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_2^+$, $[M + \text{H}]^+$ 395.1754.

5-((Z)-2-Метоксибензилиден)-3-(4-гидрокси-фенэтил)-2-((E)-стирил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (Пе). Оранжевый порошок (209 мг, 49%); т. пл. 153–155°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 9.12 (с, 1H), 8.88 (дд, J 7.7, 1.9, 1H), 7.90 (д, J 15.7, 1H), 7.76 (д, J 7.2, 2H), 7.48–7.41 (м, 4H), 7.37 (с, 1H), 7.11–7.07 (м, 2H), 7.00 (д, J 8.6, 2H), 6.92 (д, J 15.6, 1H), 6.63 (д, J 8.5, 2H), 3.98 (т, J 7.0, 2H), 3.91 (с, 3H), 2.77 (т, J 7.1, 2H). ^{13}C -ЯМР (75 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 169.9, 160.1, 158.5, 156.0, 140.0, 138.7, 135.0, 132.4, 131.9, 130.1, 129.9, 128.9, 128.4, 128.0, 122.8, 120.8, 117.8, 115.2, 113.7, 111.2, 55.8, 41.2, 34.1. HRMS (ESI) m/z : найдено M 425.1859; рассчитано для $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_3^+$, $[M + \text{H}]^+$ 425.1860.

5-((Z)-2-Метоксибензилиден)-3-бензил-2-((E)-4-гидроксистирил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (Пф). Красный порошок (98 мг, 24%); т. пл. ~230°C с разложением. ^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 8.91 (дд, J 8.2, 1.7, 1H), 7.91 (д, J 15.5, 1H), 7.58 (д, J 8.8, 2H), 7.41 (тд, J 8.1, 1.8, 1H), 7.38 (с, 1H), 7.35 (т, J 7.6, 2H), 7.29 (д, J 7.0, 2H), 7.26 (т, J 7.3, 1H), 7.09 (д, J 8.0, 2H), 6.89 (д, J 15.6, 1H), 6.77 (д, J 8.7, 2H), 5.04 (с, 2H), 3.91 (с, 3H). ^{13}C -ЯМР (176 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 170.2, 160.3, 158.4 (2C), 141.2, 138.8, 137.3, 132.3, 131.6, 130.5 (2C), 128.7, 127.4, 126.9, 123.0, 120.8, 116.9, 116.3, 111.2 (2C), 55.8, 42.5. HRMS (ESI) m/z : найдено M 411.1708; рассчитано для $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_3^+$, $[M + \text{H}]^+$ 411.1703.

5-((Z)-2-Гидроксибензилиден)-3-бензил-2-((E)-стирил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (Пг). Красный порошок (167 мг, 44%); т. пл. 148–150°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 11.54 (с, 1H), 8.43 (дд, J 8.2, 1.9, 1H), 7.90 (д, J 15.8, 1H), 7.77 (д, J 6.4, 2H), 7.47–7.42 (м, 4H), 7.37–7.34 (м, 2H), 7.33–7.30 (м, 3H), 7.27 (т, J 7.2, 1H), 7.24 (д, J 15.8, 1H), 6.94 (д, J 8.1, 2H), 5.10 (с, 2H). ^{13}C -ЯМР (75 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 169.2, 157.9 (2C), 140.5, 137.2, 136.4, 134.8, 133.8, 132.7, 130.4, 129.0, 128.8, 128.4, 127.5, 126.9,

122.6, 121.0, 119.6, 116.6, 113.5, 42.7. HRMS (ESI) m/z : найдено M 381.1599; рассчитано для $\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2^+$, $[M + \text{H}]^+$ 381.1598.

5-((Z)-2-Гидроксибензилиден)-3-бензил-2-((E)-4-гидроксистирил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (Пх). Красный порошок (218 мг, 55%); т. пл. ~200°C с разложением. ^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 8.29 (д, J 7.6, 1H), 7.79 (д, J 15.4, 1H), 7.58 (д, J 8.6, 2H), 7.35 (т, J 7.6, 2H), 7.25–7.32 (м, 5H), 6.86–6.93 (м, 3H), 6.78 (д, J 8.6, 2H), 5.06 (с, 2H). ^{13}C -ЯМР (75 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 169.1, 161.6, 158.6, 158.0, 141.1, 137.3, 136.1, 133.7, 132.4, 130.6, 128.7, 127.5, 126.9, 125.1, 121.8, 121.2, 119.0, 117.0, 116.3, 108.5, 42.6. HRMS (ESI) m/z : найдено M 397.1552; рассчитано для $\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3^+$, $[M + \text{H}]^+$ 397.1547.

5-((Z)-2-Гидроксибензилиден)-3-(4-гидрокси-фенэтил)-2-((E)-4-гидроксистирил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (Пи). Красный порошок (350 мг, 83%); т. пл. ~210°C с разложением. ^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 12.11 (с, 1H), 10.07 (с, 1H), 9.13 (с, 1H), 8.18 (д, J 8.0, 1H), 7.70 (д, J 15.6, 1H), 7.61 (д, J 8.8, 2H), 7.29 (т, J 6.8, 1H), 7.20 (с, 1H), 7.01 (д, J 8.5, 2H), 6.92–6.87 (м, 2H), 6.85 (д, J 8.7, 2H), 6.70 (д, J 15.6, 1H), 6.63 (д, J 8.5, 2H), 3.98 (т, J 7.1, 2H), 2.77 (т, J 7.0, 2H). ^{13}C -ЯМР (75 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 168.6, 160.0, 158.0, 157.6, 156.0, 140.7, 136.0, 134.2, 132.5, 130.5, 129.9, 128.0, 126.0, 121.9, 121.0, 119.5, 117.0, 115.9, 115.2, 109.3, 41.4, 34.0. HRMS (ESI) m/z : найдено M 427.1646; рассчитано для $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4^+$, $[M + \text{H}]^+$ 427.1652.

Выделение и очистка белка NanoLuc. Препарат выделенного белка NanoLuc получали согласно описанной ранее методике [12].

Регистрация спектров флуоресценции. Увеличение интенсивности флуоресценции определяли как отношение интенсивности флуоресценции раствора хромофора в смеси с раствором белка к интен-

сивности флуоресценции раствора хромофора. Растворы соединений (I) и (II) в фосфатном буфере смешивали с раствором белка NanoLuc и через 15 мин регистрировали спектры флуоресценции. Конечная концентрация соединений (I) и (II) составляла 1 мкМ, белка NanoLuc – 10 мкМ. Величину K_d определяли спектрофлуориметрическим титрованием раствора белка NanoLuc растворами хромофора с различной концентрацией. Концентрация белка NanoLuc составляла 0.1 мкМ.

Получение ДНК-конструкций. Кодировущая последовательность NanoLuc была синтезирована фирмой Клонинг Фасилити (Россия) и получена в плазмиде Level 0, созданной для клонирования MoClo. Для локализации в клеточном ядре последовательность, кодирующую NanoLuc [13], сливали с последовательностью белка-гистона H2B (UniProt ID: P06899), используя технологию Golden Gate согласно синтаксису MoClo. Конструкт был помещен между CMV-промотором и последовательностью SV40 poly(A). Для клонирования использовали эндонуклеазу рестрикции Eco31I (BsaI) (Thermo Scientific, США) и T4 ДНК-лигазу (Евроген, Россия). Правильность полученных конструкций была подтверждена секвенированием по Сэнгеру (Евроген, Россия).

Поддержание и трансфекция клеточной культуры НЕК293. Клеточная культура эмбриональных почек человека НЕК293 была получена из коллекции клеточных линий ИБХ РАН, отдел биофотоники. Клетки культивировали в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки (ПанЭко, Россия) и смеси антибиотиков пенициллина (50 ед./мл) и стрептомицина (50 мкг/мл) (ПанЭко, Россия), DMEM с данными добавками далее именуется полной DMEM. Для культивирования использовали CO₂-инкубатор (Sanyo, Япония) при 5% CO₂, 37°C. Перед трансфекцией клетки высевали на

культуральные чашки диаметром 35 мм со стеклянным дном (SPL Life Sciences, Корея). Трансфекцию проводили при помощи полиэтиленимина (PEI; Polysciences, США). За 1 ч до начала трансфекции культуральную среду заменяли на 500 мкл Opti-MEM (ПанЭко, Россия). Далее в расчете на одну культуральную чашку смешивали 6 мкл PEI с 250 мкл Opti-MEM, 2 мкг плазмидной ДНК также смешивали с 250 мкл Opti-MEM в отдельном эппендорфе, инкубировали в течение 5 мин и смешивали два полученных раствора, после чего смесь инкубировали еще 20 мин и по каплям добавляли в культуральные чашки. Клетки инкубировали в присутствии смеси PEI–ДНК в течение 3 ч, затем заменяли среду на полную DMEM.

Микроскопия. Через 48 ч после трансфекции полную DMEM заменяли на среду для визуализации, состоящую из раствора Хэнкса (ПанЭко, Россия) с добавлением 20 мМ HEPES (Sigma, Германия) и 5 мкМ соединения (IIc) (разведено из 20 мМ стокового раствора в DMSO (Sigma-Aldrich, США)), и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Микроскопию проводили при помощи инвертированного микроскопа BZ-9000 (Япония, Keyence), оснащенного масляным объективом 60× PlanApo 1.40 NA (США, Nikon) и кубом TxRed, длины волн возбуждающего света 560/40, фильтр 594, длины волн детектируемого света 630/60. Полученные изображения обрабатывали в программе Fiji (<https://fiji.sc/>), в которой с помощью плагина “background subtraction from ROI” из изображения вычитали фоновые значения интенсивности флуоресценции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе был синтезирован ряд арилиден-имидазолонов – производных хромофоров белка

GFP и Kaede, содержащих *орто*-заместители в арилиденом фрагменте. Было установлено, что соединения (**IIc**) и (**IIf**) способны связываться с белком NanoLuc и формировать флуоресцентные комплексы. Показано, что соединение (**IIc**), содержащее диметиламинный заместитель в бензилиденом фрагменте и гидроксигруппу в стирольном фрагменте, можно применять для флуорогенного мечения белка NanoLuc. В паре соединение (**IIc**) и белок NanoLuc могут быть использованы в качестве генетически-кодируемой флуоресцентной метки для окрашивания живых клеток, что было продемонстрировано на примере окрашивания клеток НЕК293.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-73-10195).

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. Klymchenko A.S. // *Acc. Chem. Res.* 2017. V. 50. P. 366–375.
<https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00517>
2. Baleeva N.S., Baranov M.S. // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2016. V. 52. P. 444–446.
<https://doi.org/10.1007/s10593-016-1909-4>
3. Filonov G.S., Moon J.D., Svensen N., Jaffrey S.R. // *J. Am. Chem. Soc.* 2014. V. 136. P. 16299–16308.
<https://doi.org/10.1021/ja508478x>
4. Feng G., Luo C., Yi H., Yuan L., Lin B., Luo X., Hu X., Wang H., Lei C., Nie Z. // *Nucleic Acids Res.* 2017. V. 45. P. 10380–10392.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx803>
5. Ermakova Y.G., Bogdanova Y.A., Baleeva N.S., Zaitseva S.O., Guglya E.B., Smirnov A.Y., Zagudaylova M.B., Baranov M.S. // *Dyes and Pigments.* 2019. V. 170. P. 107550.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107550>
6. 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>
7. Dou J., Vorobieva A.A., Sheffler W., Doyle L.A., Park H., Bick M.J., Mao B., Foight G.W., Lee M.Y., Gagnon L.A., Carter L., Sankaran B., Ovchinnikov S., Marcos E., Huang P.S., Vaughan J.C., Stoddard B.L. // *Nature.* 2018. V. 561. P. 485–491.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0509-0>
8. Povarova N.V., Bozhanova N.G., Sarkisyan K.S., Gritcenko R., Baranov M.S., Yampolsky I.V., Lukyanov K.A., Mishin M.S. // *J. Mater. Chem.* 2016. V. 4. P. 3036–3040.
<https://doi.org/10.1039/C5TC03931B>
9. Bruchez M.P. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2015. V. 27. P. 18–23.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.05.014>
10. Myasnyanko I.N., Gavrikov A.S., Zaitseva S.O., Smirnov A.Y., Zaitseva E.R., Sokolov A.I., Malyshevskaya K.K., Baleeva N.S., Mishin A.S., Baranov M.S. // *Chem. Eur. J.* 2021. V. 27. P. 3986–3990.
<https://doi.org/10.1002/chem.202004760>

11. *Goncharuk M.V., Baleeva N.S., Nolde D.E., Gavrikov A.S., Mishin A.V., Mishin A.S., Sosorev A.Y., Arseniev A.S., Goncharuk S.A., Borshchevskiy V.I., Efremov R.G., Mineev K.S., Baranov M.S. // Commun. Biol. 2022. V. 5. P. 706. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03662-9>*
12. *Bogdanova Y.A., Zaitseva E.R., Smirnov A.Y., Baleeva N.S., Gavrikov A.S., Myasnyanko I.N., Goncharuk S.A., Kot E.F., Mineev K.S., Mishin A.S., Baranov M.S. // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. P. 7958. <https://doi.org/10.3390/ijms24097958>*
13. *Hall M.P., Unch J., Binkowski B.F., Valley M.P., Butler B.L., Wood M.G., Otto P., Zimmerman K., Vidugiris G., Machleidt T., Robers M.B., Benink H.A., Eggers C.T., Slater M.R., Meisenheimer P.L., Klaubert D.H., Fan F., Encell L.P., Wood K.V. // ACS Chem. Biol. 2012. V. 7. P. 1848–1857. <https://doi.org/10.1021/cb3002478>*

Aryliden-Imidazolones As Fluorogens of NanoLuc Protein

**E. R. Zaitseva^{*, **}, Yu. A. Bogdanova^{*}, N. S. Baleeva^{*, #},
A. Yu. Smirnov^{*, **}, and M. S. Baranov^{*, **}**

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

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

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

We report a series of *orto*-substituted aryliden-imidazolones and their derivatives containing styrene moiety. These compounds can be used like ligands of NanoLuc protein. Together with NanoLuc this fluorogens can be used for genetically encoded labeling in fluorescence microscopy, as demonstrated by staining HEK293 cells.

Keywords: *aryliden-imidazolones, fluorogen-activating proteins, fluorogens*



УДК 547.789

2,5-ДИМЕТОКСИБЕНЗИЛИДЕНРОДАНИН И ЕГО АЦИКЛИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ КАК СЕЛЕКТИВНЫЕ ФЛУОРОГЕННЫЕ КРАСИТЕЛИ ЛИПИДНЫХ КАПЕЛЬ ЖИВЫХ КЛЕТОК¹

© 2024 г. С. А. Краснова*, **, #, Ю. А. Богданова*, А. И. Соколов*, ***, И. Н. Мяснянко*, ***, А. Ю. Смирнов*, ***, 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

** Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Россия, 101000 Москва, ул. Мясницкая, 20

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

Поступила в редакцию 18.05.2023 г.

После доработки 18.06.2023 г.

Принята к публикации 19.06.2023 г.

Синтезирована серия арилиденроданинов и их ациклических аналогов, изучены флуоресцентные свойства полученных соединений. Показано, что производные, содержащие 2,5-диметоксибензилиденный фрагмент или аналогичные группы, характеризуются заметным варьированием квантового выхода флуоресценции в зависимости от свойств среды. Установлено, что два полученных соединения – диметоксибензилиденроданин и диметоксибензилиденмалононитрил – могут выступать в роли селективных флуорогенных красителей для липидных капель (адипосом) живых клеток для мечения в условиях флуоресцентной микроскопии.

Ключевые слова: роданины, флуорогены, адипосомы, липидные капли, флуоресценция

DOI: 10.31857/S0132342324010089, **EDN:** OWGMCP

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день флуоресцентная микроскопия остается одним из ключевых методов анализа в биологических исследованиях. За многие годы было разработано множество способов маркирования живых объектов с применением самых разных флуоресцентных красителей. Однако в последнее время особой популярностью на фоне классических маркеров пользуются флуорогенные метки. Они не имеют собственной выраженной флуоресценции в свободном виде, но приобретают ее при связывании

с целевым объектом [1–3]. Благодаря этому такие красители могут быть намного более селективными и фотостабильными, чем классические метки с постоянной флуоресценцией. За последние годы мы показали, что арилиденимидазолы могут использоваться в качестве флуорогенных маркеров, проявляющих заметную флуоресценцию при взаимодействии с определенными клеточными органеллами [4, 5].

Причина слабой флуоресценции свободных имидазоловых красителей – возможность безызлу-

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

Автор для связи: (тел.: +7 (964) 865-16-24; эл. почта: svetlanakr2002@mail.ru).

чательного сброса энергии возбуждения, возникающего за счет подвижности арилиденового фрагмента [6]. Однако введение в него различных заместителей (примеры представлены на схеме 1) приводит к возрастанию квантового выхода флуоресценции в неполярных и апротонных средах, что позволяет окрашивать отдельные органеллы специ-

фическим образом при совпадении физико-химических свойств красителя и мембран органелл [7].

В рамках данной работы мы предложили новую группу родственных структур, которые способны проявлять выраженную флуоресценцию в липидных каплях (адипосомах).

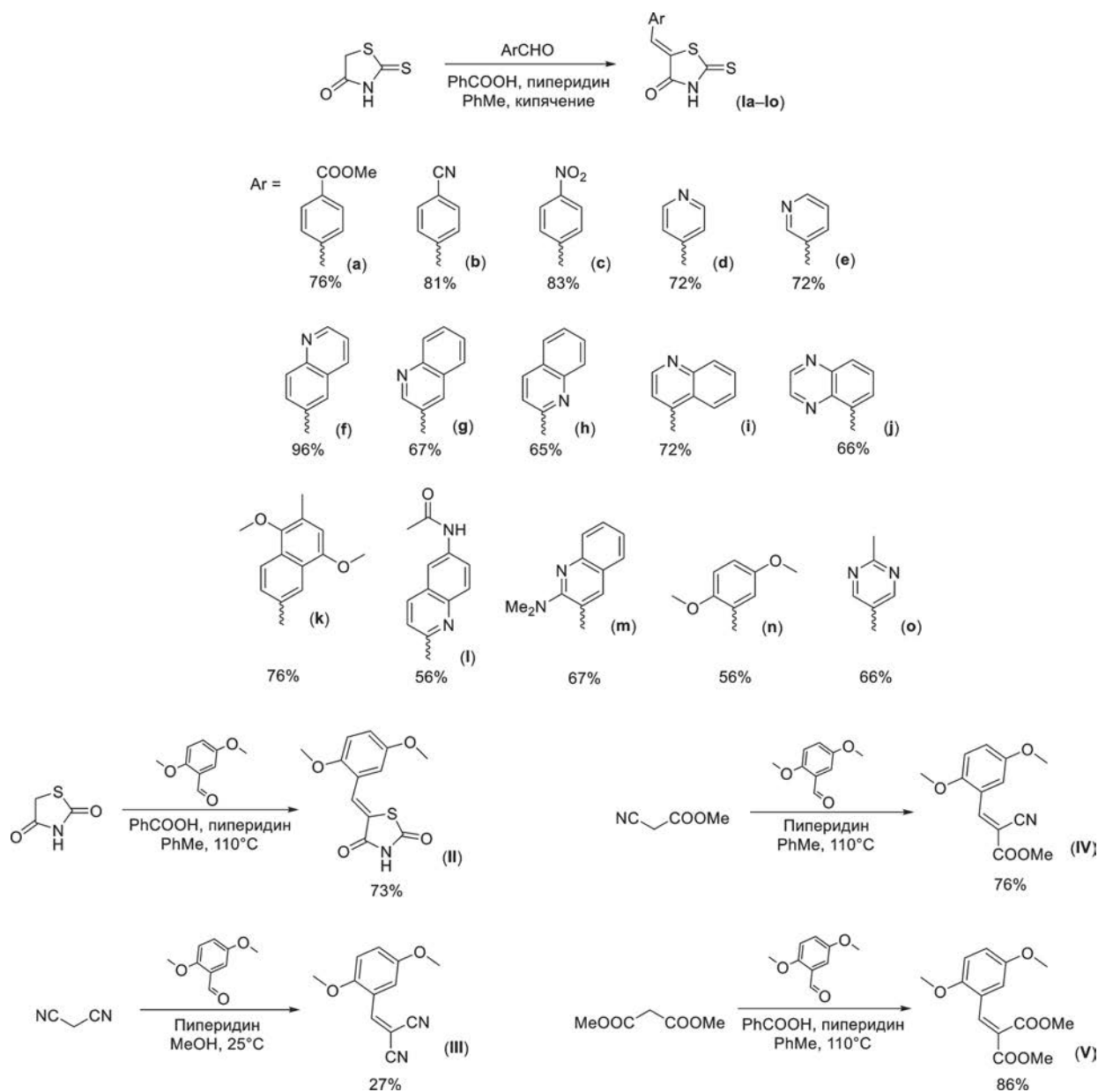


Схема 1. Синтез арилиденроданинов (Ia–Io) и их ациклических аналогов (II–V).

Данные элементы клеток стали рассматриваться как полноценные органеллы со своей особой структурой не так давно [8]. Адипосомы присутствуют во всех типах клеток, служат для хранения нейтральных липидов, занимающих особое место в метаболизме в качестве источников энергии и строительных блоков при формировании мембран и медиаторов клеточных сигналов [9]. При этом механизм биогенеза липидных капель и динамика их поведения до сих пор изучены недостаточно подробно [10]. Липидные капли контактируют с большей частью клеточных органелл, включая ЭПР, аппарат Гольджи, митохондрии, лизосомы и пероксисомы [11], через специальные белковые комплексы и влияют на функционирование этих органелл [12–15]. Кроме того, адипосомы играют важную роль в предотвращении липотоксичности [16] и окислительного стресса [17], которые развиваются при избыточном накоплении клеткой свободных жирных кислот. Эти нарушения ассоциируются с диабетом второго типа и неалкогольной жировой болезнью печени [18]. К другим патологиям, связанным с липидными каплями, относят воспаление [19], эпилепсию [20] и злокачественные новообразования [21]. Отдельно стоит упомянуть о возможности использования адипосом в качестве реперных маркеров при проведении криофлуоресцентной корреляционной микроскопии [22]. Таким образом, липидные капли представляют собой интересный объект для флуоресцентного мечения и разработки новых специфических красителей.

В данной работе с опорой на известные закономерности мы предложили ряд новых соединений – арилиденроданинов и их ациклических аналогов – веществ, подобных исследованным нами ранее имидазолоновым флуорогенным красителям, в структуры которых были введены фрагменты, отвечающие

за появление флуоресценции в липофильном окружении.

Цель настоящего исследования – разработка методики синтеза таких арилиденроданинов и их ациклических аналогов, изучение оптических свойств полученных соединений, а также проверка возможности использования данных производных в качестве флуорогенных меток для окрашивания различных органелл в живых клетках.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Арилиденроданины (**Ia–Io**) синтезировали по модифицированной литературной методике [23] реакцией различных ароматических альдегидов с роданином (схема 1), а далее исследовали оптические свойства полученного ряда соединений (см. дополнительные материалы и табл. 1). Мы установили, что максимумы поглощения находятся в области 355–425 нм, а максимумы испускания – в области 405–618 нм. Однако заметная флуоресценция оказалась характерна только для тех соединений, которые содержали два электронодонорных заместителя в арилиденовом фрагменте (**Ik**, **Im**, **In**). Ранее мы уже показали, что арилиденимидазолон, содержащий две метоксигруппы в *орто*- и *мета*-положениях (как у соединения (**In**)), способен окрашивать эндоплазматический ретикулум [24], поэтому для такого заместителя мы синтезировали производные тиазолидиндиона (**II**), а также малонового эфира и нитрила (**III–V**) [25–28] (схема 1).

Изучение оптических свойств соединений (**II–V**) показало, что максимумы поглощения и испускания лежат в тех же областях, что и в случае арилиденроданинов (**Ia–Io**), однако квантовый выход флуоресценции для производных (**II–V**) оказался значительно выше (табл. 1).

Таблица 1. Оптические свойства серии арилиденроданинов (**Ia–Io**) и их ациклических аналогов (**II–V**) в разных растворителях

Соединение	Растворитель	Максимум поглощения, нм	Коэффициент поглощения, М ⁻¹ см ⁻¹	Максимум испускания, нм	Квантовый выход флуоресценции, %
(Ia)	Диоксан	383	39 000	—*	—*
	EtOAc	379	41 500	—*	—*
	MeCN	379	42 000	—*	—*
	EtOH	387	40 500	—*	—*
	Вода	380	35 500	—*	—*
(Ib)	Диоксан	381	50 000	—*	—*
	EtOAc	378	67 000	—*	—*
	MeCN	379	49 000	—*	—*
	EtOH	386	50 500	—*	—*
	Вода	383	46 000	—*	—*
(Ic)	Диоксан	377	39 000	—*	—*
	EtOAc	374	42 000	—*	—*
	MeCN	374	39 000	—*	—*
	EtOH	401	38 000	—*	—*
	Вода	387	35 500	—*	—*
(Id)	Диоксан	369	34 000	~405	~0.05
	EtOAc	363	38 500	—*	—*
	MeCN	364	39 000	—*	—*
	EtOH	376	33 000	—*	—*
	Вода	374	39 000	—*	—*
(Ie)	Диоксан	374	32 000	~405	~0.05
	EtOAc	371	34 500	—*	—*
	MeCN	371	36 500	—*	—*
	EtOH	375	37 500	—*	—*
	Вода	373	36 500	—*	—*
(If)	Диоксан	389	22 500	—*	—*
	EtOAc	386	24 000	—*	—*
	MeCN	385	25 000	—*	—*
	EtOH	389	22 500	—*	—*
	Вода	391	16 500	—*	—*

Таблица 1. (продолжение)

Соединение	Растворитель	Максимум поглощения, нм	Коэффициент поглощения, М ⁻¹ см ⁻¹	Максимум испускания, нм	Квантовый выход флуоресценции, %
(Ig)	Диоксан	390	23 000	—*	—*
	EtOAc	378	26 500	—*	—*
	MeCN	380	26 500	—*	—*
	EtOH	390	23 500	—*	—*
	Вода	390	21 500	—*	—*
(Ih)	Диоксан	405	43 500	—*	—*
	EtOAc	402	41 500	—*	—*
	MeCN	401	44 500	—*	—*
	EtOH	407	37 500	—*	—*
	Вода	375	21 500	—*	—*
(Ii)	Диоксан	379	84 500	~405	~0.05
	EtOAc	373	87 500	—*	—*
	MeCN	372	86 500	—*	—*
	EtOH	386	100 000	—*	—*
	Вода	382	77 500	—*	—*
(Ij)	Диоксан	383	26 000	—*	—*
	EtOAc	381	25 500	—*	—*
	MeCN	382	24 500	—*	—*
	EtOH	397	21 500	—*	—*
	Вода	392	21 000	—*	—*
(Ik)	Диоксан	423	28 500	536	0.96
	EtOAc	418	26 500	561	1.31
	MeCN	371	25 000	618	0.54
	EtOH	404	35 000	544	<0.05
	Диоксан	425	30 500	—*	—*
(II)	EtOAc	423	29 000	~490	<0.05
	MeCN	420	29 000	—*	—*
	EtOH	424	34 000	—*	—*
	Вода	384	14 500	—*	—*

Таблица 1. (окончание)

Соединение	Растворитель	Максимум поглощения, нм	Коэффициент поглощения, М ⁻¹ см ⁻¹	Максимум испускания, нм	Квантовый выход флуоресценции, %
(Im)	Диоксан	379	25 500	580	0.68
	EtOAc	376	26 500	594	0.49
	MeCN	376	26 000	617	0.43
	EtOH	383	25 000	573	<0.05
(In)	Диоксан	406	21 500	481	0.22
	EtOAc	404	21 000	481	~0.05
	MeCN	404	19 500	541	0.13
	EtOH	395	27 500	460	<0.05
(Io)	Диоксан	375	29 500	405	~0.5
	EtOAc	359	34 000	—*	—*
	MeCN	371	37 000	—*	—*
	EtOH	376	34 500	—*	—*
	Вода	372	35 000	—*	—*
(II)	Диоксан	377	12 500	469	3.9
	EtOAc	375	12 500	473	3.9
	MeCN	378	11 500	499	5.4
	EtOH	361	9500	468	1.4
	Вода	363	14 000	519	1.6
(III)	Диоксан	406	7000	504	15
	EtOAc	406	7500	509	17
	MeCN	409	7000	537	17
	EtOH	410	7000	528	15
	Вода	407	6000	488	4
(IV)	Диоксан	397	8000	493	13
	EtOAc	396	8500	498	14
	MeCN	395	8500	523	16
	EtOH	400	8500	522	11
	Вода	398	6500	504	1.2
(V)	Диоксан	355	—**	477	<0.05
	EtOAc	355	—**	481	<0.05
	MeCN	356	—**	503	<0.05
	EtOH	358	—**	485	<0.05
	Вода	356	—**	551	—*

* Соединение не флуоресцирует.

** Соединение недостаточно растворимо.

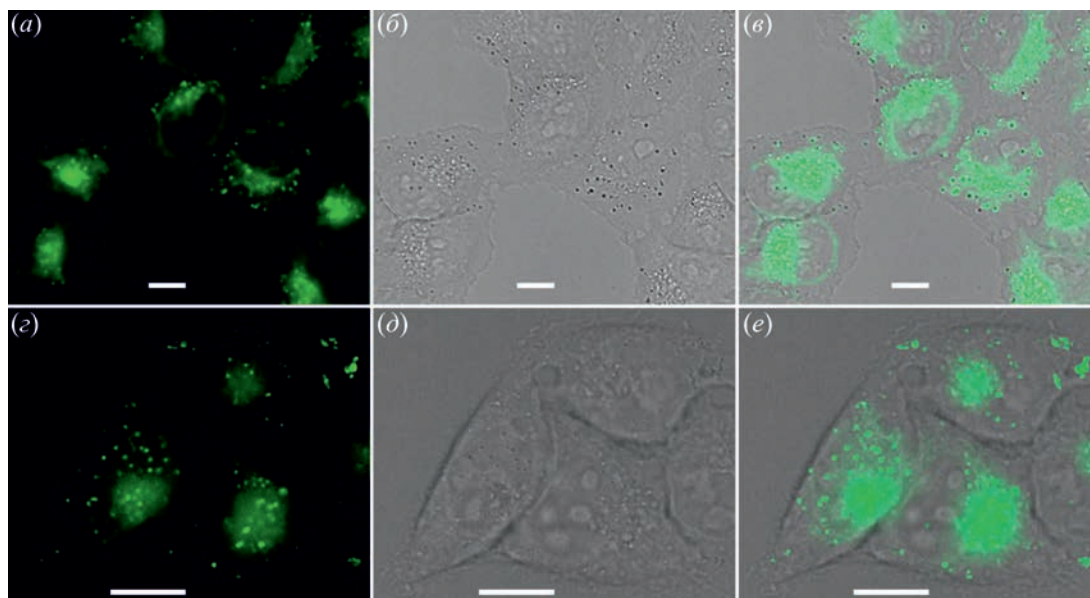


Рис. 1. Микроскопия живых клеток HeLa Kyoto при добавлении 7 мкМ соединения (**In**) (а–в) или 5 мкМ соединения (**III**) (г–е). (а, г) – Флуоресценция образцов соединений (**In**) и (**III**) соответственно при их проникновении в липидные капли в клетках HeLa Kyoto; (б, д) – клетки HeLa Kyoto в проходящем свете; (в, е) – флуоресцентные сигналы образцов соединений (**In**) и (**III**) соответственно, наложенные на изображение клеток в проходящем свете. Масштабная линейка во всех случаях соответствует длине 5 мкм.

Для всех соединений с выраженным варьированием флуоресценции в различных средах мы изучили возможность окрашивания клеточных структур. Показано, что при инкубации клеток линии Hela Kyoto с красителями (**In**) и (**III**) в концентрациях 7 и 5 мкМ соответственно происходит появление в BFP-канале выраженной флуоресценции, ассоциированной с расположением липидных капель, детектируемых в клетках при их визуализации в проходящем свете (рис. 1). При этом соединение (**III**) характеризовалось большим разгоранием при растворении в липидных каплях и большей интенсивностью флуоресценции при сходных условиях микроскопии. Также в обоих случаях в клетках присутствовали области, характеризующиеся гораздо меньшей интенсивностью флуоресценции, вероятно, представляющие собой скопления мембран органелл различных типов.

Таким образом, мы обнаружили, что арилиденроданин (**In**) и его ациклический аналог (**III**)

способны окрашивать адипосомы и могут применяться во флуоресцентной микроскопии в качестве флуорогенных меток для живых клеток.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование. Спектры ЯМР (δ , м.д.; J , Гц) регистрировали на спектрометре Avance III NMR (700 МГц; Bruker, США) при 303 К в $\text{DMSO}-d_6$ (внутренний стандарт – Me_4Si), спектры поглощения – на спектрофотометре Cary 100 Bio (Varian, США), спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США). Температуры плавления определяли на приборе SMP 30 (Stuart Scientific, Великобритания) и не исправляли. Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на приборе TripleTOF 5600+ (AB Sciex, США) с ионизацией методом электроспрея (ESI). Напряжение на капилляре составляло 5.5 кВ в режиме регистрации положительных ионов, 4.5 кВ в режиме регистрации

отрицательных ионов. Поток газа носителя – 15 Arb, газа распылителя – 25 Arb. Пробы вводили с помощью шприцевого насоса со скоростью потока 20 мкл/мин.

Синтез (Z)-5-(арилиден)-2-тиоксотиазолидин-4-онов (Ia–Io) (общая методика). К раствору 2-тиоксотиазолидин-4-она (роданина) (0.30 ммоль) в толуоле (2 мл) добавляли соответствующий альдегид (0.30 ммоль), бензойную кислоту (3.4 мг, 0.03 ммоль, 0.1 экв.) и пиперидин (3 мкл, 0.03 ммоль, 0.1 экв.). Полученную смесь кипятили 1–4 ч. Протекание реакции контролировали с помощью ТСХ (гексан–EtOAc). Затем реакционную смесь охлаждали, образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали водой (3 × 5 мл), метанолом (2 × 5 мл) и Et₂O (2 × 5 мл), сушили при пониженном давлении с получением целевых соединений.

Синтез (Z)-5-(2,5-диметоксибензилиден)тиазолидин-2,4-диона (II). К раствору тиазолидин-2,4-диона (43 мг, 0.38 ммоль) в толуоле (4 мл) добавляли соответствующий альдегид (0.50 ммоль, 1.37 экв.), бензойную кислоту (5 мг, 0.038 ммоль, 0.1 экв.) и пиперидин (4 мкл, 0.038 ммоль, 0.1 экв.). Полученную смесь перемешивали при 110°C в течение 22 ч. Протекание реакции контролировали с помощью ТСХ (гексан–EtOAc). Затем реакционную смесь охлаждали до 4°C, образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали Et₂O (3 × 5 мл), водой (2 × 5 мл) и Et₂O (2 × 5 мл), сушили при пониженном давлении.

Синтез 2-(2,5-диметоксибензилиден)малононитрила (III). К раствору малононитрила (66 мг, 1.05 ммоль, 1.05 экв.) в метаноле (4 мл) добавляли соответствующий альдегид (1.00 ммоль) и пиперидин (7.3 мкл, 0.1 ммоль, 0.1 экв.). Полученную смесь перемешивали в течение 72 ч. Протекание реакции контролировали с помощью ТСХ (толуол). Затем растворитель упаривали, продукт очищали колоночной хроматографией (толуол–EtOAc).

Синтез (E)-метил-2-циано-3-(2,5-диметокси-фенил)акрилата (IV). К раствору метил-2-цианоацетата (0.55 ммоль) в толуоле (4 мл) добавляли соответствующий альдегид (0.50 ммоль), бензойную кислоту (6 мг, 0.05 ммоль, 0.1 экв.) и пиперидин (5 мкл, 0.05 ммоль, 0.1 экв.). Полученную смесь перемешивали при 110°C в течение 18 ч. Протекание реакции контролировали с помощью ТСХ (гексан–EtOAc). Затем растворитель упаривали, продукт очищали колоночной хроматографией (гексан–EtOAc).

Синтез диметил-2-(2,5-диметоксибензилиден)малоната (V). К раствору диметилмалоната (83 мг, 0.50 ммоль) в толуоле (4 мл) добавляли соответствующий альдегид (0.55 ммоль, 1.1 экв.), бензойную кислоту (6 мг, 0.05 ммоль, 0.1 экв.) и пиперидин (5 мкл, 0.05 ммоль, 0.1 экв.). Полученную смесь перемешивали при 110°C в течение 22 ч. Протекание реакции контролировали с помощью ТСХ (гексан–EtOAc). Растворитель упаривали, продукт очищали колоночной хроматографией (гексан–EtOAc).

Выходы реакций, температуры плавления, спектральные и оптические характеристики синтезированных соединений приведены в дополнительных материалах.

Окрашивание и флуоресцентная микроскопия клеток HeLa Kyoto. Клетки иммортализованной линии HeLa Kyoto (ATCC) культивировали в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки (ПанЭко, Россия) и 100 ед./мл пенициллин-стрептомицина (ПанЭко, Россия) в увлажненном инкубаторе в присутствии 5% CO₂ при 37°C. За сутки до проведения микроскопии клетки высевали на чашки со стеклянным дном (SPL Life Sciences, Корея), диаметр чашек составлял 35 мм. На следующий день перед проведением микроскопии культивационную среду заменяли на среду для

визуализации, состоявшую из раствора Хэнкса (ПанЭко, Россия) с добавлением 20 мМ NEPEs (Corning, США) и 7 мкМ вещества (**In**) или 5 мкМ соединения (**III**), разведенных из стоковых растворов в DMSO (10 мМ), и инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Микроскопию проводили с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа BZ-9000 (Keyence, Япония). Для получения изображений использовали объектив 60× PlanApo 1.40 NA (Nikon, США), куб ET-EBFP2/C (Keyence, Япония), а также встроенную в управляющую микроскопом программу Bz-II Viewer функцию Binning 2×2. Результаты исследования обрабатывали в Fiji ImageJ (<https://fiji.sc/>).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезирована серия арилиденроданинов и их ациклических аналогов, исследованы оптические свойства полученных соединений. Установлено, что введение двух электронодонорных заместителей в данные структуры позволяет существенно увеличить батохромный сдвиг максимумов испускания, значение квантового выхода флуоресценции и его сольватохромный разброс. Однако для большинства новых соединений, в отличие от оригинальных арилиденимидазолонов, характерны гораздо меньшие значения этих величин в неполярных и апротонных средах. Заметной флуоресценцией отличались лишь соединения (**III**) и (**IV**), содержащие нитрильную группу.

Мы обнаружили, что два вещества из предложенных – соединения (**In**) и (**III**) – могут использоваться во флуоресцентной микроскопии в качестве флуорогенных маркеров, селективно окрашивающих липидные капли в живых клетках. Соединение (**III**) при этом обладает большей интенсивностью флуоресценции, чем соединение (**In**), и представляет собой перспективный инструмент для изучения адипосом.

Расширение инструментария, примененного для визуализации, описания свойств и динамики липидных капель, несомненно способно благотворно повлиять на уровень внимания научного сообщества к этим органеллам, а также повысить степень понимания их участия как в физиологических, так и в патологических процессах.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-73-10195).

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. 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>
2. Bozhanova N.G., Baranov M.S., Klementieva N.V., Sarkisyan K.S., Gavrikov A.S., Yampolsky I.V., Zagaynova E.V., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A., Mishin A.S. // *Chem. Sci*. 2017. V. 8. P. 7138–7142.
<https://doi.org/10.1039/C7SC01628J>
3. Collot M., Kreder R., Tatarets A.L., Patsenker L.D., Melya Y., Klymchenko A.S. // *Chem. Commun*. 2015. V. 51. P. 17136–17139.
<https://doi.org/10.1039/C5CC06094J>

4. Ermakova Y.G., Bogdanova Y.A., Baleeva N.S., Zaitseva S.O., Guglya E.B., Smirnov A.Y., Zagudaylova M.B., Baranov M.S. // *Dyes Pigm.* 2019. V. 170. P. 107550.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107550>
5. Ermakova Y.G., Sen T., Bogdanova Y.A., Smirnov A.Y., Baleeva N.S., Krylov A.I., Baranov M.S. // *J. Phys. Chem. Lett.* 2018. V. 9. P. 1958–1963.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.8b00512>
6. Baranov M.S., Lukyanov K.A., Borissova A.O., Shamir J., Kosenkov D., Slipchenko L.V., Tolbert L.M., Yampolsky I.V., Solntsev K.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. V. 134. P. 6025–6032.
<https://doi.org/10.1021/ja3010144>
7. 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 Pigm.* 2022. V. 198. P. 110033.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.110033>
8. Farese R.V., Walther T.C. // *Cell.* 2009. V. 139. P. 855–860.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.005>
9. 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>
10. Olzmann J.A., Carvalho P. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019. V. 20. P. 137–155.
<https://doi.org/10.1038/s41580-018-0085-z>
11. Valm A.M., Cohen S., Legant W.R., Melunis J., Hershsberg U., Wait E., Cohen A.R., Davidson M.W., Betzig E., Lippincott-Schwartz J. // *Nature.* 2017. V. 546. P. 162–167.
<https://doi.org/10.1038/nature22369>
12. Velázquez A.P., Tatsuta T., Ghillebert R., Drescher I., Graef M. // *J. Cell Biol.* 2016. V. 212. P. 621–631.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201508102>
13. Fei W., Wang H., Fu X., Bielby C., Yang H. // *Biochem. J.* 2009. V. 424. P. 61–67.
<https://doi.org/10.1042/BJ20090785>
14. Nguyen T.B., Louie S.M., Daniele J.R., Tran Q., Dillin A., Zoncu R., Nomura D.K., Olzmann J.A. // *Dev. Cell.* 2017. V. 42. P. 9–21.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.06.003>
15. Kong J., Ji Y., Jeon Y.G., Han J.S., Han K.H., Lee J.H., Lee G., Jang H., Choe S.S., Baes M., Kim J.B. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. P. 578.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-14176-0>
16. Brookheart R.T., Michel C.I., Schaffer J.E. // *Cell Metab.* 2009. V. 10. P. 9–12.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.03.011>
17. Kuramoto K., Okamura T., Yamaguchi T., Nakamura T.Y., Wakabayashi S., Morinaga H., Nomura M., Yanase T., Otsu K., Usuda N., Matsumura S., Inoue K., Fushiki T., Kojima Y., Hashimoto T., Sakai F., Hirose F., Osumi T. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. P. 23852–23863.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.328708>
18. Greenberg A.S., Coleman R.A., Kraemer F.B., McManaman J.L., Obin M.S., Puri V., Yan Q.W., Miyoshi H., Mashek D.G. // *J. Clin. Investig.* 2011. V. 121. P. 2102–2110.
<https://doi.org/10.1172/JCI46069>
19. Bozza P.T., Viola J.P.B. // *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2010. V. 82. P. 243–250.
<https://doi.org/10.1016/j.plefa.2010.02.005>
20. Chen Z.P., Wang S., Zhao X., Fang W., Wang Z., Ye H., Wang M.J., Ke L., Huang T., Lv P., Jiang X., Zhang Q., Li L., Xie S.T., Zhu J.N., Hang C., Chen D., Liu X., Yan C. // *Nat. Neurosci.* 2023. V. 26. P. 542–554.
<https://doi.org/10.1038/s41593-023-01288-6>
21. Tirinato L., Pagliari F., Limongi T., Marini M., Falqui A., Seco J., Candeloro P., Liberale C., Di Fabrizio E. // *Stem Cells Int.* 2017. V. 2017. P. 1–17.
<https://doi.org/10.1155/2017/1656053>

22. Scher N., Rechav K., Paul-Gilloteaux P., Avinoam O. // *iScience*. 2021. V. 24. P. 102714.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102714>
23. Sánchez-Recillas A., Navarrete-Vázquez G., Hidalgo-Figueroa S., Bonilla-Hernández M., Ortiz-Andrade R., Ibarra-Barajas M., Yáñez-Pérez V., Sánchez-Salgado J.C. // *J. Pharm. Pharmacol.* 2020. V. 72. P. 1186–1198.
<https://doi.org/10.1111/jphp.13295>
24. Sokolov A.I., Gorshkova A.A., Baleeva N.S., Baranov M.S. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2022. V. 48. P. 1367–1371.
<https://doi.org/10.1134/S1068162022060243>
25. Durai Ananda Kumar T., Swathi N., Navatha J., Subrahmanyam C.V.S., Satyanarayana K. // *J. Sulphur Chem.* 2014. V. 36. P. 105–115.
<https://doi.org/10.1080/17415993.2014.970555>
26. Madasamy K., Kumaraguru S., Sankar V., Mannathan S., Kathiresan M. // *New J. Chem.* 2019. V. 43. P. 3793–3800.
<https://doi.org/10.1039/C8NJ05953E>
27. Kharas G.B., Crawford A.L., Payne K.J., Sanidad M.N.T., Sims M.W., Leung D., Watson K. // *J. Macromol. Sci. A.* 2005. V. 42. P. 683–690.
<https://doi.org/10.1081/MA-200058623>
28. Swenton J.S., Freskos J.N., Morrow G.W., Sercel A.D. // *Tetrahedron*. 1984. V. 40. P. 4625–4632.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)91523-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)91523-6)

2,5-Dimethoxy-benzylidene-rhodanine and Its Acyclic Analogues As Selective Fluorogenic Dyes for Lipid Droplets of Living Cells

S. A. Krasnova^{*, **, #}, Yu. A. Bogdanova^{*}, A. I. Sokolov^{*, ***,}, I. N. Myasnyanko^{*, ***,},
A. Yu. Smirnov^{*, ***,} and M. S. Baranov^{*, ***,}

[#] Phone: +7 (964) 865-16-24; e-mail: svetlanakr2002@mail.ru

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

^{**} National Research University Higher School of Economics, ul. Myasnitskaya 20, Moscow, 101000 Russia

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

We report about a series of arylidene-rhodanines and their acyclic analogues. The fluorescent properties of these substances were studied. We showed that the derivatives containing a 2,5-dimethoxybenzylidene fragment or similar groups are characterized by a noticeable variation in the fluorescence quantum yield depending on the properties of the medium. We discovered that two of the synthesized compounds – dimethoxy-benzylidene-rhodanine and dimethoxy-benzylidene-malononitrile – can be used as selective fluorogenic dyes for lipid droplets (adiposomes) of living cells for labeling under fluorescent microscopy conditions.

Keywords: *rhodanines, fluorogens, adiposomes, lipid droplets, fluorescence*



ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ ЖУРНАЛА “БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ” 2024

DOI: 10.31857/S0132342324010099, EDN: OWCGWS

ТЕМАТИКА ПУБЛИКАЦИЙ

Журнал “Биоорганическая химия” публикует статьи, посвященные структурным, структурно-функциональным и синтетическим исследованиям биологически значимых высоко-молекулярных соединений (белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов и смешанных биополимеров любых типов). **Предметом публикации** выступают также проблемы изучения химических основ деятельности высокоорганизованных частей клетки (клеточных мембран, рецепторных комплексов и др.), целых клеток или органов, проблемы нейроиммунохимии, биотехнологии, фундаментальные основы разработки диагностикумов на инфекционные и наследственные заболевания.

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

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

ВИДЫ ПУБЛИКАЦИЙ

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

Максимальный объем экспериментальной статьи вместе с таблицами и списком литературы не должен превышать 35 страниц А4 (шрифт Times New Roman, размер шрифта 12, межстрочный интервал 1.5), и 10 рисунков.

Журнал публикует также обзорные и мини-обзорные статьи о важнейших достижениях в области биоорганической химии. **Максимальный объем обзорных статей** вместе с таблицами и списком литературы должен составлять не более 55 страниц А4 и 30 рисунков. Обзорные статьи большего объема должны быть разбиты на несколько частей и могут быть опубликованы в двух или более номерах журнала.

Максимальный объем мини-обзорных статей—25–35 страниц А4 и 6–9 рисунков. Авторам, планирующим опубликовать обзорную статью, необходимо вначале представить в редакцию журнала ее аннотацию, содержащую обоснование актуальности предлагаемой темы, краткие данные о содержании и структуре обзора, его объеме, числе иллюстраций и ссылок на цитируемую литературу, временной охват цитирования, с целью предварительной оценки редколлегией целесообразности его публикации. Полный текст одобренной редколлегией обзорной статьи принимается далее к рассмотрению.

Под рубрикой “Письма редактору” в журнале публикуются краткие сообщения, содержащие новые, важные результаты, требующие срочной публикации. **Объем статьи для рубрики “Письма редактору”** не должен превышать 10–13 страниц А4 и 3–6 рисунков.

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

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

МЕЖДУНАРОДНЫЙ РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ ЖУРНАЛА

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ ЖУРНАЛА

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

ПОЛИТИКА РЕЦЕНЗИРОВАНИЯ

В журнале “Биоорганическая химия” все статьи рецензируются, используется двусторонняя “слепая” форма рецензирования группой внештатных рецензентов (**не менее 3 рецензентов на каждую рукопись**). В число рецензентов входит **83 внутренних и внешних эксперта** (из них внешних—86%). Количество отклоненных рукописей в 2023 году составило 71%. Окончательное решение о публикации рукописи принимает главный редактор.

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

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

ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ЭТИКА

Журнал “Биоорганическая химия” максимально поддерживает принципы добропорядочности и этики в опубликованных материалах. У журнала есть политика конфликтов интересов, и публикуемые работы соответствуют международным, национальным и/или институциональным стандартам работы с людьми и животными, а также при необходимости используют практику информированного согласия.

Журнал “Биоорганическая химия” входит в состав Committee on Publication Ethics (COPE) и руководствуется его принципами в отношении борьбы со случаями ненадлежащего поведения, тем самым обязуясь расследовать утверждения о ненадлежащем поведении в целях обеспечения этичности исследований.

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

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

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ В РЕДАКЦИЮ ЖУРНАЛА

Рукописи статей, включая иллюстративный материал (таблицы, схемы, рисунки), принимаются в редакцию в электронной форме по электронной почте: tjbc@ibch.ru

(в копии письма необходимо указать адрес заведующего редакцией журнала: korolenkoibch@yandex.ru).

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

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

ОСНОВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К РУКОПИСЯМ

Направление рукописи в журнал предполагает, что: представленная работа не публиковалась ранее; она не находится на рассмотрении для публикации в другом издании; данная рукопись не была отклонена в этом журнале; публикация была одобрена всеми соавторами; публикация была одобрена (явно или неявно) всеми необходимыми инстанциями в организациях, где была выполнена эта работа.

ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

14. Раздел СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАР-
ТОВ—обязательный раздел, содержащий информацию
о работе с людьми и/или животными (рекомендации по
оформлению данного раздела представлены на сайте
издателя: [https://www.pleiades.online/ru/authors/guidelines/
ethics-statements/](https://www.pleiades.online/ru/authors/guidelines/ethics-statements/)). Если исследования с участием
людей и животных не проводились, авторы должны это
указать (используется стандартная формулировка:
“Настоящая статья не содержит описания исследований
с участием людей и использованием животных в качестве
объектов”). Этот раздел должен присутствовать во ВСЕХ
статьях (независимо от того, были ли вовлечены животные
и люди в эксперименты в какой-либо конкретной работе);
15. Раздел КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ выступает обяза-
тельным разделом и должен присутствовать во ВСЕХ
рукописях. Раздел должен содержать стандартную
формулировку: “Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов” или сведения об имеющемся конфликте
интересов;

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

В журнале принята последовательная нумерационная
система цитирования, т.е. в порядке упоминания в тексте
указывается порядковый номер процитированного источ-
ника (арабской цифрой в квадратных скобках), соот-
ветствующий номеру в списке литературы. При цитирова-
нии статьи, опубликованной в журнале “Биоорганичес-
кая химия”, в списке литературы следует привести под
тем же номером в квадратных скобках выходные данные
английской версии статьи.

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

1. Михалева И.И., Иванов В.Т., Войтенков В.Б., Вечканов Е.М.,
Бондаренко Т.И. // Биоорг. химия. 2013. Т. 39. С. 277–284.
[Mikhaleva I.I., Ivanov V.T., Voitenkov V.B., Vechkanov E.M.,
Bondarenko T.I. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2013. V. 39. P. 245–
251.] [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)93924-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)93924-9)
2. Нероев В.В., Киселева О.А., Бессмертный А.М. // Рос.
офтальмологич. журнал. 2013. Т. 6. № 3. С. 4–7.

3. Casu B., Naggi A., Torri G. // Carbohydr. Res. 2015. V. 403.
P. 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.06.023>
4. Хираока М. // Краун-соединения. Свойства и примене-
ние / Ред. Эммануэль Н.М. Москва: Мир, 1986. С. 258–260.
5. Национальное руководство по глаукоме: для практи-
кующих врачей (3-е изд., испр. и доп.) / Под ред. Егоро-
ва Е.А., Астахова Ю.С., Еричева В.П. Москва: ГЭОТАР-
Медиа, 2015. 456 с.
6. Lund E., Henrichsen J. // Methods in Microbiology / Eds.
Bergan T., Norris J.R. London: Academic Press, 1978. P. 241–
262.
7. Alberts B., Johnson A., Lewis Ju., Raff M., Roberts K., Wal-
ter P. // In: Molecular Biology of the Cells, 4th ed. New York:
Garland Science, 2002. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/
NBK26871](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26871)
8. Свердлов Е.Д., Алексеенко И.В., Безбородова О.А., Виног-
радова Т.В., Кашкин К.Н., Копанцев Е.П., Монастырс-
кая Г.С., Немцова Е.Р., Успенская Н.Я., Чернов И.П.,
Якубовская Р.И. // Патент RU 2551784 C1, 2015.
9. Knopf J., Seehra J., Kumar R. // Patent US 8343933 B2, 2010.
10. Шарапова Н.Е. // Получение и характеристика реком-
бинантных доменов белка LigA как компонентов потен-
циальной субъединичной противолептоспирозной вак-
цины. Дис. канд. биол. наук, НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи
РАМН, Москва, 2009.
11. Латашко В.М., Бадовская Л.А., Пономаренко Р.И., Сокирко
В.П. // Тез. докл. 6-й Международной конференции
“Регуляторы роста и развития растений в биотехнологиях”,
Москва, 2001. С. 255.

17. RESUME—английская версия пунктов 2–6 (названия
организаций, в которых работают авторы, даются на ан-
глийском языке, а адреса организаций—с помощью транс-
литерации);

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

19. Рисунки, схемы и химические формулы (необходимо
использовать программу ChemDraw). **В электронной
версии журнала возможна бесплатная публикация
цветных рисунков;**

20. Таблицы.

При написании статьи следует употреблять латинские
названия животных, растений и микроорганизмов (*род и
вид*—курсивным начертанием, таксоны более высокого

уровня—прямым); при первом упоминании в аннотации и в тексте род должен называться полностью.

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

Названия химических соединений должны соответствовать номенклатуре, рекомендованной номенклатурным комитетом Международного союза теоретической и прикладной химии IUPAC и Международного союза биохимии IUBMB.

Все сокращения названий химических соединений даются в журнале в латинской транскрипции.

Соединения нумеруются римскими полужирными цифрами в скобках (скобки нежирные): (I), (II), (IIIa–IIIId) и т.д. Если соединений **больше 20**, их следует нумеровать арабскими полужирными цифрами в скобках (скобки нежирные): (1), (2), (3a–3d) и т.д.

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ РУКОПИСЕЙ И ПОДГОТОВКА ИХ К ПЕЧАТИ

Все статьи, поступающие в редакцию, проходят двустороннее “слепое” рецензирование независимыми экспертами. Для первичного рецензирования рецензенту, как правило, дается 14 календарных дней, для вторичного рецензирования—7 календарных дней. Рукопись, направленная авторам на доработку после рецензирования, должна быть возвращена в исправленном чистовом виде в течение 7 календарных дней. К переработанной рукописи авторам необходимо приложить письмо с описанием сделанных исправлений и содержащее ответы на все замечания рецензента.

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

позицию по неучтенным исправлениям изложить в ответном письме в редакцию.

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

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

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

ПРАВА РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ ЖУРНАЛА

Редакционная коллегия журнала оставляет за собой право отклонить статью по следующим причинам (на любом из этапов рассмотрения текста):

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

Свидетельство о регистрации средства массовой информации
№ 0110214 от 8 февраля 1993 г., выдано Министерством печати и информации Российской Федерации

Подписано к печати	Формат 60 × 88 ¹ / ₈	Усл. печ. л.	Уч.-изд. л.
Тираж	Зак.	Цена свободная	

Учредители: Российская академия наук,
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Издатель: Российская академия наук, 119991 Москва, Ленинский просп., 14
Исполнитель по контракту № 4У-ЕП-039-24: ФГБУ «Издательство «Наука»
121099, г. Москва, Шубинский пер., д. 6, стр. 1.
Отпечатано в ФГБУ «Издательство «Наука»
121099, г. Москва, Шубинский пер., д. 6, стр. 1

16+

Журналы РАН, выходящие в свет на русском языке

Автоматика и телемеханика	Лёд и Снег
Агрохимия	Лесоведение
Азия и Африка сегодня	Литология и полезные ископаемые
Акустический журнал	Мембраны и мембранные технологии
Астрономический вестник. Исследования солнечной системы	Металлы
Астрономический журнал	Микология и фитопатология
Биологические мембраны	Микробиология
Биология внутренних вод	Микроэлектроника
Биология моря	Молекулярная биология
Биоорганическая химия	Нейрохимия
Биофизика	Неорганические материалы
Биохимия	Нефтехимия
Ботанический журнал	Новая и новейшая история
Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук	Общественные науки и современность
Вестник древней истории	Общество и экономика
Вестник Российской академии наук	Океанология
Вестник российской сельскохозяйственной науки	Онтогенез
Водные ресурсы	Палеонтологический журнал
Вопросы истории естествознания и техники	Паразитология
Вопросы ихтиологии	Петрология
Вопросы языкознания	Письма в Астрономический журнал
Вулканология и сейсмология	Письма в Журнал экспериментальной и теоретической физики
Высокомолекулярные соединения. Серия А	Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования
Высокомолекулярные соединения. Серия Б	Почвоведение
Высокомолекулярные соединения. Серия С	Приборы и техника эксперимента
Генетика	Прикладная биохимия и микробиология
Геология рудных месторождений	Прикладная математика и механика
Геомагнетизм и аэрономия	Проблемы Дальнего Востока
Геоморфология и палеогеография	Проблемы машиностроения и надежности машин
Геотектоника	Проблемы передачи информации
Геохимия	Программирование
Геоэкология. Инженерная геология. Гидрогеология. Геокриология	Психологический журнал
Государство и право	Радиационная биология. Радиоэкология
Дефектоскопия	Радиотехника и электроника
Дифференциальные уравнения	Радиохимия
Доклады Российской академии наук. Математика, информатика, процессы управления	Расплавы
Доклады Российской академии наук. Науки о жизни	Растительные ресурсы
Доклады Российской академии наук. Науки о Земле	Российская археология
Доклады Российской академии наук. Физика, технические науки	Российская история
Доклады Российской академии наук. Химия, науки о материалах	Российская сельскохозяйственная наука
Журнал аналитической химии	Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова
Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова	Русская литература
Журнал вычислительной математики и математической физики	Русская речь
Журнал неорганической химии	Сенсорные системы
Журнал общей биологии	Славяноведение
Журнал общей химии	Современная Европа
Журнал органической химии	Социологические исследования
Журнал прикладной химии	Стратиграфия. Геологическая корреляция
Журнал физической химии	США и Канада: экономика, политика, культура
Журнал эволюционной биохимии и физиологии	Теоретические основы химической технологии
Журнал экспериментальной и теоретической физики	Теплофизика высоких температур
Записки Российского минералогического общества	Успехи современной биологии
Зоологический журнал	Успехи физиологических наук
Известия Российской академии наук. Механика жидкости и газа	Физика Земли
Известия Российской академии наук. Механика твердого тела	Физика и химия стекла
Известия Российской академии наук. Серия биологическая	Физика металлов и металловедение
Известия Российской академии наук. Серия географическая	Физика плазмы
Известия Российской академии наук. Серия литературы и языка	Физикохимия поверхности и защита материалов
Известия Российской академии наук. Серия физическая	Физиология растений
Известия Российской академии наук. Теория и системы управления	Физиология человека
Известия Российской академии наук. Физика атмосферы и океана	Химическая физика
Известия Российской академии наук. Энергетика	Химия высоких энергий
Известия Русского географического общества	Химия твердого топлива
Исследование Земли из Космоса	Цитология
Кинетика и катализ	Человек
Коллоидный журнал	Экология
Координационная химия	Экономика и математические методы
Космические исследования	Электрохимия
Кристаллография	Энтомологическое обозрение
Латинская Америка	Этнографическое обозрение
	Ядерная физика