

ISSN 0132-3423

Том 50, Номер 2

Март - Апрель 2024



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ



НАУКА

— 1727 —



Российская академия наук

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Том 50 № 2 2024 Март—Апрель

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»

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 пр., 14
Исполнитель: 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+

СОДЕРЖАНИЕ

Том 50, номер 2, 2024

Гибридное антимикробное покрытие на основе конъюгата гиалуроновой кислоты и пептида LL-37 для ПЭО-модифицированных титановых имплантатов	
<i>Л. В. Парфенова, З. Р. Галимшина, Г. У. Гильфанова, Э. И. Алибаева, Т. М. Пашкова, О. Л. Карташова, Р. Г. Фаррахов, В. Р. Аубакирова, Е. В. Парфенов</i>	101
Наночастицы на основе полиферуловых и полигентизиновых кислот как новые носители противоопухолевых препаратов	
<i>И. В. Смирнов, А. В. Лисов, А. С. Казаков, А. Н. Звонарев, Н. Е. Сузина, М. Ю. Земскова</i>	111
9-Хлор-5,9-диеновые и другие жирные кислоты из морской губки <i>Penares</i> sp.	
<i>Е. А. Санталова, С. А. Колесникова</i>	130
Протеиназная устойчивость карнозина, пирролилкарнозина и салицилкарнозина	
<i>К. В. Шевченко, И. Ю. Нагаев, О. И. Куликова, С. Л. Стволинский, В. П. Шевченко, Н. Ф. Мясоедов</i>	146
Антимикробные метаболиты из назальной микробиоты свиней	
<i>А. А. Баранова, Ю. В. Закалюкина, А. П. Тюрин, В. А. Коршун, О. А. Белозерова, М. В. Бирюков, А. В. Моисеенко, С. С. Терехов, В. А. Алферова</i>	153
Синтез и гипогликемическое действие новых никотинитрил-фурановых молекулярных гибридов	
<i>Д. А. Тильченко, Е. Ю. Бибик, В. В. Доценко, С. Г. Кривоколыско, К. А. Фролов, Н. А. Аксенов, И. В. Аксенова</i>	175

ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

Арилиден-имидазолы и их ациклический аналог как флуоресцентные сенсоры ионов металлов	
<i>С. А. Краснова, Э. Р. Зайцева, Д. И. Рудик, Д. С. Иванов, А. А. Михайлов, М. С. Баранов</i>	193



УДК 547.995.15;577.112.6

ГИБРИДНОЕ АНТИМИКРОБНОЕ ПОКРЫТИЕ НА ОСНОВЕ КОНЬЮГАТА ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ И ПЕПТИДА LL-37 ДЛЯ ПЭО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ ТИТАНОВЫХ ИМПЛАНТАТОВ

© 2024 г. Л. В. Парфенова*, #, З. Р. Галимшина*, Г. У. Гильфанова*, Э. И. Алибаева*,
Т. М. Пашкова**, О. Л. Каргашова**, Р. Г. Фаррахов***,
В. Р. Аубакирова***, Е. В. Парфенов***

* Институт нефтехимии и катализа УФИЦ РАН, Россия, 450075 Уфа, просп. Октября, 141

** Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Россия, 460000 Оренбург, ул. Пионерская, 11

*** Уфимский университет науки и технологий, Россия, 450076 Уфа, ул. Заки Валиди, 32

Поступила в редакцию 04.07.2023 г.

После доработки 15.07.2023 г.

Принята к публикации 16.07.2023 г.

Впервые синтезирован конъюгат гиалуроновой кислоты и антимикробного пептида LL-37. Гибридное соединение было испытано в качестве антимикробного органического покрытия для крупнозернистого и наноструктурированного титана с неорганическим подслоем, полученным в результате плазменно-электролитического оксидирования (ПЭО) поверхности. В результате исследований *in vitro* установлен антибактериальный эффект гибридной молекулы в составе неорганического ПЭО-покрытия, заключающийся в значимом ($p < 0.05$) подавлении способности *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium* и *Escherichia coli* формировать биопленки. Представленный подход может быть использован для последующего дизайна и разработки необрастающих антимикробных покрытий для снижения риска возникновения инфекционно-воспалительных заболеваний бактериальной природы при использовании имплантатов.

Ключевые слова: олигопептиды, аминоксифосфонаты, полисахариды, антимикробные покрытия, имплантаты, титан

DOI: 10.31857/S0132342324020011, EDN: ONSMFD

ВВЕДЕНИЕ

Титан (Ti) и его сплавы – самые востребованные материалы для ортопедии и травматологии благодаря биоинертности, легкости, прочности и способности к остеоинтеграции [1–3]. Тем не менее появление в организме имплантата может вызывать реакцию на инородное тело, острое и хроническое воспаление, приводить к развитию грануляционной ткани и

фиброзной инкапсуляции [4, 5]. В связи с этим в мировой практике для обеспечения биосовместимости имплантатов широко разрабатываются методы, связанные с изменением архитектуры и состава поверхностного слоя с целью придания устройствам свойств костной ткани и клеточных мембран – так называемый биомиметический подход. Такое моделирование свойств поверхности достигается

Сокращения: АМП – антимикробный пептид; ГК – гиалуроновая кислота; КЗ-Тi – крупнозернистый титан; нано-Тi – наноструктурированный титан; ПЭО – плазменно-электролитическое оксидирование; LL-37 – антимикробный пептид семейства кателицидинов; EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид; DTT – дитиотреитол; EMCS – *N*-ε-малеимидокапроил-оксисукцинимидный эфир.

Автор для связи: (тел.: +7 (347) 284-35-27; эл. почта: luda_parfenova@ipc-ras.ru).

как за счет физико-химических методов формирования покрытий, приближающих фазовый состав и трехмерную структуру поверхностного слоя к минеральным компонентам и морфологии человеческой кости, так и за счет нанесения органической матрицы, содержащей фрагменты, осуществляющие различные функции. Происходит широкомасштабный поиск вариантов покрытий – неорганических, органических и комбинированных – для обеспечения заданных биологических свойств поверхности [6, 7].

Помимо биосовместимости для имплантатов важны антибактериальные свойства, наличие которых снижает вероятность проведения повторной хирургической операции, связанной с возможным инфицированием при установке устройства или после операции [8, 9]. Бактерии, принадлежащие к так называемой панели ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и виды *Enterobacter*), становятся все более распространенными и устойчивыми к традиционным антибиотикам и поэтому представляют собой особенно опасную группу [10]. Для обеспечения антимикробных свойств поверхности, как правило, используют противомикробные и необрастающие материалы, которые либо высвобождают компоненты, уничтожающие патогены при контакте, либо предотвращают их прикрепление и образование биопленки [11]. Среди антимикробных средств в последнее время значительный интерес вызывают антимикробные пептиды (АМП) – молекулы-эффекторы врожденной защиты животных, растений и микроорганизмов, которые проявляют активность против бактерий, устойчивых к антибиотикам и находящихся в биопленках, а также вирусов, грибков и паразитов [12, 13]. Отмечается высокий потенциал их использования для модификации поверхности медицинских устройств [14, 15].

Так, многофункциональный пептид LL-37 из группы кателицидинов, обнаруженный у человека, с антибактериальной, противовирусной и иммуномодулирующей активностью [16–18] был иммобилизован на поверхности титана, в результате чего

был достигнут антимикробный эффект [19], а также показана способность мезенхимальных стволовых клеток к остеогенной дифференцировке и образованию новой кости *in vivo* [20].

В качестве необрастающей основы для титановых имплантатов могут быть использованы полисахариды, в частности гиалуроновая кислота (ГК) [21], способная в значительной степени снижать адгезию и развитие патогенов на поверхности. Кроме того, ГК обладает ценными характеристиками: биосовместимостью, влагоудерживающими и репаративно-регенеративными свойствами, способностью образовывать высоковязкие гидрогели [22–24]. ГК принимает участие в большинстве биологических процессов: подвижности клеток, пролиферации, организации тканей, заживлении ран, ангиогенезе и морфогенезе, развитии скелета, его росте и реконструкции [25]. Благодаря взаимосвязи с различными рецепторами, такими как CD44 и TSG-6 (белок гена-6, стимулируемый фактором некроза опухоли), ГК является ключевым регулятором воспаления: она создает перичеллюлярное покрытие, которое не только защищает клетки от медиаторов воспаления, но и действует также как иммуносупрессор, предотвращающий доступ к лигандам и ингибирующий фагоцитоз макрофагами и моноцитами [26, 27].

В продолжение наших исследований по созданию биологически активных органических покрытий на основе олигопептидов и полисахаридов для металлических имплантатов [21, 28–30], целью представленной работы стал синтез конъюгата ГК с антимикробным пептидом LL-37 для модификации неорганического пористого оксидного подслоя, полученного в результате плазменно-электролитического оксидирования поверхности крупнозернистого (КЗ-Тi-ПЭО) и наноструктурированного титана (нано-Ti-ПЭО), а также изучение антибактериального действия комбинированного органо-неорганического покрытия в отношении *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium* и *Escherichia coli*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе синтезирован новый органический материал, который содержит в своем составе антимикробный олигопептид LL-37 и низкомолекулярную гиалуроновую кислоту (<0.1 МДа). Для функционализации природного полисахарида использовали дигидразид 4,4'-дитиодимасляной кислоты, который был предварительно получен из 4,4'-дитиодимасляной кислоты в две стадии с высоким выходом (92%). При добавлении 2 экв. EDC к смеси ГК и дигидразида, взятых в мольных соотношениях 1 : 2, в воде и поддержании pH среды в пределах 4.7–4.8 образуется кросс-сшитый полисахарид, в котором степень превращения COOH-групп ГК в амидные достигает значения ~16–18%. Для получения производных ГК с концевыми SH-группами (III) к реакционной массе добавляли восстанавливающий реагент DTT – дитиотреитол (реагент Келланда) [31–33].

Для получения гибридной молекулы ГК–LL-37 предварительно синтезировали малеимидсодержащий конъюгат (IV) реакцией LL-37 с *N*-ε-малеимидокапроил-оксисукцинимидным эфиром (EMCS) в

соотношении 1 : 1 в смеси вода–ацетон (4 : 1), образование конъюгата проходило в течение 2 ч (схема 1). Полученный конъюгат (IV) использовали в дальнейшем синтезе без очистки. Как известно [18], LL-37 содержит в структуре 37 а.о., среди которых присутствуют 6 лизиновых фрагментов, несущих в положении С6 первичные –NH₂-группы, которые, по-видимому, вступали в реакцию с EMCS, что приводило к получению амида (IV).

Гибридную молекулу на основе ГК и АМП LL-37 (V) получали по реакции Михаэля, где ГК-SH (III) и *N*-малеимидное производное LL-37 (IV) были взяты в соотношении 9 : 1 соответственно. Реакция проходила при 36–38°C в течение 2 ч, очистку полученного продукта проводили с помощью диализа в течение 5 сут.

Структура синтезированных новых производных установлена при помощи ¹H-ЯМР-спектроскопии (рис. 1). В спектре ¹H-ЯМР соединения EMCS–LL-37 (IV) кроме сигналов олигопептида наблюдали сигналы протонов двойной связи малеимидного фрагмента в области 6.75 м.д., а также характерные трип-

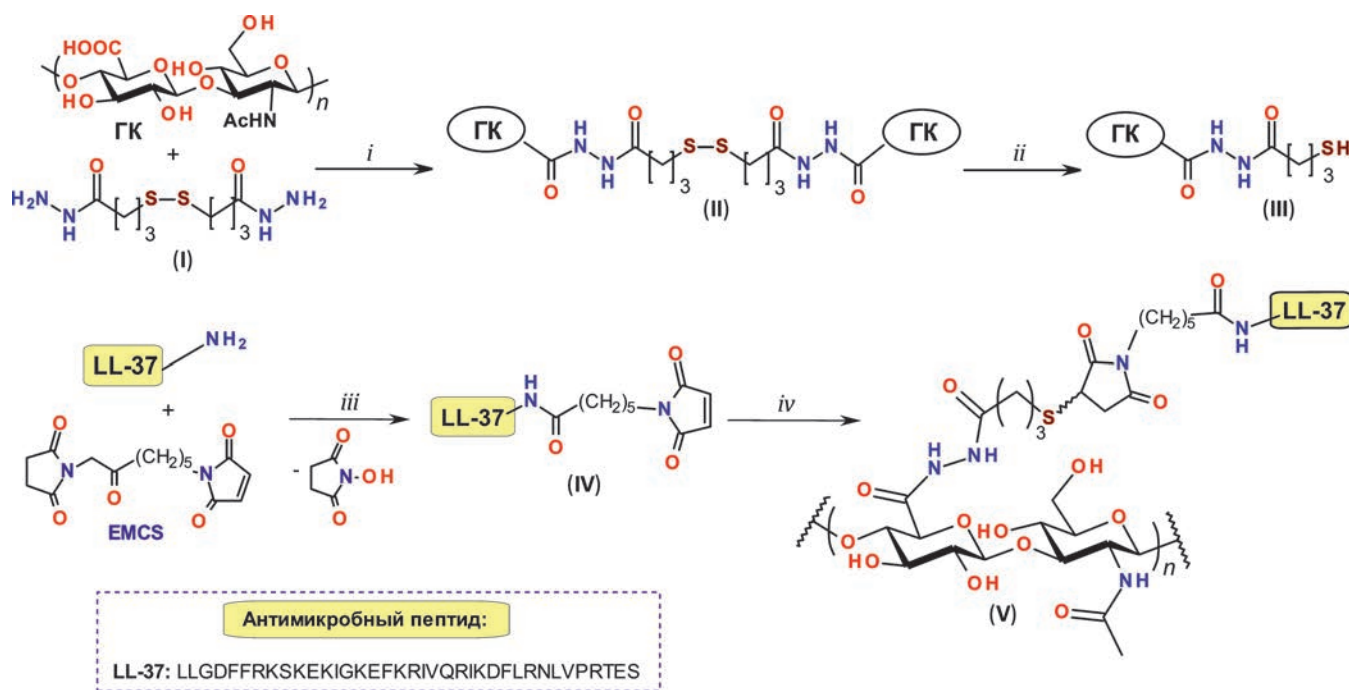


Схема 1. Синтез гибридной молекулы (V) на основе гиалуроновой кислоты и антимикробного пептида LL-37: *i* – EDC, H₂O, pH 4.75, 18–20°C, 2 ч; *ii* – DTT, H₂O, pH 7→8.5, 18–20°C, 24 ч; *iii* – ацетон–H₂O, pH 7, 18–20°C, 2 ч; *iv* – ГК-SH (III), H₂O, pH 4.75→7, 36–38°C, 2 ч.

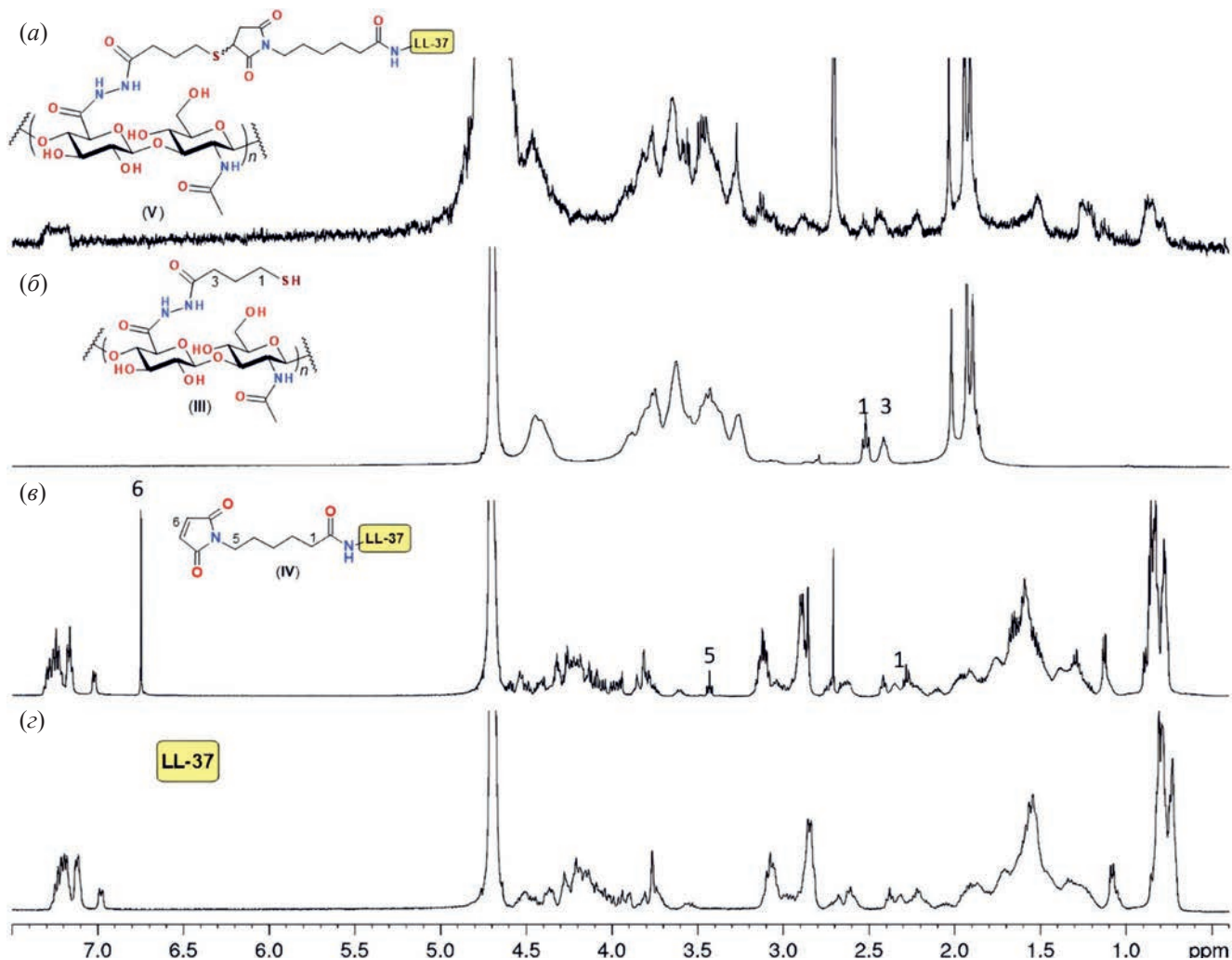


Рис. 1. ^1H -ЯМР-спектры соединений (III–V) и антимикробного пептида LL-37 в D_2O : (а) – гибридная молекула ГК–LL-37 (V); (б) – ГК–SH (III) (DS = 15%); (в) – конъюгат EMCS–LL-37 (IV); (г) – пептид LL-37.

летные сигналы протонов алкандиольной части линкера C^1H_2 и C^5H_2 при 2.28 и 3.45 м.д. соответственно.

В спектре ^1H -ЯМР гибридной молекулы (V) присутствовали уширенные сигналы, принадлежащие как полисахаридной части, так и олигопептидному фрагменту. При этом в спектре отсутствовал сигнал малеимидной группы при 6.75 м.д., что свидетельствует о полноте протекания реакции между соединениями (III) и (IV) (рис. 1).

Органический слой формировали на ПЭО-модифицированной поверхности крупнозернистого и наноструктурированного титана путем физико-химической адсорбции конъюгата (V) из раствора.

Антибактериальное действие покрытий и их влияние на способность бактерий формировать биопленки изучали с использованием тест-культур *S. aureus* P 209, *E. faecium* Ef79OSAU, *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *E. coli* ATCC 25922 (табл. 1). Эксперименты *in vitro* показали, что ПЭО-покрытие не оказывает прямого бактерицидного действия на тест-штаммы. Исходные ГК и LL-37 снижают адгезию грамположительных и грамотрицательных бактерий на поверхности КЗ–Ti–ПЭО и нано–Ti–ПЭО на 17.4–45.5%. Исключения составили тест-штаммы *E. faecium* и *P. aeruginosa*, степень их адгезии на модифицированном ГК и LL-37 наноструктурированном титане практически не

Таблица 1. Влияние органических покрытий ГК, LL-37 и ГК–LL-37 (V) на адгезию микроорганизмов на поверхности ПЭО-модифицированного крупнозернистого (КЗ-Тi-ПЭО) и наноструктурированного (нано-Тi-ПЭО) титана

Образец	<i>S. aureus</i> (P 209)		<i>E. faecium</i> (Ef790SAU)		<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)		<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	
	КЗ-Тi-ПЭО	нано-Тi-ПЭО	КЗ-Тi-ПЭО	нано-Тi-ПЭО	КЗ-Тi-ПЭО	нано-Тi-ПЭО	КЗ-Тi-ПЭО	нано-Тi-ПЭО
Без органического покрытия	4.6 ± 0.06	4.2 ± 0.11	3.14 ± 0.12	2.66 ± 0.08	3.6 ± 0.15	3.9 ± 0.09	3.9 ± 0.23	3.8 ± 0.19
ГК	3.8 ± 0.08** (–17.4%)	3.2 ± 0.23* (–23.8%)	2.56 ± 0.14* (–18.5%)	2.4 ± 0.05 (–0.1%)	2.4 ± 0.09* (–33.3%)	4.5 ± 0.12 (+15.4%)	2.85 ± 0.23* (–26.9%)	2.07 ± 0.12* (–45.5%)
LL-37	3.3 ± 0.13** (–28.3%)	3.4 ± 0.13* (–19.0%)	2.45 ± 0.23 (–21.9%)	2.45 ± 0.15 (–0.03%)	2.6 ± 0.04* (–27.8%)	3.4 ± 0.34 (–0.03%)	2.16 ± 0.04* (–44.6%)	2.4 ± 0.03* (–36.8%)
ГК–LL-37 (V)	2.3 ± 0.08** (–50.0%)	3.1 ± 0.11* (–26.2%)	1.9 ± 0.12** (–39.5%)	2.2 ± 0.13* (–17.3%)	2.4 ± .07* (–33.3%)	3.3 ± 0.08 (–15.4%)	2.32 ± 0.07* (–40.5%)	1.94 ± 0.06** (–48.9%)

Приведены значения оптической плотности и процент изменения оптической плотности относительно контрольного образца без органического покрытия. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ (достоверность различия признаков в контроле и опыте).

отличалась от образцов без органического покрытия, а в случае ГК на нано-Тi-ПЭО количество адгезированных клеток *P. aeruginosa* увеличивалось на 15.4%.

Влияние ГК на поверхности ПЭО-модифицированного титана на способность микроорганизмов формировать биопленки может быть связано с увеличением гидрофильности поверхности за счет создания гидратной оболочки в результате адгезии полисахарида [34–36]. Эффект LL-37 может заключаться как в мембранной активности, так и в его способности действовать непосредственно на внутриклеточные мишени, в первую очередь на нуклеиновые кислоты (ДНК или РНК) [17].

Покрытие ГК–LL-37 (V) подавляло адгезию всех изученных тест-штаммов на поверхности КЗ-Тi-ПЭО и нано-Тi-ПЭО. Наибольший ингибирующий эффект был показан образцами КЗ-Тi-ПЭО и нано-Тi-ПЭО в отношении *S. aureus* и *E. coli* (на 48.9–50.0%).

Синергетический эффект, достигаемый от химического связывания LL-37 с ГК, следует отметить для обоих типов металлических образцов в отношении образования биопленок (адгезии) *S. aureus*, *E. faecium*, а также *P. aeruginosa* и *E. coli* на наноструктурированном титане.

Таким образом, ингибирующее действие конъюгата ГК–LL-37 (V) на способность микроорганизмов к формированию биопленок может быть обусловлено как барьерным эффектом полисахарида, так и ингибирующими свойствами АМП, активность которого не снижается при связывании с полисахаридной основой.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для синтеза конъюгата ГК–LL-37 (V) использовали следующие реагенты: коммерчески доступную низкомолекулярную гиалуроновую кислоту (<0.1 МДа), олигопептид LL-37 трифторацетат (Bachem, Великобритания), ε-аминокапроновую кислоту (98.5%, Merck, Германия), малеиновый ангидрид (>98%, Acros, Бельгия), N-гидрокисукцинимид (NHS, >98%, Acros), дициклогексилкарбодиимид (DCC, 99%, Acros), реагент Келланда (DTT, 98%, Abcr), 4-аминобутановую кислоту (>99%, Acros). Дигидразид 4,4'-дитиобутановой кислоты получали по методу Verduyse et al. [33], SH-ГК (III) – по известной методике Shu et al. [37]. EMCS синтезировали согласно методу Nielsen et al. [38].

Спектры ¹H-ЯМР регистрировали на спектрометре AVANCE-500 (Bruker, Германия; рабочая час-

тота 500.17 МГц). В качестве растворителя использовали D₂O. Образцы готовили в стандартной ампуле диаметром 5 мм. Химические сдвиги атомов водорода приведены в шкале δ (м.д.) относительно тетраметилсилана (TMS).

Синтез конъюгата EMCS–LL-37 (IV). Олигопептид LL-37 (5 мг, 0.001 ммоль) растворяли в 0.62 мл воды при pH 7. При интенсивном перемешивании к раствору LL-37 добавляли эквимольное количество EMCS 0.36 мг (0.001 ммоль), растворенного в 0.14 мл ацетона. Реакционную массу перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, далее сушили. Получили соединение EMCS–LL-37 (IV) в виде белого порошка. Спектр ¹H-ЯМР (500.17 МГц, D₂O, δ , м.д., *J*, Гц): 0.68–0.98 (м, CH₂, CH₃ (Lys, Ile, Val), LL-37), 1.04–4.65 (м, CH, CH₂, LL-37), 2.28 (т, C¹H₂, *J* 5.0, EMCS), 3.45 (т, 2H, C⁵H₂, *J* 7.2, EMCS), 6.75 (с, 2H, C⁶H₂, EMCS), 6.99–7.34 (м, C₆H₅ (Phe), LL-37).

Синтез гибридной молекулы ГК–LL-37 (V). К раствору 4.8 мг SH-производного ГК (III) в 0.8 мл бидистиллированной воды (0.009 ммоль, 10 мМ) при pH 7 (pH был скорректирован добавлением 0.1 М раствора NaOH) порционно добавляли предварительно приготовленный раствор конъюгата (IV) (0.001 ммоль растворяли в 0.8 мл бидистиллированной воды). Реакционную массу перемешивали в течение 1–2 ч при 36–38°C, затем переносили в диализную ленту и проводили диализ против раствора дистиллированной воды с NaCl (100 ммоль NaCl в 1 л раствора) в течение 1 сут с последующим диализом против дистиллированной воды в течение 2 сут, затем сушили при пониженном давлении. Соединение (V) получали с количественным выходом в виде бесцветной пленки. Спектр ¹H-ЯМР (500.17 МГц, D₂O, δ , м.д.): 0.73–0.98 (м, CH₂, CH₃ (Lys, Ile, Val), LL-37), 1.75–4.60 (м, CH, CH₂, LL-37), 1.94 (с, C¹¹H₃), 2.16–2.29

(м, C¹H₂), 2.36–2.57 (м, C¹⁰H₂), 2.58–2.78 (м, C⁶H₂, C⁸H₂), 3.02–4.60 (м, C⁵H₂, C⁷H, CH (ГК)), 7.11–7.36 (м, C₆H₅ (Phe), LL-37).

Подготовка ПЭО-модифицированных металлических образцов. В качестве материала подложки использовали титан Grade 4 (ASTM F67). Химический состав Ti Grade 4: Fe – 0.15, C – 0.05, O – 0.36, N – 0.007, H – 0.002, Ti – остаток. Наноструктурирование титана (нано-Ti) осуществляли путем интенсивной пластической деформации [39] методом равноканального углового прессования (РКУП-С) с последующей вытяжкой [40]. В результате получили титановые стержни диаметром 8 мм. Далее из стержня вырезали диски толщиной 0.5 мм. Образцы крупнозернистого титана (КЗ-Ti) вырезали из стержней того же диаметра. Далее из стержня вырезали диски толщиной 0.5 мм.

Перед обработкой ПЭО образцы шлифовали на наждачной бумаге SiC зернистостью 600, 1000, 2000 до получения значения шероховатости *Ra* < 0.15 мкм. Затем образцы промывали в дистиллированной воде, очищали в изопропиловом спирте с помощью ультразвуковой ванны в течение 5 мин и сушили на воздухе при комнатной температуре. Плазменно-электролитическое окисление проводили на автоматизированном оборудовании пиковой мощностью 50 кВт в импульсном биполярном режиме при управлении напряжением [28–30]. Параметры процесса ПЭО поддерживали на заданном уровне с точностью $\pm 2\%$. Процесс ПЭО проводили в 10-литровом стеклянном сосуде, снабженном теплообменником из нержавеющей стали. Детали обработки ПЭО представлены в табл. 2. В качестве держателя образца использовали проволоку из титанового сплава марки Grade 2 диаметром 1 мм. Образец крепили к петле диаметром 8 мм на конце держателя.

Таблица 2. Режим обработки ПЭО

Состав электролита	Положительный импульс		Отрицательный импульс		Частота, Гц	Т, °С	Продолжительность, мин
	напряжение, V	рабочий цикл, %	напряжение, V	рабочий цикл, %			
20 г/л Na ₃ PO ₄ ·12 H ₂ O	470	51	40	26	300	20	5

Влияние образцов титана с ПЭО-покрытиями на способность бактерий формировать биопленки.

Образцы титана с ПЭО-покрытием очищали ультразвуком в течение 10 мин в 95%-ном этаноле и промывали деионизированной водой, сушили на воздухе и стерилизовали автоклавированием при 134°C. Для нанесения органического покрытия металлические образцы помещали в чашку Петри с раствором ГК, LL-37 или ГК–LL-37(V) с концентрацией 1 мг/мл, стерилизовали фильтрованием через фильтр СА 0.22 мкм. Через 3 ч образцы сушили на воздухе в ламинарном боксе.

Тест-культуры *S. aureus* P 209, *E. faecium* Ef79-OSAU, *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 27853 выращивали на агаре Мюллера–Хинтона (HiMedia, Индия) при 37°C в течение 18–24 ч, затем готовили взвесь микроорганизмов в физиологическом растворе плотностью 0.181, 0.184 и 0.228 (для грамотрицательных бактерий *E. coli* и *P. aeruginosa* использовали одну оптическую плотность – 0.228) соответственно. Значения оптической плотности штаммов определяли при помощи спектрофотометра STAT FAX 2100 (Awarenes Technology, США) при длине волны 492 нм.

В лунки полипропиленового планшета с образцами титана с ПЭО-покрытием и без него вносили по 100 мкл бактериальной взвеси. Отдельный ряд в планшете занимали лунки со взвесью тест-штаммов без образцов титана, что служило контролем роста культуры. В другой ряд добавляли стерильный бульон Мюллера–Хинтона (HiMedia, Индия) в качестве контроля стерильности и холостой пробы для сканирования лунок. Планшеты инкубировали при 37°C. Через 18–24 ч образцы Ti осторожно промывали физиологическим раствором, а затем для определения количества прикрепившихся бактериальных клеток на поверхности титана окрашивали 0.1%-ным раствором генцианвиолета (Химреактивснаб, Россия). Далее клетки разрушали спиртом, измеряли оптическую плотность красителя, выходящего из разрушенных клеток, и определяли способность бактерий формировать биопленки по методике O'Toole et al. [41].

Статистический анализ результатов проводили с помощью пакета программ Microsoft Excel 2007. Значимость различий средних величин показателей оценивали с помощью методов вариационной статистики (*t*-критерий Стьюдента). Все эксперименты проводили в трех повторах. Статистически значимыми считали отличия при $p < 0.05$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получено EMCS-производное олигопептида LL-37, которое затем конъюгировали с SH-модифицированной гиалуроновой кислотой с получением нового гибридного соединения ГК–LL-37. Полученный конъюгат ГК–LL-37 был испытан в качестве органического покрытия для ПЭО-модифицированного крупнозернистого и наноструктурированного титана. На основе исследований *in vitro* установлен антибактериальный эффект гибридной молекулы в составе неорганического ПЭО-покрытия, заключающийся в значимом ($p < 0.05$) подавлении способности *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecium* и *E. coli* формировать биопленки. Представленный подход может быть использован для последующего дизайна и разработки необрастающих антимикробных покрытий для снижения риска возникновения инфекционно-воспалительных заболеваний бактериальной природы при использовании имплантатов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Структурные исследования проведены в Региональном Центре коллективного пользования “Агидель” Уфимского федерального исследовательского центра РАН.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания Института нефтехимии и катализа Уфимского федерального исследовательского центра РАН (№ FMRS-2022-0081).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Elias C.N., Lima J.H.C., Valiev R., Meyers M.A.* // JOM. 2008. V. 60. P. 46–49.
<https://doi.org/10.1007/s11837-008-0031-1>
2. *Geetha M., Singh A.K., Asokamani R., Gogia A.K.* // Prog. Mater. Sci. 2009. V. 54. P. 397–425.
<https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2008.06.004>
3. *Chen Q., Thouas G.A.* // Mater. Sci. Eng. R Rep. 2015. V. 87. P. 1–57.
<https://doi.org/10.1016/j.mser.2014.10.001>
4. *Franz S., Rammelt S., Scharnweber D., Simon J.C.* // Biomaterials. 2011. V. 32. P. 6692–6709.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.078>
5. *Zhou G., Groth T.* // Macromol. Biosci. 2018. V. 18. P. 1800112.
<https://doi.org/10.1002/mabi.201800112>
6. *Meyers S.R., Grinstaff M.W.* // Chem. Rev. 2012. V. 112. P. 1615–1632.
<https://doi.org/10.1021/cr2000916>
7. *Zhang B.G.X., Myers D.E., Wallace G.G., Brandt M., Choong P.F.M.* // Int. J. Mol. Sci. 2014. V. 15. P. 11878.
<https://doi.org/10.3390/ijms150711878>
8. *Han A., Tsoi J.K.H., Rodrigues F.P., Leprince J.G., Palin W.M.* // Int. J. Adhesion Adhesives. 2016. V. 69. P. 58–71.
<https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2016.03.022>
9. *Chourirfa H., Bouloussa H., Migonney V., Falentin-Daudré C.* // Acta Biomater. 2019. V. 83. P. 37–54.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.10.036>
10. *Rice L.B.* // J. Infect. Dis. 2008. V. 197. P. 1079.
<https://doi.org/10.1086/533452>
11. *Pringle N.A., Dube A., Adam R.Z., D'Souza S., Aucamp M.* // Materials. 2021. V. 14. P. 3167.
<https://doi.org/10.3390/ma14123167>
12. *Wang J., Dou X., Song J., Lyu Y., Zhu X., Xu L., Li W., Shan A.* // Med. Res. Rev. 2019. V. 39. P. 831–859.
<https://doi.org/10.1002/med.21542>
13. *Mahlapuu M., Häkansson J., Ringstad L., Björn C.* // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2016. V. 6. P. 194.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>
14. *Riool M., de Breij A., Drijfhout J.W., Nibbering P.H., Zaat S.A.J.* // Front. Chem. 2017. V. 5. P. 63.
<https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00063>
15. *Costa B., Martínez-de-Tejada G., Gomes P.A.C., Martins M.C.L., Costa F.* // Pharmaceutics. 2021. V. 13. P. 1918.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111918>
16. *Mookherjee N., Brown K.L., Bowdish D.M.E., Doria S., Falsafi R., Hokamp K., Roche F.M., Mu R., Doho G.H., Pistolic J., Powers J.-P., Bryan J., Brinkman F.S.L., Hancock R.E.W.* // J. Immunol. 2006. V. 176. P. 2455–2464.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.4.2455>
17. *Duplantier A.J., van Hoek M.L.* // Front. Immunol. 2013. V. 4. P. 143.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00143>
18. *Neshani A., Zare H., Eidgahi M.R.A., Kakhki R.K., Safdari H., Khaledi A., Ghazvini K.* // Gene Rep. 2019. V. 17. P. 100519.
<https://doi.org/10.1016/j.genrep.2019.100519>
19. *Gabriel M., Nazmi K., Veerman E.C., Amerongen A.V.N., Zentner A.* // Bioconjug. Chem. 2006. V. 17. P. 548–550.
<https://doi.org/10.1021/bc050091v>
20. *He Y., Mu C., Shen X., Yuan Z., Liu J., Chen W., Lin Ch., Tao B., Liu B., Cai K.* // Acta Biomater. 2018. V. 80. P. 412–424.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.036>
21. *Parfenova L.V., Galimshina Z.R., Gil'fanova G.U., Alibaeva E.I., Danilko K.V., Pashkova T.M., Kartashova O.L., Farrakhov R.G., Mukaeva V.R., Parfenov E.V., Nagumothu R., Valiev R.Z.* // Surf. Interfaces. 2022. V. 28. P. 101678.
<https://doi.org/10.1016/j.surfin.2021.101678>
22. *Volpi N., Schiller J., Stern R., Soltés L.* // Curr. Med. Chem. 2009. V. 16. P. 1718–1745.
<https://doi.org/10.2174/092986709788186138>
23. *Brubaker C.E., Messersmith Ph.B.* // Langmuir. 2012. V. 28. P. 2200–2205.
<https://doi.org/10.1021/la300044v>
24. *Schante C., Zuber G., Vandamme Th.* // Carbohydr. Pol. 2011. V. 85. P. 469–489.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.03.019>
25. *Bastow E.R., Byers S., Golub S.B., Clarkin C.E., Pitsillides A.A., Fosang A.J.* // J. Cell. Mol. Life Sci. 2008. V. 65. P. 395–413.
<https://doi.org/10.1007/s00018-007-7360-z>

26. Day A.J., de la Motte C.A. // Trends Immunol. 2005. V. 26. P. 637–643.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2005.09.009>
27. Stern R., Asari A.A., Sugahara K.N. // Eur. J. Cell. Biol. 2006. V. 85. P. 699–715.
<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2006.05.009>
28. Parfenov E.V., Parfenova L.V., Dyakonov G.S., Danilko K.V., Mukaeva V.R., Farrakhov R.G., Lukina E.S., Valiev R.Z. // Surf. Coatings Technol. 2019. V. 357. P. 669–683.
<https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.10.068>
29. Parfenova L.V., Lukina E.S., Galimshina Z.R., Gil'fanova G.U., Mukaeva V.R., Farrakhov R.G., Danilko K.V., Dyakonov G.S., Parfenov E.V. // Molecules. 2020. V. 25. P. 229.
<https://doi.org/10.3390/molecules25010229>
30. Parfenov E.V., Parfenova L.V., Mukaeva V.R., Farrakhov R.G., Stotskiy A., Raab A., Danilko K.V., Nagumothu R., Valiev R.Z. // Surf. Coatings Technol. 2020. V. 404. P. 126486.
<https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2020.126486>
31. Pouyani T., Prestwich G.D. // Bioconjug. Chem. 1994. V. 5. P. 339.
<https://doi.org/10.1021/bc00028a010>
32. Varghese O.P., Sun W., Hilborn J., Ossipov D.A. // J. Am. Chem. Soc. 2009. V. 131. P. 8781.
<https://doi.org/10.1021/ja902857b>
33. Vercruyse K.P., Marecak D.M., Marecek J.F., Prestwich G.D. // Bioconjug. Chem. 1997. V. 8. P. 686–694.
<https://doi.org/10.1021/bc9701095>
34. Hu X., Neoh K.-G., Shi Z., Kang E.-T., Poh C., Wang W. // Biomaterials. 2010. V. 31. P. 8854.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.006>
35. Chua P.H., Neoh K.G., Shi Z., Kang E.T. // Biomed. Mater. Res. A. 2008. V. 87A. P. 1061–1074.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.31854>
36. Lv H., Chen Z., Yang X., Cen L., Zhang X., Gao P. // J. Dent. 2014. V. 42. P. 1464–1472.
<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.06.003>
37. Shu X.Z., Liu Y., Luo Y., Roberts M.C., Prestwich G.D. // Biomacromolecules. 2002. V. 3. P. 1304–1311.
<https://doi.org/10.1021/bm025603c>
38. Nielsen O., Buchardt O. // Synthesis. 1991. V. 10. P. 819–821.
<https://doi.org/10.1055/s-1991-26579>
39. Gunderov D.V., Polyakov A.V., Semenova I.P., Raab G.I., Churakova A.A., Gimaltdinova E.I., Sabirov I., Segurado J., Sitdikov V.D., Alexandrov I.V., Enikeev N.A., Valiev R.Z. // Mater. Sci. Eng. A. 2013. V. 562. P. 128–136.
<https://doi.org/10.1016/j.msea.2012.11.007>
40. Dyakonov G.S., Zemtsova E., Mironov S., Semenova I.P., Valiev R.Z., Semiatin S.L. // Mater. Sci. Eng. A. 2015. V. 648. P. 305–310.
<https://doi.org/10.1016/j.msea.2015.09.080>
41. O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R. // Ann. Rev. Microbiol. 2000. V. 54. P. 49–79.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>

Hybrid Antimicrobial Coating Based on Conjugate of Hyaluronic Acid with Peptide LL-37 for PEO-Modified Titanium Implants

L. V. Parfenova^{*,#}, Z. R. Galimshina^{*}, G. U. Gil'fanova^{*}, E. I. Alibaeva^{*}, T. M. Pashkova^{**}, O. L. Kartashova^{**}, R. G. Farrakhov^{***}, V. R. Aubakirova^{***}, and E. V. Parfenov^{***}

[#] Phone: +7 (347) 284-35-27; e-mail: luda_parfenova@ipc-ras.ru

^{*} Institute of Petrochemistry and Catalysis of Russian Academy of Sciences,
prosp. Oktyabrya 141, Ufa, 450075 Russia

^{**} Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
ul. Pionerskaya 11, Orenburg, 460000 Russia

^{***} Ufa University of Science and Technology, ul. Zaki Validi 32, Ufa, 450076 Russia

A conjugate of hyaluronic acid and antimicrobial peptide LL-37 was synthesized for the first time. The hybrid compound was tested as an antimicrobial organic coating for titanium samples with an inorganic sublayer obtained by plasma electrolytic oxidation (PEO) of the surface. As a result of *in vitro* studies, the antibacterial effect of the hybrid molecule within the inorganic PEO coating was established, which consists of a significant ($p < 0.05$) suppression of the ability of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium* and *Escherichia coli* to form biofilms. The presented approach can be utilized for the subsequent design and development of non-fouling antimicrobial coatings to decrease the risk of infectious diseases caused by bacteria when using implants.

Keywords: oligopeptides, aminobisphosphonates, polysaccharides, antimicrobial coatings, implants, titanium



УДК 57.021

НАНОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИФЕРУЛОВЫХ И ПОЛИГЕНТИЗИНОВЫХ КИСЛОТ КАК НОВЫЕ НОСИТЕЛИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

© 2024 г. И. В. Смирнов*, #, А. В. Лисов**, А. С. Казаков***, А. Н. Звонарев**, Н. Е. Сузина**, М. Ю. Земскова**, #

* Сколковский институт науки и технологий, Россия, 121205 Москва, ул. Нобеля, 3

** Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,

ФИЦ “Пуцинский научный центр биологических исследований” РАН,

Россия, 142290 Пуцино, просп. Науки, 5

*** Институт биологического приборостроения РАН, Россия, 142290 Пуцино, просп. Науки, 7

Поступила в редакцию 19.09.2023 г.

После доработки 11.10.2023 г.

Принята к публикации 12.10.2023 г.

Лигниновые полимеры и их производные активно используются в различных областях биомедицины для создания биосовместимых материалов, в качестве лекарственных средств, а также для образования наночастиц. Однако природные полимерные соединения, получаемые из растительного сырья или мономеров, представляют собой смесь соединений, имеющих высокую гетерогенность в химической структуре, что значительно усложняет определение их биологической активности. В данной работе был применен метод регулируемого синтеза полифенольных соединений с использованием фермента лакказы, при помощи которого можно получать полимеры с определенной структурой. На основе ферментативно синтезированных лигнин-подобных полимеров из феруловых и гентиизиновых фенольных мономеров были сформированы стабильные в физиологических условиях наночастицы. Показано, что полученные наночастицы могут различаться по морфологии от глобулярных до фибриллярных структур в зависимости от метода их формирования. Наночастицы, полученные из лигнин-подобных полимеров феруловой и гентиизиновой кислот, не обладают цитотоксичностью для культивируемых клеток человека Vj-5ta, MDA-MB-231 и MCF-7, и их можно использовать для загрузки низкомолекулярными гидрофобными соединениями, включая противоопухолевый препарат доксорубин. Показано, что полиферуловые наночастицы активно поглощаются опухолевыми клетками, растущими как в монослойной культуре, так и в составе сфероидов. Выявлено, что по сравнению со свободным соединением, доксорубин в составе наночастиц оказывает большее цитотоксическое воздействие на клетки рака молочной железы. Полученные результаты указывают на возможность эффективного использования полиферуловых наночастиц для пассивной доставки лекарственных средств при терапии новообразований.

Ключевые слова: лакказа, феруловая кислота, гентиизиновая кислота, лигнин-подобные полимеры, доксорубин

DOI: 10.31857/S0132342324020024, **EDN:** ONQXQT

ВВЕДЕНИЕ

Традиционные варианты лечения рака фармакологическими препаратами имеют определенные ограничения, включая низкую селективность действия, недостаточную концентрацию лекарственного сред-

ства при достижении опухолевых тканей, цитотоксичность для здоровых тканей, а также развитие множественной лекарственной устойчивости. Создание новых средств доставки лекарств в клетки опухоли целевым образом в настоящее время рассматривается как один из важнейших вариантов решения этих

Сокращения: DLS – динамическое светорассеяние; Dox – доксорубин; PDI – индекс полидисперсности; pDMF – 2,6-диметоксифенольные полимеры; pFA – феруловые полимеры; pGA – гентиизиновые полимеры; TEM – просвечивающая электронная микроскопия; НЦ – низкоскоростное центрифугирование; НЧ – наночастицы.

#Автор для связи: (тел.: +7 (977) 198-26-16; эл. почта: ivan_smirnov_98@mail.ru; тел.: +7 (929) 913-27-56; эл. почта: marinazemskova9@gmail.com).

проблем. Использование наночастиц (НЧ) – одна из наиболее активно развивающихся областей фундаментальной онкологии [1]. Для создания НЧ используются различные материалы: органические молекулы (липиды, альбумин, полилактоиды на основе молочной или гликолевой кислот и их сополимеры) [2]; неорганические материалы (частицы золота, SiO_2 , графеновые нанотрубки) [3], а также вирусные частицы [4, 5]. Материалы, используемые в качестве носителей для адресной доставки, должны обладать рядом свойств: способностью переносить соединения различной природы (как гидрофильные, так и гидрофобные); сохраняться в организме достаточное для проявления лечебного эффекта время; целевым образом воздействовать на клетки опухоли; не обладать побочными эффектами. Не все материалы, используемые для получения НЧ, могут соответствовать этим требованиям. Например, наночастицы на основе полилактоидов/гликолидов при биоразложении сильно закисляют микроокружение клеток [6]. Наночастицы на основе неорганических материалов, таких как серебро, золото, SiO_2 , в свою очередь, слишком долго не выводятся из организма, что приводит к накоплению наночастиц в печени, почках, легких и может приводить к нежелательным побочным эффектам – усилению окислительного стресса и выработке воспалительных цитокинов. Также НЧ из всех материалов могут поглощаться макрофагами, что снижает эффективную концентрацию НЧ в целевых клетках и органах. Поэтому в мире постоянно проводится разработка новых НЧ на основе материалов, обеспечивающих оптимальные фармакологические свойства.

В последние годы активно разрабатываются способы получения НЧ на основе биополимера лигнина. Лигнин – ароматическое полифенольное соединение, содержащееся в растениях. Лигнин нерастворим в воде, нетоксичен, дешев в получении, что определило его использование в разработке наночастиц. Недавно были получены и охарактеризованы биоразлагаемые НЧ на основе лигнина [7]. Опубликована работа, в которой НЧ на основе лигнина использовали для успешной доставки лекарственных препаратов в опухолевые клетки [8]. Это говорит о высоком потенциале использования

новых НЧ на основе лигнина и его производных для терапии новообразований.

Лигнин-подобные полимеры схожи по строению с лигнином. Такие полимеры могут быть получены с использованием ферментативного синтеза из фенольных мономеров в результате действия оксидоредуктазы – лакказы, выделенной из разлагающих древесину грибов – базидиомицетов [9]. Также возможен химический синтез лигнин-подобных полимеров посредством окисления фенольной части мономера [10, 11]. Эти полимеры обладают рядом преимуществ по сравнению с натуральным лигнином: предсказуемостью и определенностью химической структуры, дешевизной синтеза и возможностью внесения модификаций в химический состав соединений в ходе синтеза. Все это позволяет улучшить такие характеристики наносистем, как заряд, стабильность, эффективность проникновения в опухолевые клетки и возможность их использования для пассивной [12] и адресной [13] доставки лекарственных соединений.

Цель данной работы – получение стабильных наночастиц на основе лигнин-подобных полимеров, синтезированных с использованием фермента лакказы, анализ их физико-химических свойств, цитотоксичности и эффективности проникновения в культивируемые клетки человека Vj-5ta, MDA-MB-231 и MCF-7.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ферментативный синтез лигнин-подобных полимеров. В работе использовали 12 фенольных мономеров (пирокатехин, 2,6-диметоксифенол, 3,5-диметоксифенол, 2-аминофенол, сиреневый альдегид, сиреневая, галловая, ванилиновая, ортокумаровая, кофейная, феруловая и гентизиновая кислоты) для ферментативного синтеза водонерастворимых полимеров с использованием лакказы гриба *Cerrena unicolor*. Показано, что этот фермент способен генерировать водонерастворимые полимеры только из мономеров 2,6-диметоксифенола, феруловой и гентизиновой кислот. Хотя остальные мономеры имеют способность к окислению лакказой [14, 15], они не образовали полимеров в достаточном для визуализации количестве. Выход полимеров в пере-

счете на количество используемых в реакции фенольных мономеров (wt%) составил $66.3 \pm 6.5\%$ для 2,6-диметоксифенола, $48.09 \pm 9.81\%$ для феруловой кислоты и $13.78 \pm 1.78\%$ для гентиизиновой кислоты.

Следовательно, можно предположить, что лакказа *C. unicolor* обладает селективностью относительно разных фенольных мономеров при формировании радикалов, способных к полимеризации. Данная активность, скорее всего, определяется структурой функциональных групп мономеров.

Анализ структуры полимеров полимеров феруловой и гентиизиновой кислот. Для определения структуры водонерастворимых полимеров феруловой и гентиизиновой кислот мы использовали методы ИК-Фурье и ЯМР-спектроскопии.

При анализе ИК-Фурье-спектров полученных полимеров были определены пики поглощения в области $1770\text{--}1750\text{ см}^{-1}$, которые отсутствовали в спектрах соответствующих мономеров (рис. 1). Эти результаты указывают на успешную полимеризацию обоих мономеров феруловых и гентиизиновых кислот. Показано, что в процессе полимеризации участвуют карбоксигруппы мономеров, и образуется сложноэфирная связь по механизму поликонденсации. В остальном спектры мономера и полимера феруловой кислоты сходны (рис. 1а). Однако следует отметить, что у полимера гентиизиновой кислоты обнаруживается добавочный пик поглощения в области 1207 см^{-1} , который предполагает существование колебаний связей С–О–С, которые отсутствуют в мономере гентиизиновой кислоты и возникают в процессе полимеризации (рис. 1б). Также для данного полимера характерен широкий пик в области 3700 см^{-1} , скорее всего, являющийся результатом колебаний водородных связей полимера с водой. В совокупности анализ ИК-спектров подтверждает процесс полимеризации мономеров с использованием лакказы гриба *Cerrena unicolor* и косвенно указывает на более сложную структуру полимера гентиизиновой кислоты по сравнению с полимером феруловой кислоты.

На полученных спектрах ^1H -ЯМР в образцах феруловых полимеров наблюдается “остаток” димерных соединений $\sim 10\%$ (характеристические пики 5.73 и 4.20). Согласно спектру ^1H -ЯМР,

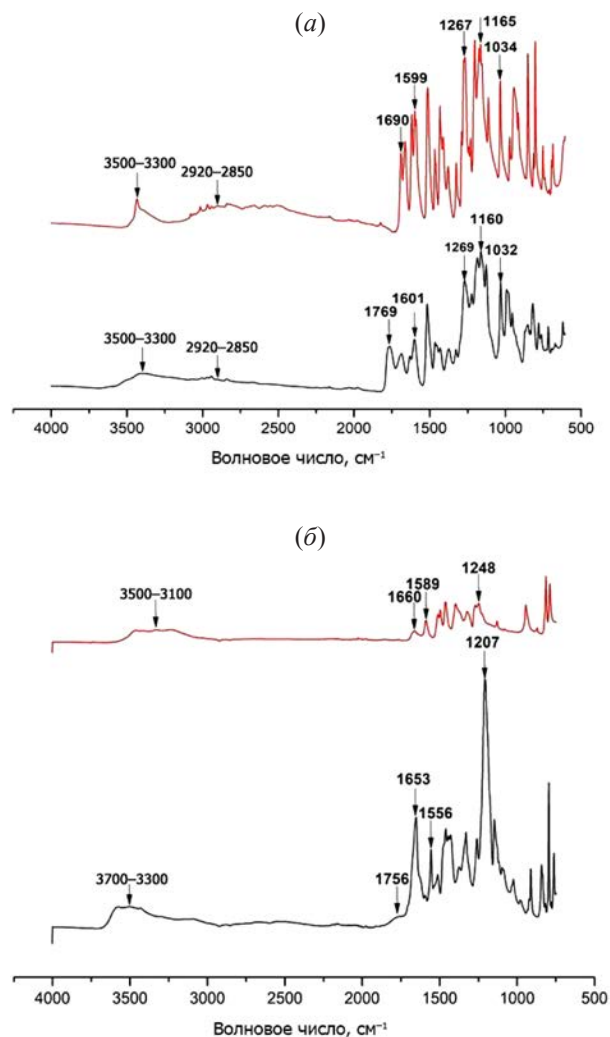


Рис. 1. ИК-Фурье-спектры полимеров (нижние графики) и мономеров (верхние графики): (а) – спектры полиферуловых полимеров и мономеров феруловой кислоты; (б) – спектры полигентиизиновых полимеров и мономеров гентиизиновой кислоты.

широкие пики 7.33–7.24, 6.86–6.82 и 6.82–6.76 получены от трех протонов водорода на бензольном кольце в структурной единице полимера (С2', С6', С5' соответственно) (рис. 2а). Эти пики указывают на успешную полимеризацию феруловой кислоты и подтверждают результаты, полученные методом ИК-Фурье-спектроскопии. Уширенные пики в области 7.58–7.43 относятся к атому С3 при двойной связи, пики 6.47–6.42 – к атому С2 при двойной связи. Пик метильной группы находится в области 3.8 (рис. 2б, 2в). Следует отметить, что такая структура полимера описана и охарактеризована ранее

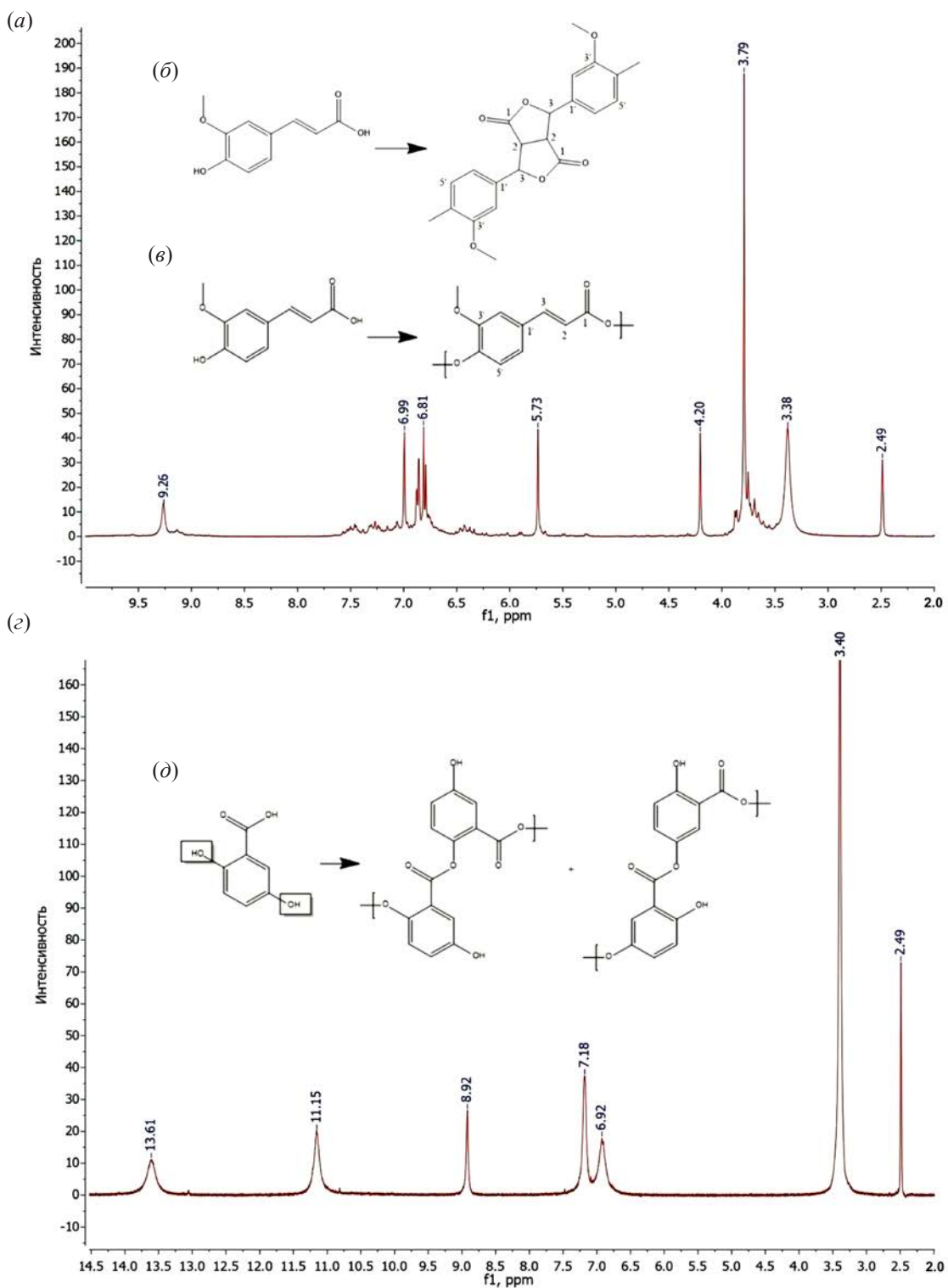


Рис. 2. Спектры ^1H -ЯМР полимеров: (а) – спектры полиферуловых полимеров; (б) – реакция конденсации мономеров с получением доминирующего димера; (в) – реакция полимеризации феруловой кислоты; (г) – спектры полигентизиновых полимеров; (д) – предполагаемая реакция полимеризации гентизиновой кислоты.

при использовании химического синтеза [16]. Следовательно, окислительная реакция, катализируемая лакказой гриба *Cerrena unicolor*, происходит по тому же пути, который наблюдается при химическом окислении мономеров в присутствии SOCl_2 .

В настоящем исследовании впервые проведен ЯМР-анализ полимеров гентизиновой кислоты. Полученный спектр ^1H -ЯМР характеризуется уширенными пиками (возможно, это связано с малыми скоростями протонного обмена) (рис. 2а). Сдвиги в области 7.18 и 6.92 характерны для протонов при бензольном кольце гентизиновой кислоты. Пик 8.92 не характерен для данного мономера, поскольку появляется только при полимеризации соединения. Сдвиги 11.15 и 13.61 относятся к протонам гидроксигрупп (или карбоксигрупп), при этом их наличие в пробе указывает на присутствие двух разных соединений с пиками протонов при одном и том же атоме углерода, но в разных областях. Таким образом, данные ^1H -ЯМР-спектроскопии указывают на наличие двух соединений в составе полимера гентизиновой кислоты (рис. 2а). Также эти данные позволяют предположить, что полимер гентизиновой кислоты имеет разветвленную, нелинейную форму, и процесс полимеризации происходит в результате взаимодействия двух разных гидроксигрупп, поскольку протоны бензольного кольца показывают одинаковые ЯМР-спектры, однако пики гидроксигрупп (или карбоксигрупп) имеют разные сдвиги (рис. 2б).

Формирование наночастиц, их морфология и структура. Поскольку гидрофобные полимеры, растворенные в DMSO, сворачиваются при переводе в водную фазу, формируя наноструктуры, для получения наночастиц был использован метод диализа против воды (см. “Эксперим. часть”). После окончания диализа и осаждения агрегатов центрифугированием (1200 об/мин, 10 мин) суспензию, сформировавшуюся в диализном мешке, использовали для проточной цитометрии, что позволило определить количество частиц в заданном объеме.

Показано, что из 1 мг/мл раствора полимеров в DMSO в 1 мкл формируется $76\,959 \pm 8758$ частиц полиферуловых НЧ (pFA), в то время как для полигентизиновых НЧ (pGA) это количество составило

4520 ± 2815 частиц. Эти данные указывают на меньшую способность водонерастворимых полимеров гентизиновой кислоты к формированию НЧ в водном растворе. Далее НЧ разделили двумя способами: фильтрованием суспензии НЧ через фильтр 0.22 мкм (pFA/0.22, pGA/0.22) и низкоскоростным центрифугированием (НЦ) (см. “Эксперим. часть”). Результаты просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ) позволили морфологически описать и разделить НЧ разных типов по отношению к исходному полимеру, а также по способу получения НЧ. Так, для полиферуловых НЧ (pFA/0.22) и полигентизиновых НЧ (pGA/0.22), полученных посредством фильтрования, характерна стержнеобразная структура (рис. 3а, 3в). Размер НЧ составляет в среднем 120 нм, что оптимально для прохождения НЧ в клетки эукариот. Более детальный анализ частиц показывает их неоднородную внутреннюю структуру с более плотными “ядрами” внутри. В случае, когда полиферуловые НЧ были сформированы диализом и осажены низкоскоростным центрифугированием (pFA/НЦ), наблюдается стандартная для полимерных НЧ шарообразная форма с размером 200–500 нм (рис. 3б). В отличие от полиферуловых НЧ/НЦ, в осадке полигентизиновых НЧ, полученных в результате низкоскоростного центрифугирования (pGA/НЦ), были обнаружены преимущественно фибриллярные структуры большого размера, которые, вероятно, представляют агрегированные молекулы полимеров (рис. 3г). Этот факт указывает на ограниченную способность полигентизиновых полимеров к формированию НЧ, что подтверждает данные проточной цитометрии при определении количества частиц после диализа.

Поскольку результаты ^1H -ЯМР-спектроскопии полимеров гентизиновой кислоты показали наличие двух соединений в составе полимера, мы провели анализ состава полигентизиновых НЧ pGA/0.22. Для получения ЯМР-спектров молекул, формирующих полигентизиновые pGA/0.22, частицы осаждали центрифугированием (18 000 об/мин, 1 ч) на центрифуге Avanti JXN-26 (Beckman Coulter, США) и растворяли в дейтерированном DMSO. На полученных спектрах ^1H -ЯМР (рис. 4) представлено доминантное соединение, имеющее гентизиновый кор от мономера

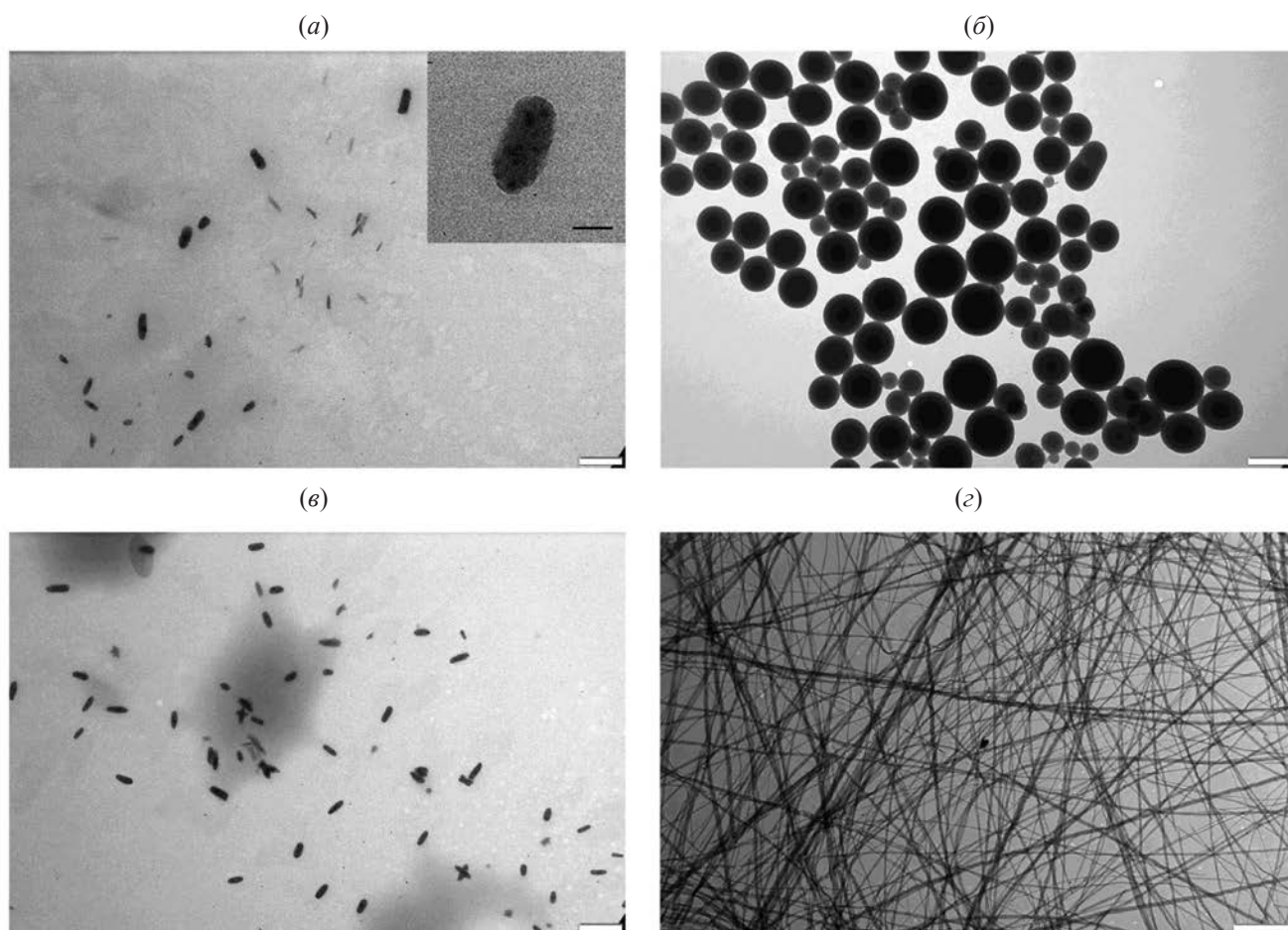


Рис. 3. Микрофотографии просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ): (а) – полиферуловые НЧ pFA/0.22. В правом углу микрофотография НЧ при увеличении (масштаб 100 нм) показывает их неоднородную структуру; (б) – НЧ, фракционированные из коллоидной смеси посредством низкоскоростного центрифугирования (pFA/НЦ); (в, г) – полигентизиновые НЧ, полученные с использованием фильтрации (pGA/0.22) (в) и низкоскоростного центрифугирования (pGA/НЦ) (г). Масштабные отрезки: 500 нм (а–в) и 1 мкм (г).

(сдвиги 7.17 и 6.93 – протоны бензольного кольца мономера). Пик 8.92, который наблюдался в исходном спектре препарата полимера, полученного в результате ферментативного синтеза (рис. 2а), отсутствует. Следовательно, одно из двух соединений (указанных на рис. 2а), синтезированных с помощью лакказы из мономеров гентизиновой кислоты, отсутствует в составе НЧ. Частицы образованы только одним доминантным соединением.

Таким образом, ЯМР-спектры дают представление о препарате полимеров гентизиновой кислоты как гетерогенной смеси. В ней присутствуют два основных водонерастворимых соединения, которые разветвлены, в отличие от феруловых полимеров, имею-

щих линейную форму, и только один из них формирует НЧ.

Полученные данные указывают на то, что лигнин-подобные частицы сильно различаются по морфологии в зависимости от методов очистки суспензий НЧ и самих полимеров. Линейный полимер феруловой кислоты – более эффективная субстанция для формирования НЧ, чем разветвленный полимер гентизиновой кислоты.

Физико-химические свойства НЧ. Для определения гомогенности суспензии НЧ, их размера и стабильности в физиологических растворах использовали метод динамического светорассеяния (DLS). По результатам DLS pFA/0.22 и pGA/0.22 имеют

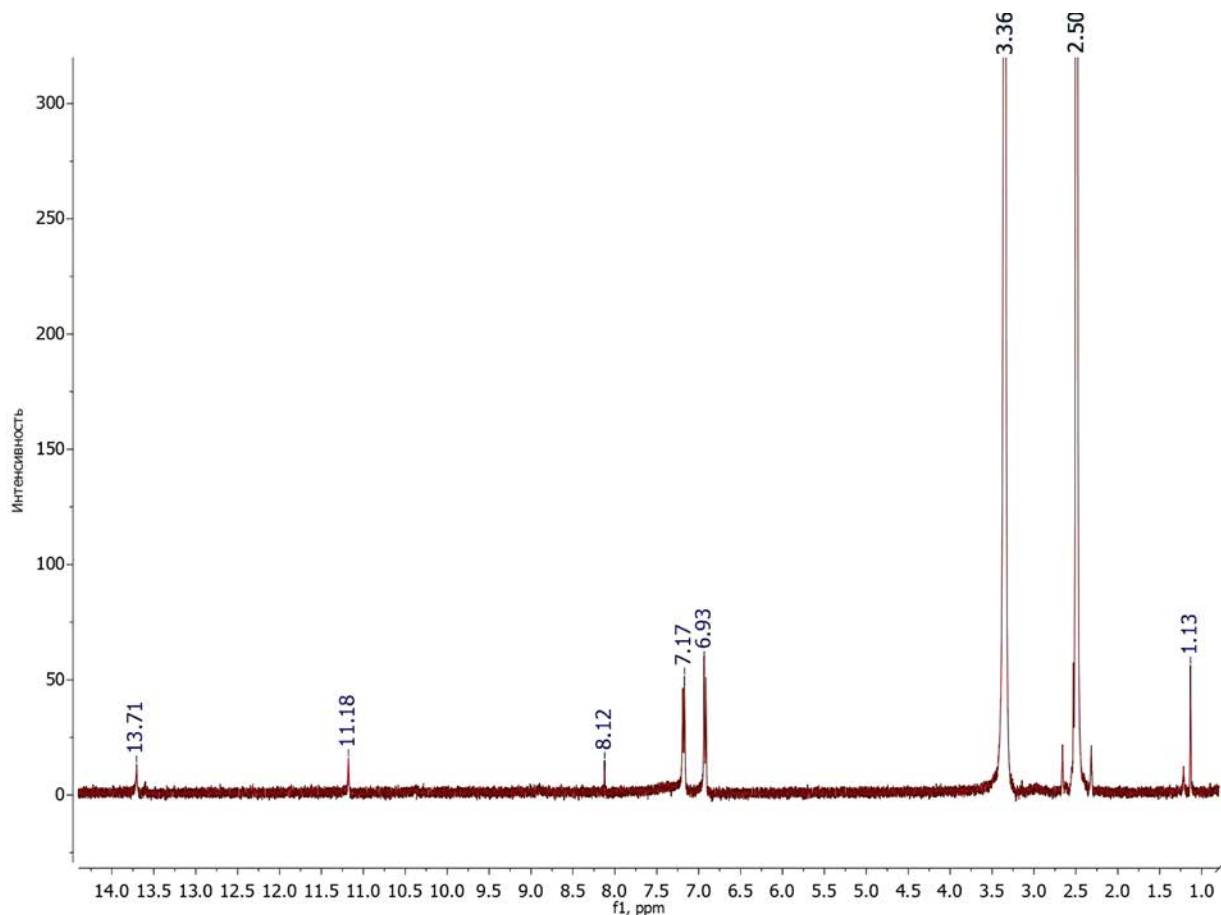


Рис. 4. Спектры ^1H -ЯМР полимеров гентициновых кислот, полученных из НЧ рGA/0.22.

оптимальные размеры для проникновения в клетки (100–200 нм) и низкий индекс полидисперсности (PDI), что указывает на гомогенность суспензии НЧ (рис. 5а, табл. 1). ζ -Потенциал в воде около -30 мВ указывает на анионную природу НЧ и предотвращает их агрегацию вследствие электростатической стабилизации. Необходимо отметить, что в отличие от рFA/0.22 и рGA/0.22, полидиметоксифенольные НЧ рDMF/0.22, полученные нами из полимеров диметоксифенола с применением сходных процедур диализа и фильтрации, в анализе методом DLS показали наличие добавочных пиков, что указывает на гетерогенность коллоидной суспензии этих НЧ (рис. 5а). Для определения физико-химических свойств рFA/0.22 и рGA/0.22 в физиологических растворах, обладающих определенной ионной силой, суспензию НЧ инкубировали в фосфатном буфере

(PBS, pH 7.2). Было показано, что с увеличением времени инкубации размер НЧ, сформированных полигентициновыми и полиферуловыми полимерами, изменяется незначительно (рис. 5б). Этот факт указывает на стабильность НЧ в буферных системах, поскольку индекс полидисперсности (PDI) не превышает 0.4. Также было показано, что суспензии рFA/0.22 и рGA/0.22 стабильны в растворах бычьего сывороточного альбумина (БСА) при концентрациях БСА 0.01–1% (рис. 5г, 5д).

Полируловы НЧ, полученные в результате центрифугирования диализной смеси рFA/НЦ, имеют размер 265.4 ± 14.2 нм (рис. 5в) и $\text{PDI} = 0.048 \pm 0.022$. Эти данные указывают на гомогенность суспензии и отсутствие значимой полидисперсности. Отсутствие агрегации обеспечивается низкими значениями ζ -потенциала (-47 мВ). Как и ожидалось, в отличие от полиферуловых рFA/НЦ, полигентициновые рFA/НЦ, полу-

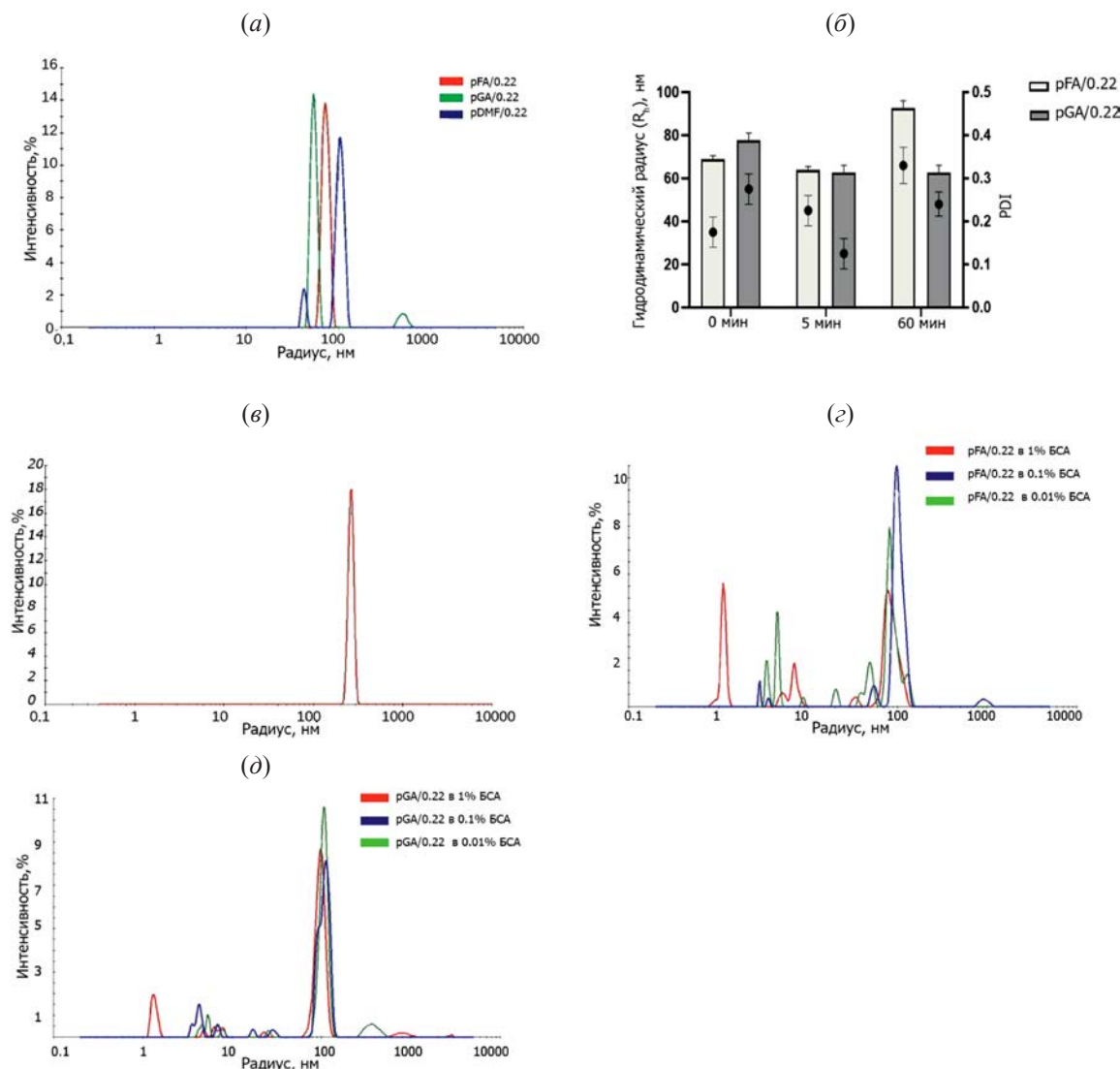


Рис. 5. Результаты анализа полученных наночастиц методом динамического светорассеяния (DLS). (а) – График распределения наночастиц по размерам, где pGA/0.22 – полигентизиновые НЧ, pFA/0.22 – полиферуловые НЧ, pDMF/0.22 – полидиметоксифенольные НЧ, полученные в результате фильтрования диализованных полимеров через мембрану с размером пор 0.22 мкм; (б) – стабильность НЧ, определенная по изменению гидродинамического радиуса (гистограмма) и индекса полидисперсности (PDI, точки) в буфере PBS (pH 7.2); (в) – распределение размеров полиферуловых частиц pFA/НЧ, полученных после низкоскоростного центрифугирования. Наличие только одного пика указывает на гомогенность суспензии; (г) – распределение размеров полиферуловых частиц pFA/0.22 после инкубации в растворе бычьего сывороточного альбумина (БСА) различной концентрации. Мажорные пики (~100 нм) показывают интактные НЧ. Наличие минорных пиков (<100 нм) указывает на частичное нарушение структуры НЧ, пики в области 4–10 нм характерны для светорассеяния молекул БСА в растворе, пики >100 нм определяют агрегацию НЧ; (д) – распределение размеров полигентизиновых частиц pGA/0.22 после инкубации в растворах БСА различной концентрации.

Таблица 1. Физико-химические характеристики полученных наночастиц

НЧ	ζ-потенциал, мВ	Z-average, нм	PDI
pFA/0.22	-31.9 ± 0.1	124.6 ± 14.5	0.101 ± 0.024
pGA/0.22	-28.8 ± 0.8	118.9 ± 4.4	0.199 ± 0.038
pDMF/0.22	-24.9 ± 0.2	259.2 ± 115.4	0.188 ± 0.074

Отрицательные высокие значения ζ-потенциала указывают на анионную природу НЧ и их электростатическую стабильность; Z-average – средний гидродинамический диаметр НЧ; PDI – индекс полидисперсности, значения до 0.4 указывают на монодисперсность суспензии НЧ.

ченные в результате низкоскоростного центрифугирования, показали высокий индекс полидисперсности ($PDI = 0.8 \pm 0.1$), распределение НЧ по размеру составило 100–1000 нм, что указывает на гетерогенный состав суспензии и соответствует данным, полученным с помощью электронной микроскопии (рис. 3з).

Таким образом, посредством диализа формируются два типа частиц, которые можно разделить фильтрованием через фильтр 0.22 мкм (pGA/0.22 и pFA/0.22) или низкоскоростным центрифугированием (pGA/НЦ и pFA/НЦ). Данные частицы отличаются размерами и значениями ζ -потенциала. В отличие от полиферуловых НЧ, наличие полидисперсности и возможная агрегация полимеров гентиизиновых кислот в пробах pGA/НЦ, полученных после низкоскоростного центрифугирования, исключают использование этих НЧ для доставки лекарств в клетки. В совокупности полученные данные позволяют предположить, что структура полимеров определяет их способность образовывать стабильные НЧ.

Наночастицы, сформированные полимерами феруловой и гентиизиновой кислот, нетоксичны для культивируемых клеток человека. Потенциальную цитотоксичность НЧ для клеток человека оценивали с использованием клеточных линий рака молочной железы MDA-MB-231 и MCF-7, а также нормальных фибробластов крайней плоти человека Vj-5ta. Для этого клетки (7.5×10^3 на лунку) инкубировали в 96-луночных планшетах в присутствии НЧ pFA/0.22 и pGA/0.22 (0–100 мг/мл в пересчете на количество полимера), количество жизнеспособных клеток определяли с помощью МТТ-теста в течение 24, 48 и 72 ч обработки. Показано, что даже при максимальной концентрации НЧ 100 мг/мл, что составляет 100 НЧ на клетку, количество жизнеспособных клеток для всех трех линий было сопоставимо с показателями контроля. При инкубировании в течение 72 ч количество жизнеспособных клеток составило 100%. Полученные данные свидетельствуют о том, что полимеры феруловой и гентиизиновой кислот биосовместимы и нетоксичны для клеток человека.

Загрузка НЧ низкомолекулярными соединениями. Для анализа возможности переноса низкомолекулярных органических соединений полифе-

руловые НЧ pFA/0.22 загружали флуорохромом Vybrant. Эффективность инкапсуляции (отношение количества соединения в НЧ к его исходному показателю) составила $4.8 \pm 0.8\%$ от общего количества флуорохрома в растворе.

Далее для определения способности НЧ доставлять фармакологические соединения в клетки человека полиферуловые НЧ pFA/0.22 и pFA/НЦ, а также полигентиизиновые НЧ pGA/0.22 загружали противоопухолевым препаратом доксорубицином (Dox). Эффективность инкапсуляции Dox для полиферуловых НЧ pFA/0.22 составила $5.45 \pm 0.73\%$ (значения, сходные с загрузкой флуорохромом Vybrant). Для полиферуловых НЧ pFA/НЦ инкапсуляция Dox составила $15.30 \pm 0.20\%$. Эффективность загрузки полигентиизиновых НЧ pGA/0.22 составила $21.7 \pm 0.32\%$. Следует отметить, что такая эффективность (8–15%) стандартна для НЧ, образованных из лигниновых полимеров [8]. Более высокое содержание Dox в полиферуловых НЧ pFA/НЦ можно объяснить их большим объемом относительно НЧ pFA/0.22. Следовательно, можно предположить, что при успешном поглощении этих НЧ опухолевыми клетками может быть достигнута более высокая концентрация лекарственного соединения в клетках-мишенях.

Для эффективного переноса фармакологических препаратов подразумевается, что НЧ будут находиться в плазме крови, при этом они должны удерживать загруженное лекарство в течение времени, необходимого для достижения целевых тканей. Поскольку противоопухолевый препарат Dox обладает флуоресценцией (возбуждение 488 нм, эмиссия 560–615 нм), для анализа эффлюкса загруженного в НЧ Dox использовали метод микродиализа [17] с последующей детекцией флуоресценции Dox в растворе, содержащем 5% альбумина сыворотки быка (БСА) (рис. 6а). Показано, что через 24 ч гентиизиновые НЧ pGA/0.22 удерживают ~90% соединения (выход в раствор – 10.3%). Для полиферуловых частиц pFA/НЦ и pFA/0.22 эти значения составили ~78% ($22.2 \pm 2.2\%$ в растворе) и 61% ($39.0 \pm 0.2\%$ свободного соединения в растворе) соответственно. Таким образом, НЧ, сформированные полиферуловыми полимерами и имеющие разную морфологию (рис. 3а, 3б), отличаются по способности удерживать

противоопухолевый препарат в белковых растворах. Следует отметить, что рFA/НЧ, которые более стабильны в присутствии 5% БСА, выводят вещество в раствор постепенно, моделируя пролонгированное высвобождение лекарственного средства.

Показано, что в микроокружении опухолевых клеток наблюдается повышенная кислотность среды (рН 6.5–6.8) [18]. Мы проанализировали эффективность выхода доксорубина из НЧ в растворах с разной кислотностью. Показано, что НЧ более эффективно высвобождают доксорубин при значениях рН 5.5 и 6.8, чем в условиях нейтрального рН 7.2–7.4. Однако в течение первых трех часов Dox эффективнее выходит из полиферуловых НЧ рFA/НЧ по сравнению с полиферуловыми и полигентизиновыми НЧ рFA/0.22, рGA/0.22, и этот эффект усиливается с увеличением времени инкубации (рис. 6б–6з). Эти результаты эффлюкса доксорубина предполагают общий механизм взаимодействия загруженного низкомолекулярного соединения с полиферуловыми и гентизиновыми полимерами, формирующими НЧ.

В совокупности полученные данные указывают на возможность использования лигнин-подобных НЧ для адресной доставки, когда выход из НЧ лекарственного соединения будет наиболее эффективно осуществляться в микроокружение опухолевых клеток по сравнению с нормальными тканями.

Поглощение лигнин-подобных НЧ клетками человека. Загруженные прижизненным флуорохромом Vybrant НЧ рFA/0.22 использовали для изучения эффективности проникновения НЧ в опухолевые клетки рака молочной железы человека MDA-MB-231 и их визуализации. После 6-часовой инкубации клеток рака молочной железы MB-MDA-231 с полиферуловыми НЧ, загруженными флуорохромом, наблюдали флуоресценцию в виде дискретных точек (рис. 7в), в то время как в клетках, обработанных раствором флуорохрома, флуоресцентный сигнал был диффузно распределен в цитоплазме (рис. 7б). Следует отметить, что флуоресцентные НЧ концентрировались в определенных компартментах клетки, а именно в области вблизи ядра. Как было показано

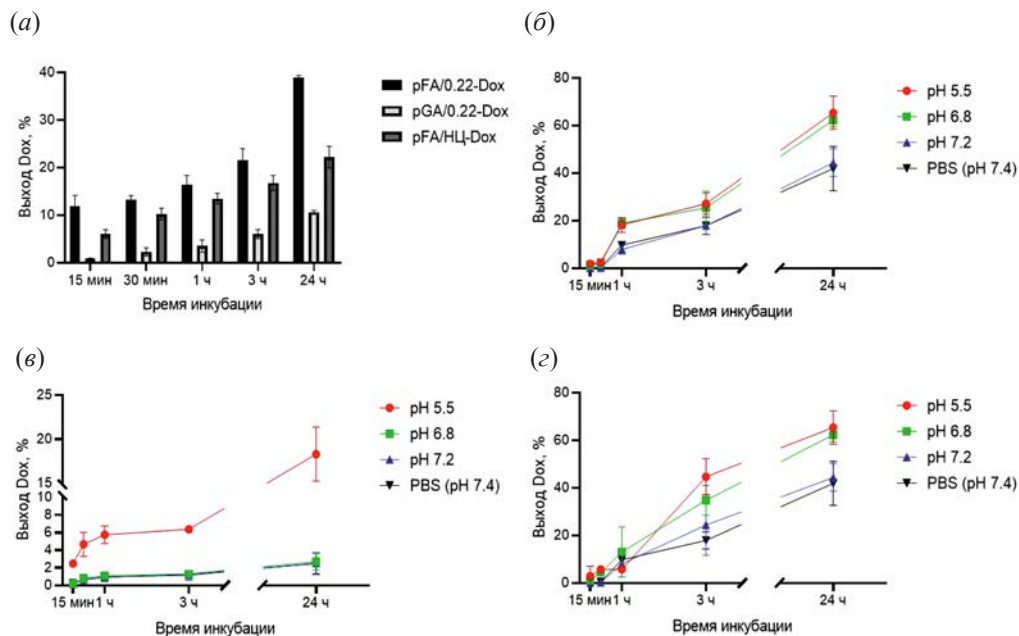


Рис. 6. Выход доксорубина (Dox) из наночастиц в различных условиях среды. (а) – Выход Dox из НЧ в фосфатном буфере, содержащем 5% БСА, в течение 24 ч; (б–д) – выход Dox (%) из НЧ через 3 и 24 ч инкубации в условиях разной кислотности: для полиферуловых НЧ рFA/0.22 – 27% через 3 ч и 65% через 24 ч при рН 5.5–6.8 против 9 и 41% при рН 7.2–7.4 (б); для полиферуловых рFA/НЧ – 6% через 3 ч и 18% через 24 ч при рН 5.5–6.8 против 1 и 2% при рН 7.2–7.4 (в); – для полигентизиновых НЧ рGA/0.22 – 44% через 3 ч и 65% через 24 ч при рН 5.5–6.8 против 17 и 42% при рН 7.2–7.4 (г).

ранее для карбоксилированных полистироновых частиц, а также для квантовых точек, конъюгированных с пептидом, эти наночастицы накапливаются в эндосомах, которые мигрируют вдоль микротрубочек и концентрируются в центросомах вблизи ядер [19, 20]. Мы можем предположить, что подобный механизм пенетрации и распределения внутри клетки реализуется и для лигнин-подобных НЧ.

Поскольку противоопухолевый препарат Dox обладает флуоресценцией, анализ эффективности проникновения соединения в клетки рака молочной железы MDA-MB-231 и MCF-7 в виде загруженного в наночастицы и в свободной форме, определяли подсчетом флуоресцирующих клеток посредством проточной цитометрии. Показано, что полигентициновые НЧ pGA/0.22 по сравнению с полиферуловыми НЧ обладают низкой эффективностью пенетрации в клетки рака молочной железы MDA-MB-231 (7% против 90% в течение первого часа), и увеличение времени инкубации до 24 ч не приводит к увеличению количества флуоресцирующих клеток (рис. 7*з*). Поскольку ранее нами было показано, что полигентициновые НЧ pGA/0.22 стабильны и обладают хорошей способностью удерживать загруженный Dox в белковых растворах (рис. 6*а*), малые

значения флуоресценции, скорее всего, относятся к низкой способности этих НЧ проникать внутрь клеток, нежели с их разрушением в ростовой среде. Можно предположить, что низкое поглощение полигентициновых НЧ опухолевыми клетками связано с их неспособностью эффективно взаимодействовать с клеточными мембранами, однако этот факт требует дальнейшего изучения.

Для НЧ pFA/НЦ показано, что уже через 5 мин инкубации можно наблюдать флуоресцирующие клетки, и их количество выше, чем в популяции клеток, обработанных неинкапсулированным свободным Dox (рис. 7*д*, 7*е*). Следует отметить, что это соотношение сохраняется в течение первых часов, однако количество клеток MDA-MB-231, которые в равной степени поглощают свободные Dox и НЧ, выравнивается после 1 ч инкубации (рис. 7*д*), в то время как в клетках MCF-7 эта разница сохраняется в течение 24 ч (рис. 7*е*). Кроме того, клетки MDA-MB-231 более активно поглощают полиферуловые НЧ, чем клетки MCF-7, что наиболее очевидно в первые 15 мин инкубации (рис. 7*д*, 7*е*). Известно, что трижды отрицательные базальные клетки MDA-MB-231 представляют собой наиболее агрессивную, метастазирующую форму рака молочной же-

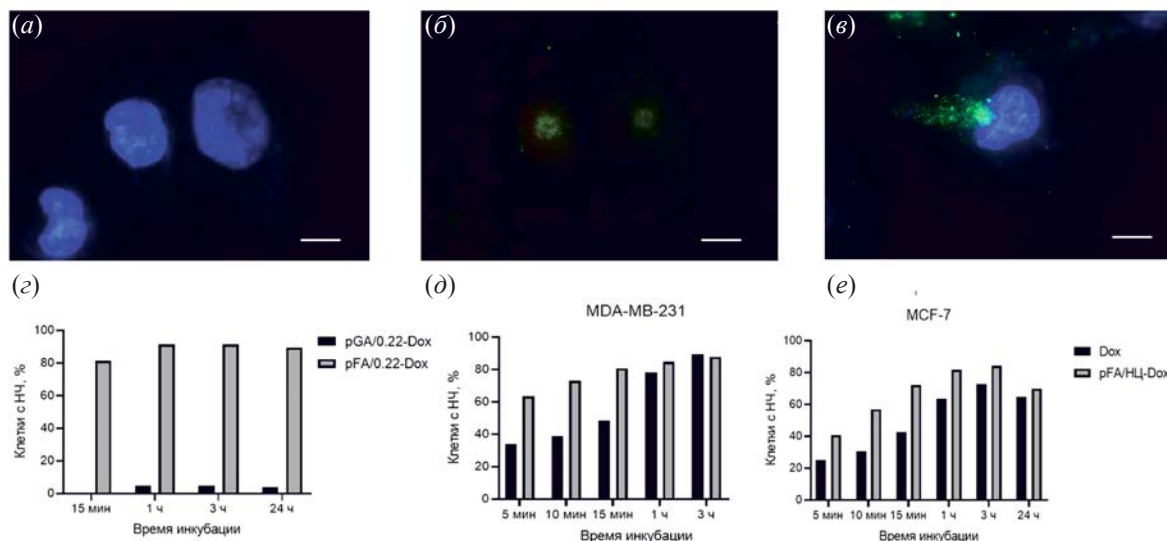


Рис. 7. Поглощение наночастиц культивируемыми клетками человека. (а–в) – Микрофотографии флуоресценции флуорохрома Vybrant: (а) – необработанные клетки MDA-MB-231; (б) – клетки MDA-MB-231 после инкубации с флуорохромом Vybrant (зеленый); (в) – клетки MDA-MB-231, инкубированные с НЧ pFA/0.22, загруженными Vybrant. В образцах (а) и (в) ядра окрашены DAPI-405 (синий), масштабные отрезки – 10 мкм; (г–е) – гистограммы результатов проточной цитометрии: (г) – зависимость поглощения клетками MDA-MB-231 загруженных Dox частиц pFA/0.22 и pGA/0.22 (100 НЧ на 1 клетку) от времени инкубации; (д) – график интернализации pFA/НЦ для клеток MDA-MB-231; (е) – график интернализации pFA/НЦ для клеток MCF-7.

лезы, чем люминальные клетки MCF-7 [21]. Также показано, что по сравнению с эпителиальными клетками MCF-7, клетки MDA-MB-231 прошли эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), т.е. имеют мезенхимальный фенотип и, вследствие этого, обладают повышенной способностью к миграции, инвазии и метастазированию [22]. Наши данные показывают, что уже через 5 мин инкубации клетки MDA-MB-231 лучше поглощают и накапливают полифенуловые НЧ рФА/НЦ (64% клеток в популяции клеточной линии), чем клетки MCF-7 (41%). Является ли эта разница в эффективности поглощения НЧ общей характеристикой мезенхимальных клеток по сравнению с эпителиальными клетками или представляет собой частный случай для этих клеточных линий? Это важный вопрос, требующий дополнительных исследований. Однако полученный результат предполагает, что лигнин-подобные НЧ могут быть эффективно использованы для лечения наиболее агрессивных, метастазирующих форм рака.

Эффективность ингибирования роста опухолевых клеток доксорубицином, инкапсулированным в НЧ. Для определения цитотоксичности свободного Dox и Dox, переносимого полифенуловыми НЧ, для опухолевых клеток рака молочной железы MDA-MB-231 и MCF-7 использовали МТТ-тест. Поскольку в организме концентрация НЧ в опухолевых тканях нестабильна и постоянно снижается вследствие вымывания НЧ кровотоком, утилизации клетками опухоли и стромы, а также в результате их

поглощения инфильтрующими ткани макрофагами, в нашем эксперименте культивируемые клетки обрабатывали полифенуловыми НЧ рФА/НЦ, загруженными Dox или свободным соединением, в течение 15 мин, затем препарат удаляли с последующей отмывкой клеток и инкубацией в полной ростовой среде в течение 48 ч. Показано, что клетки, инкубированные с загруженными Dox НЧ, имеют более низкую выживаемость по сравнению с клетками, обработанными свободной формой соединения (рис. 8а). Можно предположить, что по сравнению с препаратом, растворенным в среде, локальная концентрация Dox в клетках повышается за счет активного поглощения загруженных НЧ (см. рис. 7д, 7е), что приводит к их гибели. Для подтверждения результатов МТТ-теста для клеточной линии MDA-MB-231 провели оценку клеточной гибели с использованием аннексина V. Показано, что после инкубации с загруженными Dox полифенуловыми НЧ/НЦ вступивших в апоптоз клеток было на 8% больше по сравнению с клетками, инкубированными со свободным Dox (37.2 и 29.3% соответственно).

Сфероиды (3D-культуры) – модельные объекты для изучения поведения, проникновения и накопления НЧ в солидных опухолях. Используя сфероиды, сформированные из плотно соединенных клеток MCF-7 [23], мы показали, что по сравнению со свободным Dox загруженные НЧ рФА/НЦ более эффективно индуцируют апоптоз (рис. 8б). Так, после инкубации сфероидов с загруженными НЧ в условиях постоянного

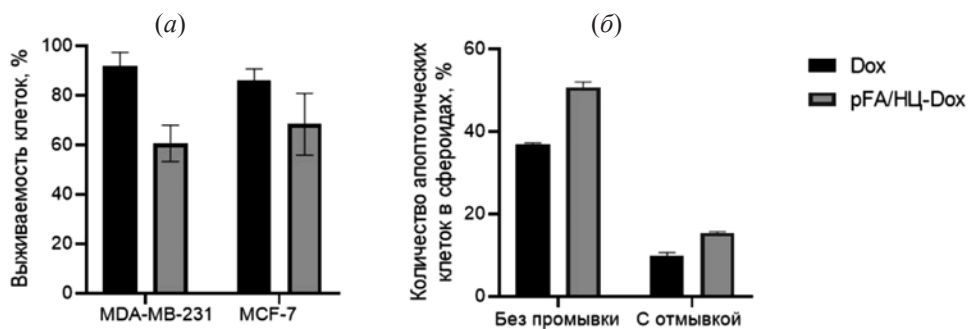


Рис. 8. Анализ цитотоксичности свободного Dox и доксорубицина в составе наночастиц. (а) – МТТ-тест клеточных линий MDA-MB-231 и MCF-7 после 15 мин обработки с последующей отмывкой образцов от соединения. Время инкубации после обработки – 48 ч; (б) – результаты проточной цитометрии показывают количество аннексин V-FITC-положительных, апоптотических клеток MCF-7 в составе сфероидов через 48 ч после обработки либо свободным Dox, либо соединением в составе полифенуловых НЧ рФА/НЦ в условиях постоянного присутствия Dox (левая панель) или его удаления из среды через 15 мин инкубации (правая панель).

присутствия препарата в среде наблюдали 51.8% апоптотических клеток по сравнению с 35.6% для свободного Dox. Следует отметить, что в условиях удаления соединения из среды после 15 мин инкубации загруженные НЧ также вызывали более высокий уровень апоптоза опухолевых клеток – 15.3% против 9.3% для свободного Dox (рис. 8б). Следовательно, можно предположить, что НЧ могут повышать локальную концентрацию лекарства в опухолевых клетках и усиливать цитотоксический эффект противоопухолевого препарата.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение и очистка лакказы из гриба *Cerrena unicolor*. Гриб *Cerrena unicolor* (ВКМ F-3196, Всероссийская коллекция микроорганизмов, <https://www.vkm.ru>) хранили при 4°C в пробирках, содержащих скошенный сусло-агар, в условиях ежемесячного пересева культуры. Для роста инокулята в жидкой среде клетки стерильно переносили с агара в культуральную среду (пептон – 2.0 г/л, MgSO₄·7H₂O – 0.2 г/л, дрожжевой экстракт – 2.0 г/л, глюкоза – 2%, NaH₂PO₄ – 20 мМ; рН 5.0). Индукцию синтеза лакказы и выделение фермента проводили согласно методике, описанной ранее [9]. Активность фермента во фракциях, полученных в процессах гель-фильтрации и ионообменной хроматографии, определяли спектрофотометрически посредством измерения скорости окисления субстрата лакказы ABTS (Sigma-Aldrich, США). Ионообменную хроматографию и гель-фильтрацию проводили с помощью системы АСТА FPLC (GE Healthcare, США). Концентрацию белка определяли методом Бредфорд, гомогенность препарата лакказы оценивали с помощью 12%-ного денатурирующего гель-электрофореза. Белки в гелях окрашивали Кумасси R250. Молекулярную массу денатурированного белка (две изоформы: 75 и 67 кДа) определяли с помощью набора маркеров молекулярных весов 14.4–116.0 кДа (Thermo Fisher Scientific, США).

Синтез лигнин-подобных полимеров с использованием лакказы. Исследовали 12 фенольных мономеров (Sigma-Aldrich, США) на их способность формировать полимеры в окислительных реак-

циях. Для подбора условий успешного синтеза водонерастворимых полимеров использовали различные соотношения фермент–субстрат в реакционной смеси: 1) 0.06 Е/мл лакказы и мономеры в концентрации 15 мМ; 2) 0.06 Е/мл лакказы и мономеры в концентрации 40 мМ; 3) 0.36 Е/мл лакказы и мономеры в концентрации 15 мМ. Полимеры синтезировали в реакционной смеси объемом 50 мл, содержащей различные концентрации каждого мономера (15 или 40 мМ). Навески мономеров растворяли в 5 мл 96%-ного этанола, за исключением натриевой соли гентизиновой кислоты, которую растворяли в 5 мл дистиллированной воды. Далее доводили объем до 50 мл с помощью 20 мМ ацетата натрия (рН 5.0), добавляли разные количества фермента (0.06 или 0.36 Е/мл лакказы) и инкубировали 24 ч при 30°C и постоянном перемешивании для доступа кислорода в реакционные смеси. По окончании ферментативной реакции смеси центрифугировали 30 мин при 4000 об/мин, осадок водонерастворимых полимеров промывали водой и дополнительно центрифугировали. Затем осадок переносили в чашку Петри и высушивали на воздухе в течение 24 ч. Далее полимеры растворяли в DMSO (Sigma-Aldrich, США), измеряли спектры поглощения на спектрофотометре UV-1650РС (Shimadzu, Япония) при комнатной температуре для подтверждения полимеризации. Объем кюветы – 1 мл, длина оптического пути – 1 см. Синтез полимеров проводили в трех повторях.

Анализ структуры полимеров методом ИК-Фурье-спектроскопии. Для определения ИК-спектров (Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR) к препаратам феруловых и гентизиновых полимеров в количестве 50 мг добавляли КВг (в соотношении 1 : 1), полученную смесь до однородности растирали в агатовой ступке. Первоначально определяли спектры КВг при комнатной температуре. Далее измеряли ИК-спектры препарата и вычитали из них спектры КВг. Полученные значения спектров корректировали на спектральный вклад паров воды и CO₂ с последующим анализом в диапазоне волновых чисел 4000–650 см⁻¹.

Спектры полимеров определяли с помощью ИК-Фурье-спектрометра Nicolet 6700, оснащенного

приставкой Smart Orbit с бриллиантовым ATR-кристаллом (Thermo Scientific, США): измерения проводили в режиме ATR на бриллиантовом ATR-кристалле с оптическим путем 4 мкм, используя МСТ-детектор (охлаждение жидким азотом), сканирование в диапазоне волновых чисел 4000–650 см⁻¹ с разрешением 1 см⁻¹, усреднением по 256 спектрам. В качестве контроля использовали соответствующие мономеры.

Анализ структуры полимеров методом ЯМР-спектроскопии. Полимеры, полученные посредством ферментативного синтеза, высушивали в эксикаторе и в концентрации 10 мг/мл растворяли в дейтерированном DMSO. Спектры ¹H- и ¹³C-ЯМР регистрировали при комнатной (25°C) температуре на спектрометре Avance 400 (Bruker, Германия) с рабочей частотой 400 и 100 МГц соответственно. Растворители и внутренние стандарты (остаточные протоны дейтерорастворителей) – DMSO-*d*₆; химические сдвиги указаны относительно Me₄Si (для ¹H и ¹³C).

Формирование наночастиц посредством диализа. Формирование НЧ производили методом диализа против воды Milli-Q с использованием диализных мембран (Dialysis Tubing, 12–14 кДа, Sigma-Aldrich, США). При диализе происходит замещение органического растворителя водой и образование водонерастворимых НЧ. Полученные полимеры (1 мг/мл) растворяли в DMSO. Полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молекулярной массой 20 000 MW (Loba Chemie Fischamend, Австрия) – реагент, применяемый для стабилизации НЧ в физиологических растворах [24], растворяли в DMSO и добавляли в конечной концентрации 0.5 мг/мл к раствору полимеров (массовое соотношение полимер/ПЭГ в растворе 2 : 1 соответственно). Полученный раствор помещали в диализные мешки и диализовали против 500 мл воды Milli-Q при постоянном перемешивании и смене диализного раствора 3 раза через 15 мин, 3 ч и 20 ч.

По окончании диализа суспензию НЧ центрифугировали 10 мин при 1200 об/мин для удаления агрегатов, супернатант переносили в пробирку эппендорф с последующим центрифугированием при 2500 об/мин в течение 10 мин. Затем супернатант,

содержащий НЧ, фильтровали через фильтры (TRP, Швейцария) с размером пор 0.22 мкм (препарат НЧ pFA/0.22 и pGA/0.22), а осадок ресуспендировали в воде Milli-Q с последующим центрифугированием при 2500 об/мин в течение 10 мин. После двух раундов отмывки осадок ресуспендировали в 1 мл стерильной воды Milli-Q (препараты pFA/НЦ и pGA/НЦ). Далее все полученные препараты использовали для определения размера и морфологии НЧ методами электронной микроскопии и динамического светорассеяния (DLS).

Определение концентрации наночастиц методом проточной цитофлуориметрии. Суспензии изучаемых НЧ анализировали на проточном цитофлуориметре Novocyte (ACEA Biosciences, Inc., США) при следующих условиях: Threshold SSH-N 1000, объем пробы – 10 мкл, скорость потока – slow. При необходимости пробы разбавляли в 10–100 раз.

Оценка структуры наночастиц методом просвечивающей электронной микроскопии. Для оценки морфологии НЧ каплю суспензии НЧ нанесли на поверхность медной сетки, покрытой формваровой пленкой. Нанесенному образцу давали адсорбироваться в течение 2 мин, а затем удаляли избыток образца с помощью фильтровальной бумаги. Препараты просматривали на просвечивающем электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и регистрировали случайные изображения репрезентативных полей наблюдения с помощью 11-мегапиксельной ПЭМ-камеры MORADA G2 (EMSIS GmbH, Германия). Для каждого независимого эксперимента синтеза полимеров и формирования НЧ получили шесть микрофотографий.

Анализ НЧ методом DLS. Анализ НЧ методом динамического светорассеяния (dynamic light scattering, DLS) проводили при 20°C и длине волны 633 нм с использованием прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания).

Для оценки стабильности в физиологических условиях суспензию НЧ помещали в физиологический раствор PBS (фосфатно-солевой буфер, pH 7.2) и растворы бычьего сывороточного альбумина (БСА). В случае PBS к пробам НЧ в воде (1 мг/мл) добавляли

10× раствор PBS (pH 7.2) до однократного разведения, перемешивали и инкубировали 60 мин при 20°C. Образцы отбирали через 0, 5, 60 мин и анализировали посредством DLS. В случае изучения стабильности НЧ в белковых растворах БСА к пробам НЧ (1 мг/мл) добавляли 10%-ный раствор БСА до конечных концентраций БСА 1, 0.1, 0.01%, затем инкубировали 60 мин при 20°C. Образцы отбирали через 0, 5, 60 мин и анализировали посредством DLS. Анализ проводили в трех повторах.

Получение загруженных наночастиц. Полимеры в концентрации 1 мг/мл в DMSO (Sigma-Aldrich, США) смешивали с 0.2 мг/мл Dox (Sigma-Aldrich, Германия), растворенного в DMSO, в объемном соотношении полимер–краситель 1 : 0.2 и диализовали 24 ч против 500 мл воды Milli-Q (Dialysis Tubing, 12–14 кДа; Sigma-Aldrich, США) в вытяжном шкафу при постоянном перемешивании и смене буфера 3 раза через 15 мин, 3 ч и 20 ч. После последней смены диализного раствора интенсивность перемешивания увеличивали в 2 раза. Затем пробы сформированных в результате диализа НЧ собирали из диализного мешка в пробирки и фракционировали посредством центрифугирования (НЧ/НЦ) или фильтрации (НЧ/0.22), как описано выше. Для загрузки НЧ прижизненным красителем Vybrant первоначально готовили 10 мМ раствор Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Затем концентрацию флуорохрома разбавляли до 100 мкМ с помощью DMSO. В дальнейшем этот раствор использовали для загрузки НЧ методом, используемым для Dox.

Анализ эффективности загрузки наночастиц низкомолекулярными соединениями и эффлюкса вещества из наночастиц. Эффективность инкапсулирования флуоресцентных низкомолекулярных соединений (Dox или Vybrant) в НЧ оценивали с использованием флуоресцентного ридера FilterMax F5 (Molecular Devices, США). К 50 мкл водной суспензии загруженных НЧ добавляли 50 мкл DMSO и анализировали на 96-луночном планшете при следующих длинах волн: поглощение при 485 нм, испускание при 595 нм. Эффективность инкапсулирования рассчитывали как соотношение исход-

ной флуоресценции соединения с известной концентрацией, растворенного в DMSO, и этого же соединения, загруженного в НЧ.

Для оценки эффлюкса доксорубина из загруженных НЧ в белковых растворах использовали метод микродиализа. Для этого 100 мкл суспензии НЧ помещали в верхние отсеки центрифужных пробирок-концентраторов (IVSS VIVASPIN, 15 мл, 10 кДа; Sigma-Aldrich, США), далее добавляли 900 мкл растворов БСА в PBS (pH 7.2; Sigma-Aldrich, США) до конечной концентрации 5% и инкубировали при вращении на платформе Multi RS-60 (Biosan, Латвия). Отбор проб (по 100 мкл) проводили из нижней части пробирки через 15 и 30 мин, 1, 3 и 24 ч инкубации. В качестве отрицательного контроля использовали раствор PBS (pH 7.2), в качестве положительного контроля – раствор Dox в PBS (pH 7.2, 0.2 мг/мл). Процент выхода флуорохрома из НЧ оценивали по интенсивности флуоресценции, концентрацию Dox в отбираемых пробах рассчитывали относительно значений флуоресценции при различных разведениях соединения. Анализ проводили в трех повторах. Интенсивность флуоресценции измеряли при помощи ридера FilterMax F5 (Molecular Devices, США) при следующих длинах волн: поглощение при 485 нм, испускание при 595 нм.

Для оценки эффлюкса Dox из НЧ в условиях различных pH применяли аналогичную процедуру, описанную выше, где суспензию НЧ инкубировали в 20 мМ растворах Tris-HCl с различными значениями pH (5.5, 6.8, 7.2). В качестве контроля использовали раствор PBS (pH 7.2). Процент выхода флуорохрома из НЧ оценивали по флуоресценции Dox в пробах, отбираемых из нижней части пробирки.

Культивирование опухолевых клеток человека. В работе использовали клеточные линии: MDA-MB-231 и MCF-7 (рак молочной железы), а также иммортализованные нормальные фибробласты крайней плоти человека Vj-5ta. Клеточные линии были получены из НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (Москва, Россия). Клетки MDA-MB-231, MCF-7 и Vj-5ta культивировали во флаконах T-25 (Thermo Fisher Scientific, США) на ростовой среде DMEM с добавлением 5% FBS (ПанЭко, Россия) и пенициллин-

стрептомицина (50 МЕ/мл) (ПанЭко, Россия). Клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ во влажной атмосфере. Все манипуляции проводили в ламинарных боксах второго класса защиты в условиях повышенной стерильности. Для анализа роста клеток и достижения конfluence клеточного монослоя использовали инвертированный микроскоп при увеличении 20× (OPTON, Германия).

Оценка проникновения наночастиц в клетки методом флуоресцентной микроскопии. Для загрузки Dox и Vybrant в НЧ использовали метод диализа при формировании НЧ. Стерилизацию НЧ pFA/0.22 и pGA/0.22 обеспечивали фильтрованием (Syringe-Filter 0.22 мкм; TPP, Швейцария). НЧ pFA/НЦ, фракционированные из коллоидного раствора с помощью низкоскоростного центрифугирования, стерилизовали посредством УФ-облучения в течение 15 мин. Далее, после определения количества НЧ, стерильные препараты добавляли к культивируемым клеткам.

Клетки MDA-MB-231 (150 тыс. клеток) высевали на покровные стекла, помещенные в чашки Петри диаметром 3 см (Tissue Culture Dish, Costar, США), содержащие 2 мл полной ростовой среды, клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37°C. На следующий день ростовую среду удаляли, клетки 1 раз промывали PBS (pH 7.2), затем добавляли стерильный раствор НЧ, загруженных флуорохромом (100 мкг/мл в 1.5 мл DMEM, 5% FBS), и инкубировали 6 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе. В качестве положительного контроля флуоресценции клетки также инкубировали в присутствии 5 мкМ флуорохрома Vybrant согласно инструкции компании-производителя. По окончании времени инкубации клетки дважды промывали PBS (pH 7.2) для удаления НЧ и фиксировали 15 мин раствором 4%-ного параформальдегида в PBS при комнатной температуре. Затем фиксированные клетки промывали 2 раза PBS и окрашивали раствором DAPI-405 (2.5 мкг/мл, 10 мин) для визуализации ядер. По окончании процедуры клетки промывали PBS, покровное стекло переносили на предметное стекло, содержащее SlowFade Diamond Antifade Mountant (Invitrogen, США) таким образом, чтобы клетки были между стеклами. Флуоресценцию Vybrant и DAPI-405 анализировали с использованием набора фильтров с длинами волн G 365 нм возбужде-

ния и BP 445/50 нм испускания для DAPI-405, BP 470/27 нм возбуждения и DBP 512/30 + 630/98 нм испускания для Vybrant на флуоресцентном микроскопе AXIO Imager.A1 (Zeiss, Германия) с камерой AxioCamMRC, программное обеспечение Zeiss AxioCam.

Оценка накопления частиц в клетках методом проточной цитофлуориметрии. Клетки MDA-MB-231 и MCF-7 высевали на чашки Петри диаметром 3 см (Tissue Culture Dish, Costar, США), содержащие 2 мл полной ростовой среды (DMEM или RPMI), и инкубировали 24 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе. На следующий день ростовую среду удаляли, клетки 1 раз промывали PBS (pH 7.2), затем добавляли стерильную суспензию лигниновых НЧ в PBS, загруженных Dox (15 мкМ), в объеме 1 мл и инкубировали в течение 5, 10 и 15 мин, 1, 3 и 24 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе. В качестве отрицательного контроля использовали клетки без добавления НЧ. В качестве положительного контроля флуоресценции клетки также инкубировали в присутствии 15 мкМ раствора Dox. По окончании времени инкубации клетки дважды промывали 1 мл PBS (pH 7.2) и открепляли от подложки с помощью 0.25% трипсина (инкубация 5 мин). Далее клетки ресуспендировали в 1 мл PBS, содержащего 5% FBS, переносили в эппендорфы, центрифугировали 5 мин при 1200 об/мин и фиксировали 10 мин раствором 4%-ного параформальдегида в PBS при комнатной температуре. Затем фиксированные клетки 1 раз промывали 1 мл PBS (pH 7.2), центрифугировали (1200 об/мин, 5 мин) и ресуспендировали в 0.5 мл PBS. Суспензии изучаемых клеток анализировали на проточном цитофлуориметре Novocyte (ACEA Biosciences, Inc., США) при следующих условиях: Threshold FSC-H 300 000, скорость потока – slow, подсчет клеток проводили до лимита в 10 тыс. клеток. Для загруженных Dox частиц также использовали флуоресцентный детектор PE (B572/gain 378).

Анализ цитотоксичности (МТТ-тест). В 96-луночный планшет вносили по 100 мкл суспензии клеток (7500 клеток на лунку), после чего планшет помещали в CO₂-инкубатор (5% CO₂, 37°C). Через 24 ч среду в лунках заменяли ростовой средой, содержащей различные концентрации Dox или суспензию НЧ с разной степенью разбавления (0–0.1 мг/мл

в пересчете на количество полимеров, 0–100 мкМ в пересчете на количество загруженного в НЧ Dox). Концентрация Dox в пробах с наночастицами была выровнена относительно свободного Dox посредством разбавления суспензии НЧ с известной инкапсуляцией Dox.

Цитотоксичность частиц определяли методом МТТ-теста через 48 ч. МТТ-тест основан на способности митохондриальных и цитоплазматических дегидрогеназ клеток восстанавливать МТТ с образованием нерастворимых в воде кристаллов формазана, количество которого можно измерять спектрофотометрически. Из лунок планшета аккуратно удаляли ростовую среду, добавляли по 100 мкл среды DMEM без сыворотки, содержащей МТТ (0.5 мг/мл), и оставляли в CO₂-инкубаторе на 2 ч. Затем удаляли раствор МТТ, добавляли 100 мкл DMSO и оставляли на 10 мин на шейкере Multi RS-60 (Biosan, Латвия) для полного растворения формазана. Поглощение измеряли на приборе FilterMax F5 (Molecular Devices, США) при длине волны 595 нм.

Получение 3D-сфероидов. 3D-сфероиды формировали по оригинальной методике, разработанной в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН [23].

Определение апоптоза с использованием аннексина V. Клетки MDA-MB-231 и MCF-7 высевали в количестве 150 тыс. клеток на чашки Петри диаметром 3 см (Tissue Culture Dish, Costar, США), содержащие 2 мл полной ростовой среды, и инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 24 ч (48 ч для сфероидов). Сфероиды формировали по методике, приведенной выше. На следующий день ростовую среду удаляли, клетки 1 раз промывали PBS (pH 7.2). Затем добавляли 1 мл PBS, содержащего суспензию загруженных Dox (15 мкМ) pFA/НЦ, и инкубировали в течение 24 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе. В качестве отрицательного контроля использовали клетки без добавления НЧ, а также незагруженные НЧ. В качестве положительного контроля клетки также инкубировали в присутствии 15 мкМ раствора Dox. Для сфероидов использовали аналогичные условия. По окончании инкубации клетки в монослое открепляли от подложки обработкой трипсином в течение 5 мин и ресуспендировали в 1 мл ростовой среды, переносили в эппен-

дорфы, центрифугировали 5 мин при 2000 об/мин. Сфероиды разрушали обработкой трипсином в течение 5 мин, ресуспендировали в 2 мл ростовой среды, переносили суспензию клеток в эппендорфы и центрифугировали 5 мин при 2000 об/мин. Далее клетки промывали PBS и повторно центрифугировали для удаления НЧ. После этого клетки ресуспендировали в 300 мкл буфера для связывания аннексина V (1.4 М NaCl, 25 мМ CaCl₂, 0.1 М HEPES, pH 7.4), добавляли рекомбинантный белок аннексин V, меченный флуорохромом FITC (Lumiprobe, Россия), в конечной концентрации 2 мкг/мл и инкубировали 15 мин на льду. В качестве отрицательного контроля использовали клетки без добавления аннексина V. Затем флуоресценцию клеток анализировали на проточном цитофлуориметре Novocyte (ACEA Biosciences, Inc., США) при следующих условиях: Threshold FSC-H 300000, скорость потока – slow, подсчет клеток проводили до лимита в 20 тыс. клеток. Используемые фильтры – флуоресцентный детектор PE (B572) и FITC (B530).

Статистическая обработка данных. Эксперименты проводили в трех повторах. Приведены средние значения со стандартным отклонением. Графики строили в программе GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, США).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе с использованием 12 различных фенольных мономеров впервые исследована способность лакказы гриба *Cerrena unicolor* генерировать водонерастворимые полимеры и проверена возможность полученных полимеров формировать лигнин-подобные наночастицы. Впервые был проведен анализ структуры полимеров гентиизиновой кислоты методом ЯМР. Показано, что при ферментативном синтезе гентиизиновых полимеров формируются два основных водонерастворимых соединения, которые в отличие от феруловых полимеров, имеющих линейную форму, являются разветвленными, и только один из них формирует НЧ. Анализ физико-химических свойств НЧ, сформированных полиферуловыми и полигентиизиновыми полимерами, показал их стабильность в физиологических растворах, нетоксичность для культивируемых клеток человека

(линии Vj-5ta, MDA-MB-231, MCF-7) и высокую эффективность загрузки низкомолекулярными органическими соединениями. Однако было выявлено низкое поглощение культивируемыми клетками рака молочной железы полигентициновых НЧ, загруженных Dox, что ограничивает их использование в качестве носителей противоопухолевых препаратов. Эти данные заложили основу для анализа возможных модификаций полигентициновых НЧ посредством ПЭГ или лигандами к мембранным рецепторам для повышения их способности к пенетрации в таргетные клетки.

Суммируя вышеописанные физико-химические свойства полиферуловых НЧ (pFA/0.22, pFA/НЦ), следует, что для использования в медико-биологических целях наиболее перспективны pFA/НЦ, полученные методом низкоскоростного центрифугирования. По сравнению с pFA/0.22 они обеспечивают более эффективную загрузку противоопухолевыми препаратами (доксорубицином) и пролонгированное высвобождение вещества из структуры. По сравнению со свободным Dox, добавленным в ростовую среду, загруженные Dox pFA/НЦ быстрее и в большем количестве накапливаются в опухолевых клетках и сфероиде, индуцируя клеточную гибель.

Полученные данные указывают на перспективность использования полиферуловых НЧ pFA/НЦ для переноса различных фармакологических соединений в опухолевые клетки рака молочной железы.

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. *Brigger I., Dubernet C., Couvreur P.* // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002. V. 54. P. 631–651.
[https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00044-3](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00044-3)
2. *Bozzuto G., Molinari A.* // *Int. J. Nanomed.* 2002. V. 10. P. 975–999.
3. *Sharma A., Goyal A.K., Rath G.* // *J. Drug Target.* 2017. V. 15. P. 1–16.
<https://doi.org/10.1080/1061186X.2017.1400553>
4. *Cho C.F., Shukla S., Simpson E.J., Steinmetz N.F., Luyt L.G., Lewis J.D.* // *Methods Mol. Biol.* 2014. V. 1108. P. 211–230.
https://doi.org/10.1007/978-1-62703-751-8_16
5. *Lomis N., Westfall S., Farahdel L., Malhotra M., Shum-Tim D., Prakash S.* // *Nanomaterials (Basel).* 2016. V. 6. P. 116.
<https://doi.org/10.3390/nano6060116>
6. *Jain A.K., Das M., Swarnakar N.K., Jain S.* // *Crit. Rev. The Drug Carrier Syst.* 2011. V. 28. P. 1–45.
<https://doi.org/10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v28.i1.10>
7. *Frangville C., Rutkevičius M., Richter A.P., Velev O.D., Stoyanov S.D., Paunov V.N.* // *ChemPhysChem.* 2012. V. 13. P. 4235–4243.
<https://doi.org/10.1002/cphc.201200537>
8. *Figueiredo P., Ferro C., Kemell M., Liu Z., Kiriazis A., Lintinen K., Florindo H.F., Yli-Kauhaluoma J., Hirvonen J., Kostianen M.A., Santos H.A.* // *Nanomedicine.* 2017. V. 2017. P. 0219.
<https://doi.org/10.2217/nmm-2017-0219>
9. *Lisova Z.A., Lisov A.V., Leontievsky A.A.* // *J. Basic Microbiol.* 2010. V. 50. P. 72–82.
<https://doi.org/10.1002/jobm.200900382>
10. *Fei Z., Chen F., Zhong M., Qiu J., Li W., Sadeghzadeh S.M.* // *RSC Adv.* 2019. V. 9. P. 28078–28088.
<https://doi.org/10.1039/c9ra05079e>
11. *Kishimoto T., Uraki Y., Ubukata M.* // *Org. Biomol. Chem.* 2006. V. 4. P. 1343–1347.
<https://doi.org/10.1039/B518005H>
12. *Alavi M., Hamidi M.* // *Drug Metabol. Personalized Ther.* 2019. V. 34. 0032.
<https://doi.org/10.1515/dmpt-2018-0032>
13. *O'Reilly R.K., Pearce A.K.* // *Bioconjug. Chem.* 2019. V. 30. P. 2300–2311.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00456>
14. *Nahyeon L., Yong T.K., Jechan L.* // *Polymers (Basel).* 2021. V. 13. P. 364.
<https://doi.org/10.3390/polym13030364>
15. *Mikolasch A., Schauer F.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009. V. 82. P. 605–624.
<https://doi.org/10.1007/s00253-009-1869-z>

16. Zheng Y., You X., Guan S., Huang J., Wang L., Zhang J., Wu J. // *Adv. Funct. Mater.* 2019. № 15. P. 1808646.
<https://doi.org/10.1002/adfm.201808646>
17. Leo E., Camerani R., Forni F. // *Int. J. Pharm.* 1999. V. 180. P. 23–30.
[https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(98\)00401-3](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(98)00401-3)
18. Swietach P., Vaughan-Jones R.D., Harris A.L., Huklikova A. // *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2014. V. 369. P. 20130099.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0099>
19. Ruan G., Agrawal A., Marcus A.I., Nie S. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. P. 14759–14766.
<https://doi.org/10.1021/ja074936k>
20. Efeoglu E., Keating M.E., McIntyre J., Casey A., Byrne H. // *Anal. Methods.* 2015. № 23. P. 10000–10017.
21. Dai X., Cheng H., Bai Z., Li J. // *J. Cancer.* 2017. V. 8. P. 3131–3141.
<https://doi.org/10.7150/jca.18457>
22. Xiao M., Hasim M., Lequeux A., Moer K.V., Tan T.Z., Gilles C., Hollier B.G., Thiery J.P., Berchem G., Janji B., Noman M.Z. // *Cancers (Basel).* 2021. V. 13. P. 1165.
23. Rystsov G.K., Lisov A.V., Zemskova M.Yu. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2023. V. 49. P. 65–78.
<https://doi.org/10.31857/S0132342322060197>
24. Guerrini L., Alvarez-Puebla R., Pazos-Perez N. // *Materials.* 2018. V. 11. P. 1154.
<https://doi.org/10.3390/ma11071154>

Nanoparticles Based on Polyferulic and Polygentisic Acids as New Carriers of Anticancer Drugs

I. V. Smirnov^{*,#}, A. V. Lisov^{**}, A. N. Zvonarev^{**}, N. E. Suzina^{**},
A. S. Kazakov^{***}, and M. Y. Zemskova^{**,##}

[#] Phone: +7 (977) 198-26-16; e-mail: ivan_smirnov_98@mail.ru

^{##} Phone: +7 (929) 913-27-56; e-mail: marinazemskova9@gmail.com

* Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, 121205 Russia

** G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, prosp. Nauki, 5, Pushchino, 142290 Russia

*** Institute of Biological Instrumentation, Russian Academy of Sciences, prosp. Nauki, 7, Pushchino, 142290 Russia

Lignin polymers and their derivatives are actively used in various fields of biomedicine to create biocompatible materials, as medications, and to form nanoparticles. However, natural polymeric compounds derived from plant materials or monomers are defined as a mixture of compounds having a high heterogeneity in chemical structure, which greatly complicates the determination of their biological activity. This paper describes a new method of controlled synthesis using the enzyme laccase, which can be applied to obtain polymers with a specific structure. Based on enzymatically synthesized lignin-like polymers from ferulic and gentisic phenolic monomers, nanoparticles with stable properties under physiological conditions were formed. The nanoparticles can differ in morphology from globular to fibrillar structures, depending on monomers used in the enzymatic reaction and the method of their formation. Nanoparticles obtained from lignin-like polymers of ferulic and gentisic acids can be loaded with low molecular weight hydrophobic compounds, including the anticancer drug doxorubicin. It has been shown that polyferulic nanoparticles actively penetrate in tumor cells growing both in a monolayer culture and as part of spheroids, and, compared with a free compound, doxorubicin in the composition of nanoparticles has a greater cytotoxic effect on breast cancer cells. These data indicate the possibility of effective use of these carriers as passive targeted drug delivery in the treatment of tumors.

Keywords: laccase, ferulic acid, gentisic acid, lignin-like polymers, doxorubicin



УДК 547.395+547.392.6+547.295+547.296

9-ХЛОР-5,9-ДИЕНОВЫЕ И ДРУГИЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ ИЗ МОРСКОЙ ГУБКИ *Penares* sp.¹

© 2024 г. Е. А. Санталова*,[#], С. А. Колесникова*

* Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения РАН, Россия, 690022 Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159

Поступила в редакцию 11.09.2023 г.

После доработки 24.09.2023 г.

Принята к публикации 25.09.2023 г.

Жирные кислоты (ЖК) и их этиловые эфиры из экстракта губки *Penares* sp. (Южно-Китайское море) были разделены с помощью ВЭЖХ и проанализированы методом ГЖХ-МС с использованием пирролидиновых, 4,4-диметилкоксазолиновых, диметилдисульфидных и гидрированных производных. В отдельных случаях для анализа структур ЖК применяли спектроскопию ¹H- и ¹³C-ЯМР. Была обнаружена 71 кислота с длиной цепи от C₁₂ до C₂₈, в том числе 12 новых соединений: (5Z,9Z)-9-хлор-24-метил-5,9-пентакозадиеновая, (5Z,9Z)-9-хлор-25-метил-5,9-гексакозадиеновая, (5Z,9Z)-9-хлор-24-метил-5,9-гексакозадиеновая, (5Z,9Z)-9-хлор-25-метил-5,9-гептакозадиеновая, 6-хлор-20-метил-4-генэйкозеновая, 6-хлор-19-метил-4-генэйкозеновая, 6-хлор-20-метил-4-докозеновая, *цис*-17,18-метилтен-тетракозановая, 16,21-диметилдокозановая, 18,23-диметилтетракозановая, 16,18,22-триметилтрикозановая и 18,20,24-триметилпентакозановая кислоты. Показаны особенности изученной смеси ЖК: высокое содержание компонентов с монометилированными цепями (>50%) и почти полное замещение обычных для губок демоспонгиевых кислот их хлорпроизводными – неизвестными ранее (5Z,9Z)-9-хлор-5,9-диеновыми кислотами. Обсуждено наличие аналогичных структурных фрагментов в ЖК *Penares* sp. и в некоторых биологически активных вторичных метаболитах губок этого рода. Полученные результаты могут быть использованы в структурных, сравнительных и биосинтетических исследованиях морских липидов.

Ключевые слова: губка, *Penares*, жирные кислоты, хлорированные жирные кислоты, демоспонгиевые кислоты, ГЖХ-МС

DOI: 10.31857/S0132342324020034, **EDN:** ONMVIP

ВВЕДЕНИЕ

Губки – древние и наиболее примитивные многоклеточные животные, являющиеся одним из богатейших природных источников различных уникальных метаболитов, в том числе необычных жирных кислот (ЖК). ЖК губок посвящено много экспериментальных и несколько обзорных статей (см., например, обзоры [1–5]). Несмотря на преобладание хлорид-

иона в морской воде, ранее известные галогенированные ЖК губок представлены 6-бромпроизводными 5-*цис*,9-*цис*-диеновых (или демоспонгиевых [6]) кислот, а также ацетиленовыми полиненасыщенными бромированными [7] и иодированными [8] кислотами. Что касается хлорированных ЖК, то их обнаруживали в некоторых более эволюционно развитых морских беспозвоночных, а также рыбах и водорослях [7].

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0132342324020034 для авторизованных пользователей. Сокращения: ЖК – жирные кислоты; ЭДЦ – эквивалентная длина цепи; ¹H,¹H-COSY – протон-протонная корреляционная спектроскопия; НМВС – гетероядерная многосвязная когерентность; HSQC – гетероядерная одноквантовая когерентность. #Автор для связи: (тел.: +7 (423) 231-11-68; эл. почта: santalova@piboc.dvo.ru).

При разделении этанольного экстракта губки рода *Penares* (Южно-Китайское море), наряду с фракциями тритерпеноидов [9] и бромированных индольных алкалоидов [10], мы получили фракцию этиловых эфиров демоспонгиевых кислот нового типа, содержащих винильный атом хлора. Эта необычная структурная черта побудила нас более подробно исследовать ЖК данной губки, что привело к обнаружению других неизвестных ранее кислот.

Губки *Penares* – продуценты многих липидов и липидоподобных соединений, обладающих разнообразными видами биологической активности. Так, пенарезидины А и В из *Penares* sp. активировали актин-зависимую АТФазу [11], а пеназетидин А из *Penares sollasi* ингибировал протеинкиназу С [12]. Кроме того, пенасульфат А из *Penares* sp. и шульцеины А–С из *Penares schulzei* ингибировали α -глюкозидазу [13, 14], а анкоринозиды В–D из *Penares sollasi* – мембранную матриксную металлопротеиназу (MT1-MMP) [15]. В дополнение к этому пенарамиды из *Penares aff. incrustans* ингибировали связывание ω -конотоксина GVIA с кальциевыми каналами N-типа [16], а пеназины А–Е из *Penares* sp. обладали цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток HeLa и P388 [17]. Несмотря на интерес к таким веществам, структурный анализ их потенциальных предшественников, а именно индивидуальных ЖК губок рода, ранее не проводили. Были опубликованы только скрининговые исследования ЖК двух образцов *Penares tylotaster*, в которых сравнивали относительное содержание кислот по длинам цепей, по наличию/отсутствию разветвлений, двойных связей и т.д. без установления положения заместителей и двойных связей [18, 19]. Целью данной работы стал более тщательный структурный анализ ЖК губки рода *Penares*, а также сравнение характерных структурных черт некоторых обнаруженных ЖК и известных вторичных метаболитов *Penares*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фракции ЖК и их этиловых эфиров выделили из этанольного экстракта *Penares* sp. с помощью колоночной хроматографии на сефадексе и силика-

геле и разделили методом ВЭЖХ на прямой и/или обращенной фазах. Полученные фракции анализировали с помощью ГЖХ-МС (ионизация электронным ударом) с использованием сложноэфирных, пирролидиновых, 4,4-диметилкоксазолиновых, диметилдисульфидных и гидрированных производных ЖК. В отдельных случаях для анализа структур применяли ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопию. Была обнаружена 71 кислота с длиной цепи от C_{12} до C_{28} (табл. 1), включая 12 новых соединений: (5Z,9Z)-9-хлор-24-метил-5,9-пентакозадиеновую (I), (5Z,9Z)-9-хлор-25-метил-5,9-гексакозадиеновую (II), (5Z,9Z)-9-хлор-24-метил-5,9-гексакозадиеновую (III), (5Z,9Z)-9-хлор-25-метил-5,9-гептакозадиеновую (IV), 6-хлор-20-метил-4-генэйкозеновую (V), 6-хлор-19-метил-4-генэйкозеновую (VI), 6-хлор-20-метил-4-докозеновую (VII), *cis*-17,18-метилентетракозановую (VIII), 16,21-диметилдокозановую (IX), 18,23-диметилтетракозановую (X), 16,18,22-триметилтрикозановую (XI) и 18,20,24-триметилпентакозановую (XII) кислоты (рис. 1). Неизвестные ранее соединения (I–XII) присутствовали в следовых количествах (<0.1%) в исследованной сумме ЖК.

Структурный анализ новых ЖК. В масс-спектрах этиловых эфиров (Ia–IVa) хлорпроизводных демоспонгиевых кислот пик молекулярного иона $[M]^+$ либо отсутствовал, либо был очень малоинтенсивным из-за легкой потери этими соединениями Cl и HCl, как в масс-спектрах высших алифатических моногалогенидов [20]. Напротив, пики ионов $[M - \text{Cl}]^+$ / $[M - \text{HCl}]^+$ / $[M - \text{Cl} - \text{EtOH}]^+$ (m/z 419/418/373, 433/432/387 и 447/446/401 для этиловых эфиров C_{26} -, C_{27} - и C_{28} -кислот соответственно) были относительно интенсивными. Регистрировались также заметные количества ионов $[M - 88 - \text{Cl}]^+$, где фрагмент с m/z 88 образовывался за счет перегруппировки Мак-Лафферти [21]. В области малых ионных масс наблюдали большие пики при m/z 55, 67, 81 (100%), 95, 109 и некоторые другие, типичные для фрагментации этиловых эфиров диеновых ЖК [22]. Кроме характерного для масс-спектров этиловых эфиров $\Delta^5,9$ -кислот пика при m/z 155 [23], в масс-спектрах соединений (Ia–IVa) наблюдали чуть более интен-

Таблица 1. Жирные кислоты (ЖК) губки *Penares* sp.

ЖК	ЭДЦ	%	ЖК	ЭДЦ	%
14:0	14.00	1.4	18:0	18.00	8.4
<i>изо</i> -15:0	14.63	6.7	10-Ме-18:0	18.37	8.2
<i>антеизо</i> -15:0	14.71	2.7	11-Ме-18:0	18.39	8.2
15:0	15.00	1.6	<i>изо</i> -19:0	18.64	0.5
<i>изо</i> -16:0	15.63	1.9	<i>антеизо</i> -19:0	18.72	0.2
<i>антеизо</i> -16:0	15.72	1.6	11,12-Метилен-18:0	18.93	0.7
16:1Δ9	15.81	0.8	19:0	19.00	0.1
16:0	16.00	8.9	<i>антеизо</i> -20:0	19.72	0.9
9-Ме-16:0	16.40	3.2	20:0	20.00	0.3
10-Ме-16:0	16.44	5.1	<i>антеизо</i> -21:0	20.72	1.9
<i>изо</i> -17:0	16.64	2.0	<i>изо</i> -22:0	21.63	0.6
<i>антеизо</i> -17:0	16.72	2.1	16-Ме-22:0	22.42	1.8
9,10-Метилен-16:0	16.94	0.6	<i>изо</i> -23:0	22.63	0.7
17:0	17.00	1.1	<i>антеизо</i> -23:0	22.73	0.2
10-Ме-17:0	17.39	0.2	17-Ме-24:0	24.40	4.9
18:1Δ9	17.81	13.4	18-Ме-24:0	24.44	5.5

Состав общей фракции ЖК приведен согласно данным ГЖХ-МС-анализа их этиловых эфиров. Следовые компоненты, для которых точная процентная оценка была невозможной (<0.1%), указаны ниже (в скобках приведено значение эквивалентной длины цепи (ЭДЦ)): 12:0, 9-Ме-15:0 (15.44), 10-Ме-15:0 (15.47), *изо*-20:0 (19.63), 15-Ме-21:0 (21.43), *антеизо*-22:0 (21.72), 22:0, 14-Ме-22:0 (22.38), 16-Ме-*изо*-23:0 (22.97), 23:0, 15-Ме-23:0 (23.36), 16-Ме-23:0 (23.39), 17-Ме-23:0 (23.43), 18-Ме-23:0 (23.47), *изо*-24:0 (23.63), *антеизо*-24:0 (23.73), 24:0, 16,18-ди-Ме-*изо*-24:0 (24.53), *изо*-25:0 (24.63), *антеизо*-25:0 (24.73), *цис*-17,18-метилен-24:0 (24.94), 18-Ме-*изо*-25:0 (24.98), 25:0, 18-Ме-25:0 (25.38), 26:2Δ5Z,9Z (25.50), *изо*-26:0 (24.63), *антеизо*-26:0 (25.73), 26:0, 18-Ме-26:0 (26.37), 18,20-ди-Ме-*изо*-26:0 (26.53), *изо*-27:0 (26.63), *антеизо*-27:0 (26.73), 9-Cl-*изо*-26:2Δ5Z,9Z (27.00), 9-Cl-*изо*-27:2Δ5Z,9Z (28.00), 9-Cl-*антеизо*-27:2Δ5Z,9Z (28.11), 9-Cl-*антеизо*-28:2Δ5Z,9Z (29.12). Для 6-Cl-*изо*-22:1Δ4 (22.93), 6-Cl-*антеизо*-22:1Δ4 (23.06) и 6-Cl-*антеизо*-23:1Δ4 (24.07) величины ЭДЦ рассчитаны для пирролидиновых производных.

сивный пик при m/z 154. Двойной сигнал при m/z 154/155 сопровождался менее интенсивными сигналами двух длинноцепочечных изотопных ионов с ^{35}Cl и ^{37}Cl , тоже образованных в результате разрыва *бис*-аллильной связи $\text{CH}_2\text{-7-CH}_2\text{-8}$, но содержащих метильный конец молекулы (рис. 2а). Так, в масс-спектрах этиловых эфиров C_{26} -, C_{27} - и C_{28} -кислот наблюдали по два изотопных пика при m/z 298/300, 312/314 и 326/328 соответственно в характерном соотношении ~3 : 1. Сложение масс каждого из двух изотопных ионов со значением суммы 155 + 1 давало соответствующие молекулярные массы, например, 454/456 $[M]^+$ для соединения (Ia). Кроме того, сигналы вторичных ион-радикалов при m/z 403 ($[M-\text{HCl}-\text{CH}_3]^+$ для соединения (Ia) или $[M-\text{HCl}-\text{CH}_2\text{CH}_3]^+$ для соединения (IIIa)) и при m/z 417 ($[M-\text{HCl}-\text{CH}_3]^+$ для соединения (IIa) или $[M-\text{HCl}-$

$\text{CH}_2\text{CH}_3]^+$ для соединения (IVa)) были более интенсивны, чем соседние сигналы гомологичных ионов, что подразумевало наличие *изо*- или *антеизо*-разветвлений в соответствующих структурах (см., например, рис. 2а).

Соединения (Ia–IVa) были превращены в диметилдисульфидные производные, при этом хлорзамещенная двойная связь не присоединяла диметилдисульфид. В масс-спектрах полученных аддуктов наблюдали значительный пик иона $[M-\text{Cl}]^+$ ($[M]^+$ не регистрировался) и интенсивные пики при m/z 129 (100%) и 175, указывающие на наличие двойной связи в положении 5 исходных соединений. Последние сигналы сопровождалась гораздо менее интенсивными сигналами изотопных ионов, также образующихся при разрыве связи C5–/–C6, например,

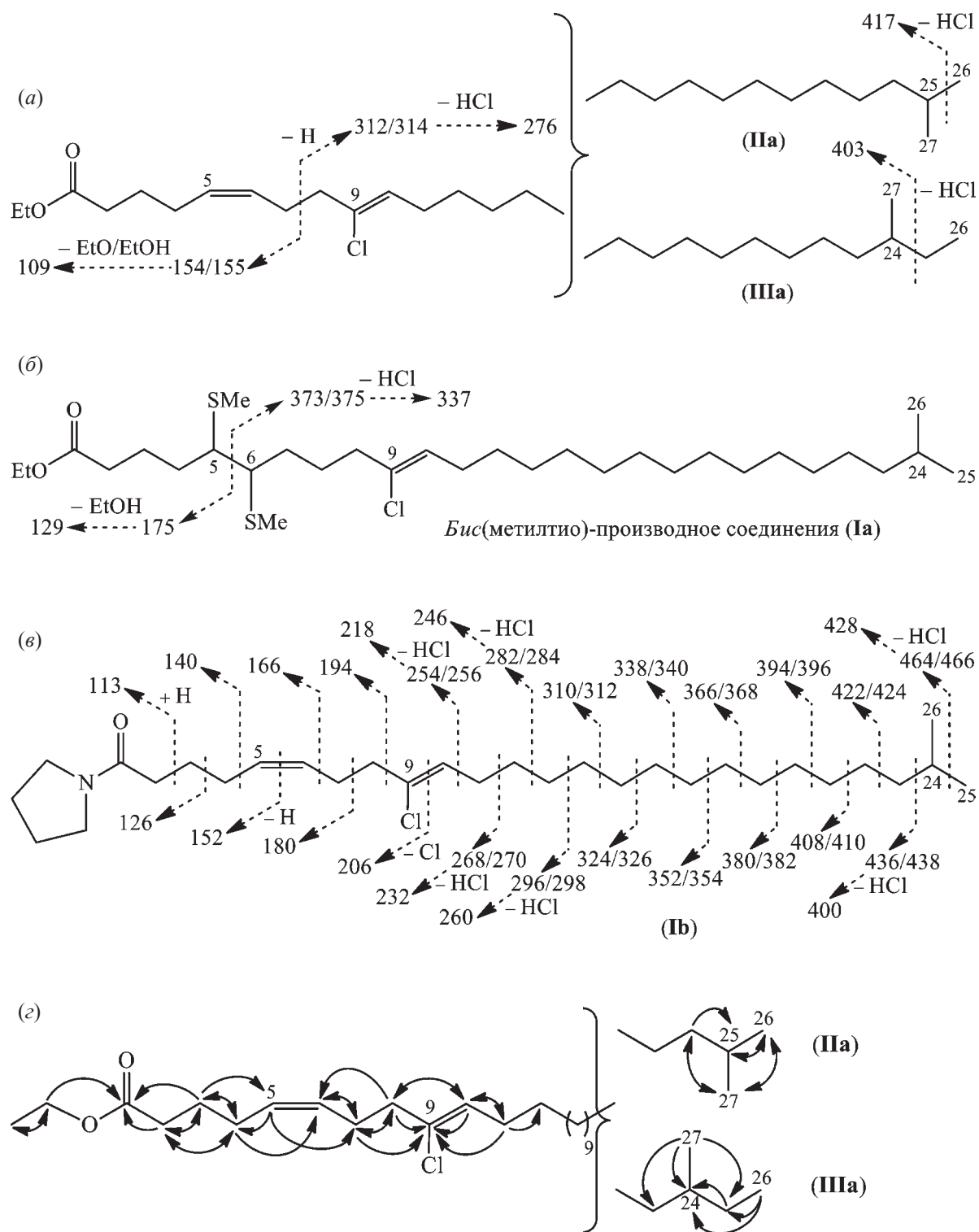


Рис. 2. (а) – Масс-спектрометрическая фрагментация изомерных этиловых эфиров (IIa) и (IIIa) (пик молекулярного иона при m/z 468 $[M]^+$ с ^{35}Cl был малоинтенсивен, минорный пик $[M]^+$ с ^{37}Cl не регистрировался); (б) – масс-спектрометрическая фрагментация бис(метилтио)-производного этилового эфира (Ia) (513 $[M - \text{Cl}]^+$); (в) – масс-спектрометрическая фрагментация пирролидида (Ib) (479/481 $[M]^+$); для упрощения схемы не показаны менее многочисленные ионы, соответствующие элиминированию HCl от изотопных фрагментов при m/z 310/312–422/424); (г) – ключевые HMBC-корреляции для соединений (IIa) и (IIIa).

ионов с m/z 373/375 при фрагментации *бис*(метилтио)-производного этилового эфира (**Ia**) (рис. 2б). Сложение массы изотопных ионов при m/z 373/375 с массой иона при m/z 175 позволяло вычислить значение 548/550 $[M]^+$ для диметилдисульфидного производного соединения (**Ia**).

Масс-спектры пирролидидов (**Ib–IVb**) и 4,4-диметилксазолинового производного кислоты (**I**) содержали заметные пики изотопных молекулярных ионов (m/z 479/481, 493/495 и 507/509 с $^{35}\text{C}1/^{37}\text{C}1$ для производных C_{26} -, C_{27} - и C_{28} -кислот соответственно) наряду с чуть более интенсивными пиками ионов $[M - \text{Cl}]^+$. Большой пик иона при m/z 180, образующегося в результате расщепления по центру *бис*-метилена-разделенной системы двух двойных связей (рис. 2в), однозначно указывал на присутствие $\Delta 5,9$ -фрагмента во всех анализированных *N*-содержащих производных [23, 24]. Положения метильных разветвлений в кислотах (**I–IV**) были определены соответственно пробелам во фрагментации их пирролидидов на основании сформулированного ранее правила [25]. Например, масс-спектры пирролидидов (**Ib**) и (**IIIb**) с метильной группой в положении 24 содержали пробел в 28 а.е.м. между пиками при m/z 464/466 (соответствует иону $[M - \text{CH}_3]^+$ для соединения (**Ib**) и иону $[M - \text{CH}_2\text{CH}_3]^+$ для соединения (**IIIb**)) и 436/438 ($[M - \text{CH}(\text{CH}_3)_2]^+$ для соединения (**Ib**) и $[M - \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3]^+$ для соединения (**IIIb**)). В результате фрагментации пирролидида (**IIb**) с метильной группой при СН-25 появлялся пробел в 28 а.е.м. между пиками при m/z 478/480 ($[M - \text{CH}_3]^+$) и 450/452 ($[M - \text{CH}(\text{CH}_3)_2]^+$). Сигнал вторичного ион-радикала при m/z 478/480 $[M - \text{CH}_2\text{CH}_3]^+$ в масс-спектре пирролидида (**IVa**) был также намного более интенсивен, чем соседние сигналы гомологичных ионов, что указывало на наличие метильной группы при СН-25. К сожалению, в масс-спектрах пирролидидов последовательная фрагментация обрывалась после СН₂-8 и возобновлялась на СН-10, как показано для соединения (**Ib**) (рис. 2в). То же наблюдали в масс-спектре 4,4-диметилксазолинового производного кислоты (**I**) (478/479/480/481, $[M - 1]^+/[M]^+$), изомерного пирролидиду (**Ib**). Таким образом, масс-

спектрометрические данные свидетельствовали о том, что атом хлора в соединениях (**I–IV**) мог находиться либо при С9, либо при С10.

Гидрирование производных кислот (**I–IV**) над катализатором Адамса сопровождалось дегалогенированием, в результате чего эти вещества превращались в известные насыщенные соединения. Так, пирролидид (**Ib**) подвергался дегалогенированию до соответствующего производного 24-метилпентакозановой кислоты, чей масс-спектр содержал диагностический пробел (28 а.е.м.) между пиками при m/z 406 и 434 [26]. Этиловые эфиры (**IIa–IVa**) при гидрировании трансформировались в этиловые эфиры 25-метилгексакозановой (эквивалентная длина цепи (ЭДЦ) 26.63), 24-метилгексакозановой (ЭДЦ 26.72) и 25-метилгептакозановой (ЭДЦ 27.72) кислот соответственно (согласно данным ГЖХ-МС-анализа). Элиминирование С1 при гидрировании могло указывать на его винильное (как в соединениях (**I–IV**)) или аллильное (как в соединениях (**V–VII**)) положения, т.к. дегалогенирование насыщенных хлорированных жирных кислот в использованных нами условиях гидрирования не происходило.

С использованием ВЭЖХ на прямой и обращенной фазах нам удалось получить смесь близких по структуре изомеров (**IIa**) и (**IIIa**) (39 и 31% во фракции соответственно), которые не разделялись методами препаративной хроматографии. С помощью экспериментов ^1H , ^1H -COSY, HMBC и HSQC было подтверждено наличие 5,9-диенового фрагмента и установлено положение атома хлора при С9 в данных соединениях. Так, спектр ^1H , ^1H -COSY показал наличие линейных спиновых систем протонов от СН₂-2 (δ_{H} 2.30, т, J 7.5) до СН₂-8 (δ_{H} 2.325, т, J 7.3) и от СН-10 (δ_{H} 5.44, т, J 7.0) до СН₂-пула (δ_{H} 1.20–1.35, м). Спектр HMBC содержал соответствующие корреляции, показанные на рис. 2г. Значение константы спин-спиновой взаимодействия $J_{5,6}$ 10.9 Гц, установленное с помощью селективного гомоядерного декаплирования аллильных протонов [27], свидетельствовало о *Z*-конфигурации двойной связи при С5. *Z*-Конфигурация двойной связи при С9 была определена на основании сравнения наших спектров

^1H - и ^{13}C -ЯМР с соответствующими литературными спектрами известных винильно хлорированных *Z/E*-изомеров [28], а именно на основании присутствия характерных резонансов CH -10 (δ_{H} 5.44, т, J 7.0), CH_2 -11 (δ_{H} 2.145, м) и CH_2 -8 (δ_{C} 39.4). Кроме того, спектры ЯМР показывали сигналы двух эквивалентных терминальных метильных (δ_{H} 0.86, д, J 6.7; δ_{C} 22.6), одной метиновой (δ_{H} 1.515, м; δ_{C} 28.0) и одной метиленовой (δ_{H} 1.15, м; δ_{C} 39.0) групп, протоны которых образовывали спиновую систему *изо*-структуры компонента (**IIa**) согласно корреляциям $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY и НМВС. С помощью подобных корреляций была также подтверждена *антеизо*-структура компонента (**IIIa**), которому принадлежали характеристичные сигналы двух метильных групп (δ_{H} 0.84, д, J 6.2; δ_{C} 19.2 и δ_{H} 0.85, т, J 7.1; δ_{C} 11.3) [29, 30].

Значения химических сдвигов и мультиплетности сигналов олефиновых протонов в спектрах ^1H -ЯМР ВЭЖХ-фракций, обогащенных кислотами (**I**) и (**IV**), были аналогичны соответствующим характеристикам протонов двойных связей этиловых эфиров кислот (**II**) и (**III**). Это в совокупности с данными масс-спектрометрических фрагментаций и химических трансформаций указывало на то, что соединения (**I–IV**) содержали одинаковую *5Z,9Z*-диеновую систему связей с атомом хлора при C9. Такой вывод подтверждали и значения ЭДЦ, равные 27.00 и 28.00 для *изо*-гомологов (**I**) и (**II**) соответственно и 28.11 и 29.12 для *антеизо*-гомологов (**III**) и (**IV**) соответственно.

Известно, что аллилгалогениды легче теряют галоген, чем винилгалогениды. Эта закономерность проявлялась в условиях масс-спектрометрической фрагментации пирролидидов аллильно хлорированных кислот (**V–VII**), у которых элиминирование атома хлора происходило легче, чем у пирролидидов винильно хлорированных кислот (**I–IV**). Так, в масс-спектрах пирролидидов (**Vb–VIIb**) основным сигналом был пик иона $[M - \text{Cl}]^+$ (m/z 390, 390 и 404 соответственно), интенсивность которого в масс-спектрах пирролидидов (**Ib–IVb**) составляла только ~3.5%. В области молекулярного иона в масс-

спектрах соединений (**Vb–VIIb**) присутствовали кластеры малоинтенсивных пиков изотопных ионов $[M - 1]^+/[M]^+$ (m/z 424/425/426/427, 424/425/426/427 и 438/439/440/441 соответственно). В области малых ионных масс после пика при m/z 126 наблюдали гораздо менее интенсивные пики при m/z 138/139 и 152, что было признаком наличия двойной связи при C4 (рис. 3а). В то время как четкий сигнал аллильного разрыва при m/z 166 был характерен для масс-спектров пирролидидов известных Δ 4-кислот [26], масс-спектры пирролидидов Δ 4-кислот (**Vb–VIIb**) характеризовались сигналом повышенной интенсивности близкого по массе иона с m/z 165. Очевидно, этот ион формировался в результате отрыва атома хлора от истинных продуктов аллильного разрыва – изотопных ионов с m/z 200 и 202, которые, несмотря на легкость потери Cl при фрагментации, все же регистрировались в масс-спектре как менее интенсивные пики в соотношении 3 : 1. Такого рода характеристичное расщепление, происходящее после замещенного аллильного углерода и дающее значимые диагностические сигналы, мы наблюдали ранее при масс-спектрометрической фрагментации метиловых эфиров некоторых ЖК с аллильными гидроксильными или *S*-метиловыми группами [31]. Пробел в 28 а.е.м. между пиками при m/z 374 (соответствует иону $[M - \text{CH}_3 - \text{HCl}]^+$ для соединения (**Vb**) и иону $[M - \text{CH}_2\text{CH}_3 - \text{HCl}]^+$ для соединения (**VIIb**)) и 346 ($[M - \text{CH}(\text{CH}_3)_2 - \text{HCl}]^+$ для соединения (**Vb**) и $[M - \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3 - \text{HCl}]^+$ для соединения (**VIIb**)) указывал на наличие в кислотах (**V**) и (**VII**) метильной группы при C20. Это подтверждалось повышенной интенсивностью пиков вторичных ион-радикалов при m/z 410/412, которые представляли собой фрагмент $[M - \text{CH}_3]^+$ для *изо*-метил-разветвленного соединения (**Vb**) и фрагмент $[M - \text{CH}_2\text{CH}_3]^+$ для *антеизо*-метил-разветвленного соединения (**VIIb**). Пробел в 28 а.е.м. между пиками при m/z 360 ($[M - \text{CH}_2\text{CH}_3 - \text{HCl}]^+$) и 332 ($[M - \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3 - \text{HCl}]^+$) и пик повышенной интенсивности вторичного ион-радикала при m/z 396/398 $[M - \text{CH}_2\text{CH}_3]^+$ в масс-спектре *антеизо*-метил-разветвленного пирролидида (**Vb**) были признаками наличия метильной группы

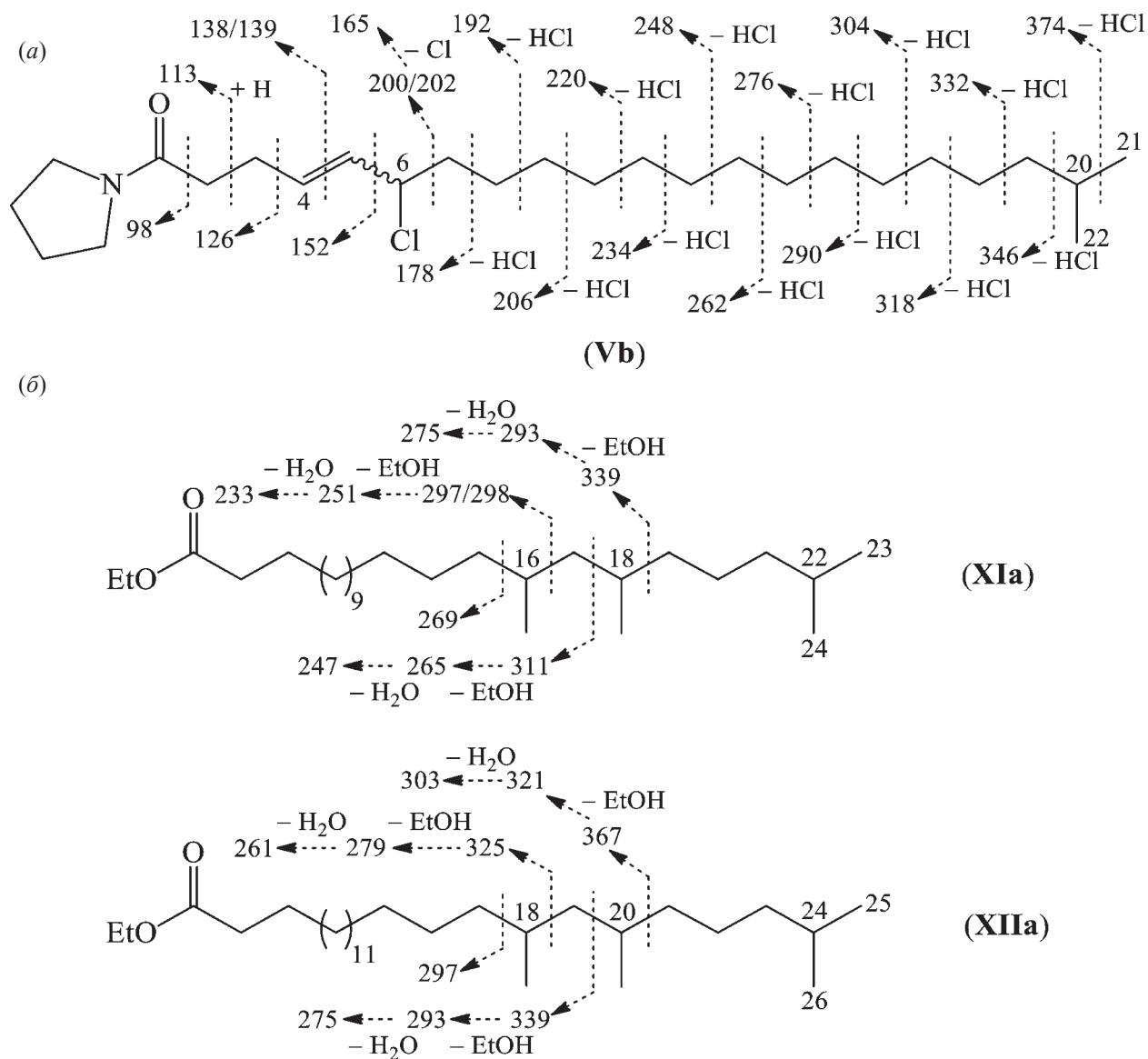


Рис. 3. (а) – Масс-спектрометрическая фрагментация пирролидида (Vb) (424/425/426/427 $[M - 1]^+/[M]^+$); (б) – масс-спектрометрическая фрагментация этиловых эфиров (XIa) и (XIIa).

при C19. Гидрирование соединений (Vb–VIIb) над катализатором Адамса ожидаемо протекало с дегалогенированием, что приводило к образованию пирролидидов известных 20-метилгенэйкозановой, 19-метилгенэйкозановой и 20-метилдокозановой кислот, также обнаруженных нами в *Penares* sp. К сожалению, низкое содержание аллильно хлорированных кислот (V–VII) не позволило получить спектр ¹H-ЯМР, который был бы достаточно информативен для установления конфигурации их двойной связи.

Как и в масс-спектре этилового эфира моноеновой C₂₅-кислоты, в масс-спектре этилового эфира циклопропан-содержащей кислоты (VIII) присутствовали пики ионов с m/z 408 $[M]^+$, 362 $[M - EtOH]^+$ и др. Однако неспособность этилового эфира соединения (VIII) присоединять диметилдисульфид и значение его ЭДЦ (24.94) подразумевали наличие циклопропанового кольца при (n – 7)- и (n – 8)-атомах углерода (n – номер терминального атома углерода линейной алифатической цепи), как в этиловых

эфирах гомологичных кислот 9,10-метилен-16:0 (ЭДЦ 16.94) и 11,12-метилен-18:0 (ЭДЦ 18.93) из *Penares* sp. (табл. 1). К масс-спектрометрическим признакам пирролидидов высших циклопропан-содержащих гомологов (C_{19} и более) таких кислот относятся интенсивный пик с нечетным значением m/z , образующийся в результате β -разрыва после циклопропанового кольца, и интервал в 12 а.е.м. между фрагментами, показывающими положение цикла [32, 33]. Соответственно, масс-спектр пирролидида кислоты (**VIII**) (m/z 433 $[M]^+$) демонстрировал интенсивный пик при m/z 363 (ион β -разрыва) и характерный интервал в 12 а.е.м. между пиками при m/z 322 (ион, содержащий C_{17} -фрагмент ЖК) и 334 (ион с C_{18} -фрагментом ЖК), что подтверждало наличие циклопропанового кольца в 17,18-положении. В спектре $^1H, ^1H$ -COSY протоны с $\delta_H -0.33$ (ддд, J 4.3, 5.3, 5.3, 1H, H-25a), 0.56 (ддд, J 4.3, 8.4, 8.4, 1H, H-25b) и 0.65 (м, 2H, H-17, H-18) кислоты (**VIII**) были связаны корреляциями в структуру трехчленного цикла, при этом значения химических сдвигов и констант спин-спинового взаимодействия сигналов данных протонов соответствовали *цис*-ориентации кольца [33, 34]. Следует отметить, что масс-спектры изученных до сих пор 4,4-диметилноксазолиновых производных циклопропан-содержащих ЖК считаются почти неотличимыми от масс-спектров 4,4-диметилноксазолиновых производных, соответствующих им по молекулярной массе неразветвленных моноеновых ЖК из-за вероятной перегруппировки циклопропанов в моноены при фрагментации [35, 36]. Согласно этой закономерности, масс-спектр 4,4-диметилноксазолина кислоты (**VIII**) должен быть подобен масс-спектру 4,4-диметилноксазолина кислоты 25:1 Δ 17. Тем не менее фрагментация полученного нами 4,4-диметилноксазолина кислоты (**VIII**) (m/z 433 $[M]^+$) напоминала фрагментацию соответствующего производного кислоты 25:1 Δ 18, т.к. приводила к появлению интервала в 12 а.е.м. между пиками при m/z 322 (C_{17} -фрагмент) и 334 (C_{18} -фрагмент). При этом данные пики были даже чуть больше предшествующего пика при m/z 308, что не соответствовало относительной интенсивности

сигналов при фрагментации вблизи изолированной двойной связи. Таким образом, в полученном нами масс-спектре 4,4-диметилноксазолинового производного кислоты (**VIII**) характеристичные сигналы, между которыми существовал интервал в 12 а.е.м., были смещены и изменили свою интенсивность вопреки закономерности, ранее наблюдавшейся в масс-спектрах 4,4-диметилноксазолиновых производных более коротких циклопропан-содержащих ЖК. Аналогичные изменения диагностических сигналов с ростом длины алифатической цепи мы наблюдали ранее в масс-спектрах пирролидидов ряда гомологичных циклопропан-содержащих ЖК, которые так же, как и соединение (**VIII**), были формальными производными моноенов ($n - 7$)-семейства [33].

Этиловые эфиры двух насыщенных гомологичных *изо*-метил-разветвленных кислот (**IX**) (ЭДЦ 22.97) и (**X**) (ЭДЦ 24.98) с дополнительной метильной группой в ($n - 7$)-положении генерировали характеристичные ионы, образующиеся путем разрывов связей в α -положениях по отношению к ($n - 7$)-углероду, как было описано ранее для масс-спектрометрической фрагментации сложных эфиров ЖК с метильной группой в середине цепи [37]. Так, в отличие от этилового эфира стандартной неразветвленной кислоты 24:0 (m/z 396 $[M]^+$), этиловый эфир соединения (**IX**) (m/z 396 $[M]^+$) в результате α -разрывов продуцировал ионы при m/z 269 и 297 приблизительно в равном количестве, а также фрагменты при m/z 251 (потеря ионом при m/z 297 молекулы EtOH) и 233 (потеря ионом при m/z 297 молекул EtOH и H_2O). Этиловый эфир соединения (**X**) (m/z 424 $[M]^+$) генерировал большие количества ионов при m/z 325 и 297 по сравнению с соответствующим производным неразветвленной кислоты 26:0 (m/z 424 $[M]^+$), а также ионы при m/z 279 (потеря ионом при m/z 325 молекулы EtOH) и 261 (потеря ионом при m/z 325 молекул EtOH и H_2O). При этом сигналы фрагментов, указывающих на наличие концевых *изо*-структур в этиловых эфирах кислот (**IX**) и (**X**), были малоинтенсивными. Положения всех метильных разветвлений были однозначно определены на основании присутствия диагностических пробелов

в 28 а.е.м. между пиками при m/z 294 и 322 (потеря CH_2 с метильной группой) и пиками при m/z 378 и 406 (потеря CH_2 с метильной группой) в масс-спектре пирролидида 16,21-диметил-разветвленной кислоты (**IX**) (m/z 421 $[M]^+$), а также аналогичных пробелов между пиками при m/z 322 и 350 (потеря CH_2 с CH_3) и m/z 406 и 434 (потеря CH_2 с CH_3) в масс-спектре пирролидида 18,23-диметил-разветвленной кислоты (**X**) (m/z 449 $[M]^+$).

изо-Метил-разветвленные гомологичные кислоты (**XI**) (ЭДЦ 24.53) и (**XII**) (ЭДЦ 26.53) имели дополнительные метильные группы в положениях ($n - 6$) и ($n - 8$). Фрагментарные ионы, дававшие сигналы повышенной интенсивности в масс-спектрах этиловых эфиров (**XIa**) (m/z 424 $[M]^+$) и (**XIIa**) (m/z 452 $[M]^+$) по сравнению с масс-спектрами неразветвленных стандартов с аналогичными молекулярными массами, а также характеристичные ионы, отсутствовавшие в масс-спектрах стандартов, показаны на рис. 3б. Можно видеть, что фрагментация вблизи C16 в соединении (**XIa**) и C18 в соединении (**XIIa**) была аналогична фрагментации этиловых эфиров кислот (**IX**) и (**X**) соответственно. Обнаружение пробелов в 28 а.е.м. между пиками при m/z 294 и 322, 336 и 364, 406 и 434 в масс-спектре пирролидида кислоты (**XI**) (m/z 449 $[M]^+$) указывало на наличие метильных групп при C16, C18 и C22. Пробелы между пиками при m/z 322 и 350, 364 и 392, 434 и 462 в масс-спектре пирролидида кислоты (**XII**) (m/z 477 $[M]^+$) соответствовали положениям метильных разветвлений при C18, C20 и C24.

Особенности жирных кислот *Penares* sp. В живых тканях основная часть ЖК присутствует в связанной форме (как компоненты других липидов), а свободные или неэтерифицированные ЖК, обладающие вредоносными свойствами, являются минорными соединениями. Однако эти соединения легко генерируются из более сложных липидов при хранении (даже при -20°C), размораживании и экстракции биологических объектов в результате функционирования липаз [38], поэтому ЖК, выделенные из экстракта губки *Penares* sp., мы рассматриваем как продукты деятельности таких фер-

ментов. При этом этиловые эфиры ЖК являются, по нашему опыту, обычными составляющими этанольных экстрактов губок.

Смесь ЖК из *Penares* sp. (табл. 1) характеризуется высоким содержанием компонентов с разветвленными цепями (59.1%) – большим, чем у изученной ранее *Penares tylostaster* (38.1%) [19]. Разветвленные C_{15} – C_{28} -кислоты, обнаруженные в *Penares* sp., имеют моно-, ди- и три- метилированные цепи. Среди абсолютно доминирующих монометилированных ЖК присутствуют *изо/антеизо*-компоненты (12.4/9.6%) и компоненты со срединной метильной группой (37.1%), находящейся в положениях ($n - 5$), ($n - 8$), ($n - 6$) и ($n - 7$) алифатической цепи (в порядке увеличения содержания). Основные монометилированные кислоты имеют нечетное количество углеродных атомов: C_{19} (17.1%, преобладают изомерные 10-Ме-18:0 и 11-Ме-18:0), C_{17} (12.4%), C_{25} (10.4%) и C_{15} (9.4%). Ди- и триметилированные ЖК – следовые компоненты. Источником метил-разветвленных, а также циклопропан-содержащих ЖК губок считаются бактерии, которые служат пищей или населяют данное беспозвоночное [3, 39–41]. Некоторые губки, как “микробиальные ферментёры”, могут содержать такое большое количество бактерий на грамм массы, что их даже называли “бактериогубками” [42]. При этом ЖК бактерий и других ассоциированных микробов могут как в неизменном виде присутствовать в жирнокислотных фракциях губок, так и быть экзогенными предшественниками более длинных ЖК этих беспозвоночных (см. обзор Bergé et al. [3] и ссылки в нем). Следовательно, бактериальные кислоты 9,10-метил-16:0 или 11,12-метил-18:0, обнаруженные в минорных количествах в *Penares* sp., могли выступать в качестве субстрата элонгации при образовании соединения (**VIII**). Предшественниками диметилированных (**IX**, **X**) и триметилированных (**XI**, **XII**) соединений также могли быть более короткие гомологи бактериального происхождения, такие как кислоты 8-Ме-изо-15:0 и 10,12-ди-Ме-изо-18:0 соответственно, обнаруженные ранее в донных осадках [43]. Нужно заметить, что метильные разветвления характерны для алифатических цепей многих биологически актив-

ных липидов и липидоподобных соединений, выделенных из губок рода *Penares*, включая пенарезидины А и В (*изо*- и *антеизо*-разветвления) [11], пеназетидин А (метильная группа в ($n-7$)-положении) [12], пенасульфат А (метильная группа в положении ($n-7$)) [13], шульцеин А (метильная группа в положении ($n-9$)) [14], пенарамиды (*изо*-, *антеизо*-разветвления или метильная группа в положении ($n-7$)) [16], пеназины С–Е (метильные группы в положениях ($n-8$), ($n-9$) или ($n-10$)) [17] и анкоринозид С (метильная группа в середине гликозилированной цепи) [15]. Такие структурные черты могут не только подразумевать вовлеченность бактерий в биосинтез этих соединений, но и наводить на мысль о значительном количестве этих микроорганизмов в губках рода *Penares*.

Насыщенные ЖК линейного строения представлены в губке *Penares* sp. (табл. 1) C_{12} -, C_{14} – C_{20} - и C_{22} – C_{26} -компонентами (36.0% при доминировании кислот 16:0 (8.9%) и 18:0 (8.4%)). Линейные моноены (14.2%) составляют кислоты 18:1 Δ 9 (13.4%) и 16:1 Δ 9 (0.8%). Демоспонгиевая кислота с неразветвленным скелетом, 26:2 Δ 5Z,9Z, присутствует в следовых количествах. Указанные насыщенные, моноеновые и диеновая ЖК типичны для многих губок [2, 5]. Остальные ненасыщенные ЖК, обнаруженные в *Penares* sp., включают неизвестные ранее хлорированные кислоты с метильным разветвлением в конце алифатической

цепи: моноены 6-Cl-*изо*-22:1 Δ 4 (V), 6-Cl-*антеизо*-22:1 Δ 4 (VI), 6-Cl-*антеизо*-23 (VII), а также диены 9-Cl-*изо*-26:2 Δ 5Z,9Z (I), 9-Cl-*изо*-27:2 Δ 5Z,9Z (II), 9-Cl-*антеизо*-27:2 Δ 5Z,9Z (III) и 9-Cl-*антеизо*-28:2 Δ 5Z,9Z (IV). Таким образом, демоспонгиевые кислоты, типичные для губок, оказались почти полностью замещены своими хлорпроизводными.

Хлорирование природных жирных кислот происходит при помощи галогенирующих ферментов, включая хлоропероксидазы и хлорирующие галогеназы [44]. В результате активности таких ферментов 5Z,9Z-диеновые кислоты *Penares* sp. могли превратиться в соответствующие 9-хлор-кислоты (I–IV), являющиеся первыми представителями хлорированных демоспонгиевых кислот. Цитотоксичные пеназин А (XIII) и бис-метилен-разделенными *цис*-двойными связями и его хлорпроизводное, пеназин В (XIV) из японского образца губки рода *Penares* [17], могут рассматриваться как субстрат и продукт аналогичного хлорирования (рис. 4). Признаком функционирования галогенирующего фермента, приводящего к выработке хлорноватистой кислоты HClO, можно также считать одновременное присутствие в изученном нами образце *Penares* sp. тритерпеноида (XV) и его хлоргидринового производного (XVI) (рис. 4), структуры которых были установлены ранее [9]. Вероятно, катализируемое соответствующим фермен-

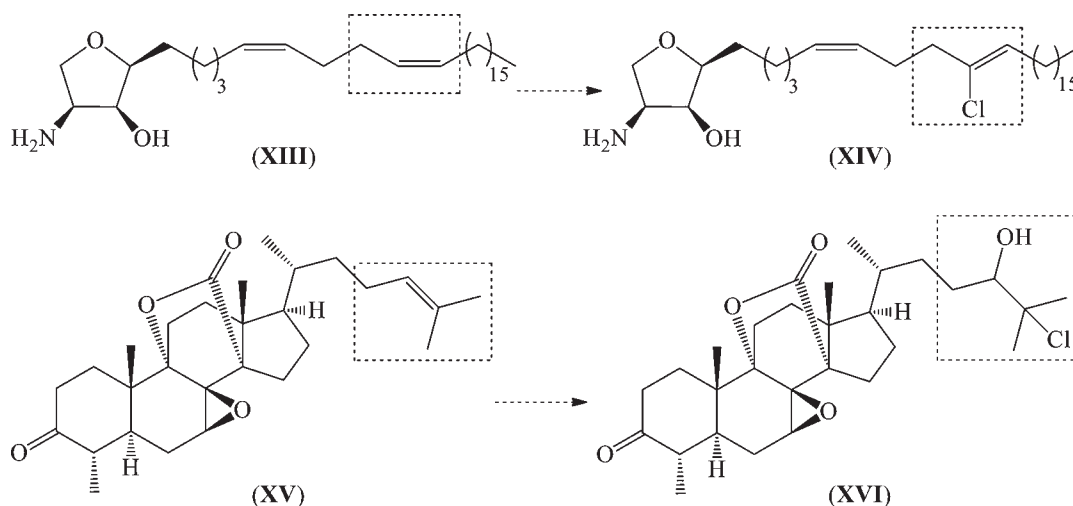


Рис. 4. Гипотетические пути образования хлорированных вторичных метаболитов (XIV) и (XVI), полученных из губок рода *Penares*.

том присоединение галогена к С6 Δ5-кислот, обычных для многих морских губок [2, 5], могло вызвать сдвиг двойной связи по аналогии с липоксигеназным гидропероксидированием и привести к образованию аллильно хлорированных Δ4-кислот (V–VII).

Галогенирующие ферменты в клетках губок не обнаруживали, зато гены галогеназ (в частности, по некоторым признакам принадлежащих ряду бактерий) были найдены в микробиальных метагеномах, полученных из губок с высоким содержанием микроорганизмов [45]. Судя по доле компонентов бактериального происхождения в изученной смеси ЖК из *Penares* sp., содержание бактерий в данной губке было действительно велико, что могло обеспечить галогенирование ЖК и других метаболитов. Не исключено также, что за данное галогенирование могли быть ответственны не только ассоциированные с губкой бактерии (включая цианобактерии или сине-зеленые водоросли), но и грибы [46]. В случае *Penares* sp. микробиальные хлорирующие ферменты, очевидно, “предпочитали” в качестве субстрата алифатические цепи с двойными связями, что привело к образованию кислот (I–VII). При этом активность бромирующих ферментов также имела место в изученном нами образце *Penares* sp., т.к. из него, кроме тритерпеноидов [9], были прежде выделены индольные алкалоиды с бромом в ароматическом кольце [10]. Очевидно, несмотря на существование механизма бромирования, микробы *Penares* sp. использовали хлорирование, а не бромирование демоспонгиевых кислот в отличие от микроорганизмов, ассоциированных с другими губками.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование. Спектры ^1H -ЯМР, ^1H , ^1H -COSY, HSQC и HMBC (CDCl_3) регистрировали на спектрометрах Avance III HD 500 (Bruker, Германия) и Avance III 700 (Bruker BioSpin, Германия) при 500.13 и 700.13 МГц соответственно с тетраметилсилианом в качестве внутреннего стандарта.

ГЖХ-МС-анализ выполняли на хромато-масс-спектрометре HP6890 GC System (Hewlett-Packard, США) с капиллярной колонкой HP-5MS (30.0 м × 0.25 мм; J&W Scientific, США), гелием в качестве

газа-носителя и ионизирующим потенциалом 70 eV. В большинстве случаев использовали программу 100°C (1 мин) – 10°C/мин – 280°C (30 мин) при температуре инжектора 270°C, однако для малолетучих пирролидидов длинноцепочечных ЖК применяли программу 200°C (1 мин) – 30°C/мин – 280°C (45 мин) при температуре инжектора 300°C. ВЭЖХ выполняли на жидкостных хроматографах: 1) Du Pont Series 8800 Instrument (DuPont, США) с рефрактометром RIDK-102 (Laboratni Pstroje, Чехословакия) и колонкой ZORBAX Eclipse XDB-C8 (4 × 150 мм; Agilent Technologies, США) в 85%-ном этаноле; 2) Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, США) с дифференциальным рефрактометром RID-G1362A и колонками ULTRASPHERA™ Si (10 × 250 мм; Beckman Instruments, США) в смеси петролейного эфира и этилацетата (100 : 1) и YMC-Pack ODS-A (10 × 250 мм; YMC Co., Япония) в этаноле.

Колоночную хроматографию проводили на сефадексе LH-20 (Sigma Chemical Co., США) и силикагеле (50/100 или 50/160 мкм; Сорбполимер, Россия). Для качественного анализа использовали тонкослойную хроматографию на пластинках Sorbfil (Сорбполимер, Россия) с закрепленным на фольге слоем силикагеля СТХ-1А, пятна веществ проявляли опрыскиванием смесью EtOH–H₂SO₄ (1 : 1).

Биологический материал. Образец губки рода *Penares* был собран с помощью драгирования с глубины 95 м в Южно-Китайском море (16°07' N, 114°47' E) в январе 2005 г. в течение 30-го рейса НИС “Академик Опарин” во Вьетнам. Губка была идентифицирована В.Б. Красохиним (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток, Россия). Образец (PIBOS O30-271) находится на хранении в коллекции Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН.

Экстракция губки и выделение фракций ЖК и их этиловых эфиров. Свежесобранную губку *Penares* sp. (400 г) замораживали и хранили при –20°C. Затем губку измельчали и экстрагировали этанолом при комнатной температуре. Этанольный экстракт концентрировали в вакууме до водного остатка, который экстрагировали гексаном (3 × 250 мл). Гексановый

экстракт (2.92 г), содержащий неполярные и мало-полярные соединения губки, разделяли на фракции на колонке с сефадексом LH-20 в CHCl_3 -EtOH (1 : 1), в результате получили фракцию (346.4 мг), содержащую близкие по размеру молекулы ЖК и их этиловых эфиров. Поскольку данные соединения различаются по полярности, для их разделения полученную фракцию хроматографировали на колонке с силикагелем. Сумму веществ (26.9 мг), которая элюировалась в гексане-этилацетате (70 : 1) с силикагеля, разделяли с помощью ВЭЖХ на прямой (петролейный эфир-этилацетат, 100 : 1) и обращенной (этанол) фазах. Получили 1.5 мг смеси этиловых эфиров (IIa) и (IIIa). Сумму веществ (147.9 мг), которая элюировалась в гексане-этилацетате (5 : 1 → 2 : 1) с силикагеля, разделили с помощью ВЭЖХ на обращенной фазе (85%-ный этанол) и получили фракции ЖК.

Этиловые эфиры (IIa) и (IIIa) (39 и 31% в ВЭЖХ-фракции соответственно). Бесцветное маслообразное вещество. Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3 , 700 МГц; δ , м.д. (J , Гц)): 5.44 (т, J 7.0, H-10), 5.37 (м, H-5), 5.36 (м, H-6), 4.13 (кв, J 7.1, $-\text{OCOCH}_2\text{CH}_3$), 2.325 (т, J 7.3, CH_2 -8), 2.30 (т, J 7.5, CH_2 -2), 2.27 (м, CH_2 -7), 2.145 (м, CH_2 -11), 2.09 (м, CH_2 -4), 1.69 (м, CH_2 -3), 1.515 (м, H-25, (IIa)), 1.35–1.20 (м, CH_2 -пул), 1.32 (м, H-25b, (IIIa)), 1.30 (м, H-24, (IIIa)), 1.26 (м, H-23b, (IIIa)), 1.255 (т, J 7.1, $-\text{OCOCH}_2\text{CH}_3$), 1.15 (м, CH_2 -24, (IIa)), 1.12 (м, H-25a, (IIIa)), 1.08 (м, H-23a, (IIIa)), 0.86 (д, J 6.7, CH_3 -27, 26, (IIa)), 0.85 (т, J 7.1, CH_3 -26, (IIIa)), 0.84 (д, J 6.2, CH_3 -27, (IIIa)). Спектр ^{13}C -ЯМР (CDCl_3 ; значения δ , м.д., получены через C/H-корреляции в спектрах HSQC и HMBC): 173.8 (C-1), 134.1 (C-9), 129.6 (CH-5), 129.0 (CH-6), 126.05 (CH-10), 60.2 ($-\text{OCOCH}_2\text{CH}_3$), 39.4 (CH₂-8), 39.0 (CH₂-24, (IIa)), 36.6 (CH₂-23, (IIIa)), 34.4 (CH-24, (IIIa)), 33.7 (CH₂-2), 30.0–28.5 (CH₂-пул), 29.4 (CH₂-25, (IIIa)), 28.65 (CH₂-12), 28.5 (CH₂-11), 28.0 (CH-25, (IIa)), 26.6 (CH₂-4), 25.25 (CH₂-7), 24.85 (CH₂-3), 22.6 (CH₃-26, 27, (IIa)), 19.2 (CH₃-27, (IIIa)), 14.2 ($-\text{OCOCH}_2\text{CH}_3$), 11.3 (CH₃-26, (IIIa)). Масс-спектр этилового эфира (5Z,9Z)-9-хлор-25-метил-5,9-гексакозадиеновой кислоты (IIa) (ЭУ, 70 эВ), m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 468 [M]⁺ (0.04), 432/433 [$M - \text{HCl}/M - \text{Cl}$]⁺ (16/14), 422/424 [$M - \text{EtOH}$]⁺ (2/0.7),

417 [$M - \text{HCl} - \text{CH}_3$]⁺ (0.7), 405/407 [$M - \text{EtO} - \text{H}_2\text{O}$]⁺ (0.7/0.2), 387 [$M - \text{Cl} - \text{EtOH}$]⁺ (16), 369 [$M - \text{HCl} - \text{EtO} - \text{H}_2\text{O}$]⁺ (5), 345 [$M - 88 - \text{Cl}$]⁺ (6), 312/314 (6/2), 276 (3), 154/155 (51/45), 109 (61), 95 (28), 88 (24), 81 (100), 67 (54), 55/57 (36/34). Масс-спектр этилового эфира (5Z,9Z)-9-хлор-24-метил-5,9-гексакозадиеновой кислоты (IIIa) (ЭУ, 70 эВ), m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 468 [M]⁺ (0.02), 432/433 [$M - \text{HCl}/M - \text{Cl}$]⁺ (16/14), 422/424 [$M - \text{EtOH}$]⁺ (2/0.7), 405/407 [$M - \text{EtO} - \text{H}_2\text{O}$]⁺ (0.7/0.2), 403 [$M - \text{HCl} - \text{CH}_3$]⁺ (0.8), 387 [$M - \text{Cl} - \text{EtOH}$]⁺ (16), 369 [$M - \text{HCl} - \text{EtO} - \text{H}_2\text{O}$]⁺ (6), 345 [$M - 88 - \text{Cl}$]⁺ (6), 312/314 (5/1.7), 276 (4), 154/155 (52/44), 109 (61), 95 (29), 88 (24), 81 (100), 67 (56), 55/57 (39/49).

Получение производных ЖК. Пирролидиновые производные (пирролидины) были получены обработкой ЖК *N,O*-бис(триметилсилил)трифторацетамидом (Alfa Aesar, США) и пирролидином (Aldrich, Германия) при комнатной температуре [47], перед анализом реакционную смесь концентрировали в вакууме. Свободные ЖК этилировали *N*-нитрозо-*N*-этилмочевинной (Sigma, Германия). Для получения диметилдисульфидных аддуктов этиловые эфиры ЖК обрабатывали диметилдисульфидом (Sigma-Aldrich, Франция) по методике, описанной Christie [48], однако после остановки реакции водным раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ реакционную смесь экстрагировали гексаном (5 × 0.5 мл), гексановый экстракт перед анализом высушивали в вакууме. 4,4-Диметиллоксазолиновые производные получали реакцией с 2-амино-2-метил-1-пропанолом в пиридине в присутствии борогидрида натрия (все реагенты Sigma-Aldrich, Германия) [49]. Гидрирование (3–5.5 ч) проводили над катализатором Адамса в этаноле.

Масс-спектры производных новых ЖК приведены в дополнительных материалах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием ГЖХ-МС и, в отдельных случаях, спектроскопии ^1H - и ^{13}C -ЯМР впервые выполнен структурный анализ жирных кислот губки рода *Penares*. Обнаружена 71 кислота с длиной цепи от C_{12} до C_{28} , в том числе 12 новых соединений. Неизвестные ранее (5Z,9Z)-9-хлор-5,9-диеновые кислоты представляют первые примеры хлорированных демо-

спонгиевых кислот. Особенности изученной смеси ЖК – высокое содержание компонентов с моно-метилированными цепями (>50%) и почти полное замещение обычных демоспонгиевых кислот их хлор-производными, предположительно, благодаря деятельности хлорирующих ферментов микроорганизмов, ассоциированных с губкой.

Данные анализа ЖК *Penares* sp. не только расширяют наши знания о разнообразии биомолекул, но и способствуют пониманию происхождения структурных особенностей некоторых вторичных метаболитов губок рода.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Дальневосточного центра структурных молекулярных исследований (ЦСМИ) Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения РАН (спектроскопия ЯМР и масс-спектрометрия).

Авторы выражают благодарность О.П. Моисеенко, к.х.н. Л.П. Пономаренко и Е.Г. Ляховой за помощь в анализе ГЖХ-МС и в выделении этиловых эфиров ЖК. Авторы признательны академику В.А. Стонику за полезное обсуждение ряда вопросов, изложенных в данной работе. Авторы также благодарны к.х.н. В.А. Денисенко и В.В. Исакову и операторам Н.В. Звягинцеву и Д.В. Денисенко за регистрацию спектров ЯМР.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-03-00014).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dembitsky V.M., Rezanka T., Srebnik M.* // Chem. Phys. Lipids. 2003. V. 123. P. 117–155.
[https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(03\)00020-3](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(03)00020-3)
2. *Родькина С.А.* // Биол. моря. 2005. Т. 31. С. 387–397. [*Rodkina S.A.* // Russ. J. Mar. Biol. 2005. V. 31. P. S49–S60].
<https://doi.org/10.1007/s11179-006-0015-3>
3. *Bergé J.-P., Barnathan G.* // In: Marine Biotechnology I. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology/ Eds. Ulber R., Le Gal Y. Berlin, Heidelberg: Springer, 2005. V. 96. P. 49–125.
<https://doi.org/10.1007/b135782>
4. *Řezanka T., Sigler K.* // Prog. Lipid Res. 2009. V. 48. P. 206–238.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.03.003>
5. *Manjari Mishra P., Sree A., Panda P.K.* // In: Springer Handbook of Marine Biotechnology / Ed. Kim S.K. Berlin, Heidelberg: Springer, 2015. P. 851–868.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-53971-8_36
6. *Kornprobst J.-M., Barnathan G.* // Mar. Drugs. 2010. V. 8. P. 2569–2577.
<https://doi.org/10.3390/md8102569>
7. *Dembitsky V.M., Srebnik M.* // Prog. Lipid Res. 2002. V. 41. P. 315–367.
[https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(02\)00003-6](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(02)00003-6)
8. *Hwang B.S., Lee K., Yang C., Jeong E.J., Rho J.-R.* // J. Nat. Prod. 2013. V. 76. P. 2355–2359.
<https://doi.org/10.1021/np400793r>
9. *Lyakhova E.G., Kolesnikova S.A., Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Nam N.H., Stonik V.A.* // Steroids. 2015. V. 96. P. 37–43.
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.01.009>
10. *Lyakhova E.G., Kolesnikova S.A., Kalinovsky A.I., Afiyatullof Sh.Sh., Dyshlovoy S.A., Krasokhin V.B., Minh Ch.V., Stonik V.A.* // Tetrahedron Lett. 2012. V. 53. P. 6119–6122.
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.08.148>
11. *Kobayashi J., Cheng J.-F., Ishibashi M., Wälchli M.R., Yamamura Sh., Ohizumi Y.* // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1. 1991. P. 1135–1137.
<https://doi.org/10.1039/P19910001135>
12. *Alvi Kh.A., Jaspars M., Crews Ph., Strulovici B., Oto E.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994. V. 4. P. 2447–2450.
[https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)80407-8](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)80407-8)
13. *Nakao Y., Maki T., Matsunaga Sh., van Soest R.W.M., Fusetani N.* // J. Nat. Prod. 2004. V. 67. P. 1346–1350.
<https://doi.org/10.1021/np049939e>

14. Takada K., Uehara T., Nakao Y., Matsunaga Sh., van Soest R.W.M., Fusetani N. // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. P. 187–193.
<https://doi.org/10.1021/ja037368r>
15. Fujita M., Nakao Y., Matsunaga Sh., Seiki M., Itoh Y., van Soest R.W.M., Fusetani N. // *Tetrahedron*. 2001. V. 57. P. 1229–1234.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(00\)01128-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(00)01128-5)
16. Ushio-Sata N., Matsunaga Sh., Fusetani N., Honda K., Yasumuro K. // *Tetr. Lett.* 1996. V. 37. P. 225–228.
[https://doi.org/10.1016/0040-4039\(95\)02134-5](https://doi.org/10.1016/0040-4039(95)02134-5)
17. Ando H., Ueoka R., Okada Sh., Fujita T., Iwashita T., Imai T., Yokoyama T., Matsumoto Y., van Soest R.W.M., Matsunaga Sh. // *J. Nat. Prod.* 2010. V. 73. P. 1947–1950.
<https://doi.org/10.1021/np1003565>
18. Bergquist P.R., Lawson M.P., Lavis A., Cambie R.C. // *Biochem. Syst. Ecol.* 1984. V. 12. P. 63–84.
[https://doi.org/10.1016/0305-1978\(84\)90012-7](https://doi.org/10.1016/0305-1978(84)90012-7)
19. Lawson M.P., Bergquist P.R., Cambie R.C. // *Biochem. Syst. Ecol.* 1984. V. 12. P. 375–393.
[https://doi.org/10.1016/0305-1978\(84\)90070-X](https://doi.org/10.1016/0305-1978(84)90070-X)
20. Будзикевич Г., Джерасси К., Уильямс Д. // Интерпретация масс-спектров органических соединений / Под ред. Вульфсона Н.С. Москва: Мир, 1966. 323 с.
21. The LipidWeb. Mass Spectrometry of Alkyl Esters. Ethyl Esters of Fatty Acids.
<https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/index.php?page=ms/others/others-arch/index.htm>
22. The LipidWeb. Mass Spectra of Fatty Acid Alkyl Esters – Archive. Ethyl esters of fatty acids.
<https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/index.php?page=ms/others/others-arch/index.htm>
23. The LipidWeb. Mass Spectrometry of Fatty Acid Pyrrolidides. Dienoic fatty acids. Part 2. Conjugated and Bis- and Polymethylene-Interrupted Dienes.
<https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/index.php?page=ms/pyrrolidides/pyrrol-2db-2/index.htm>
24. The LipidWeb. Mass Spectrometry of DMOX Derivatives. Dienoic fatty acids. Part 2. Conjugated and Bis- and Polymethylene-Interrupted Dienes.
https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb_html/ms/dmox/dmox-2db-2/index.htm
25. The LipidWeb. Mass Spectrometry of Fatty Acid Pyrrolidides. Saturated Branched-Chain Fatty Acids.
https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb_html/ms/pyrrolidides/pyrrol-sbr/index.htm
26. The LipidWeb. Pyrrolidine Derivatives of Fatty Acids. Archive of Mass Spectra.
<https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/index.php?page=ms/pyrrolidides/pyrrol-arch/index.htm>
27. Santalova E.A., Denisenko V.A. // *Nat. Prod. Commun.* 2017. V. 12. P. 1913–1916.
<https://doi.org/10.1177/1934578X1701201225>
28. Dérien S., Klein H., Bruneau Ch. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2015. V. 54. P. 12112–12115.
<https://doi.org/10.1002/anie.201505144>
29. Gunstone F.D. // *Chem. Phys. Lipids.* 1993. V. 65. P. 155–163.
[https://doi.org/10.1016/0009-3084\(93\)90049-9](https://doi.org/10.1016/0009-3084(93)90049-9)
30. Akasaka K., Shichijukari S., Meguro H., Ohru H. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002. V. 66. P. 1719–1722.
<https://doi.org/10.1271/bbb.66.1719>
31. Santalova E.A., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S. // *Molecules*. 2020. V. 25. P. 6047.
<https://doi.org/10.3390/molecules25246047>
32. Andersson B.A. // *Prog. Chem. Fats Other Lipids.* 1978. V. 16. P. 279–308.
[https://doi.org/10.1016/0079-6832\(78\)90048-4](https://doi.org/10.1016/0079-6832(78)90048-4)
33. Santalova E.A., Denisenko V.A. // *Lipids*. 2017. V. 52. P. 73–82.
<https://doi.org/10.1007/s11745-016-4214-1>
34. Knothe G. // *Lipids*. 2006. V. 41. P. 393–396.
<https://doi.org/10.1007/s11745-006-5110-x>
35. Zhang J.Y., Yu Q.T., Huang Z.H. // *J. Mass Spectrom. Soc. Japan*. 1987. V. 35. P. 23–30.
<https://doi.org/10.5702/massspec.35.23>
36. The LipidWeb. Mass Spectrometry of Dimethylloxazoline and Pyrrolidine Derivatives. Cyclic Fatty Acids.
<https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/index.php?page=ms/dmox/dmox-cyclic/index.htm>
37. The LipidWeb. Mass Spectrometry of Methyl Esters. Saturated Branched-Chain Fatty Acids.
<https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/index.php?page=ms/methesters/me-0dbbr/index.htm>

38. The LipidWeb. Unesterified (Free) Fatty Acids. <https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/index.php?page=lipids/simple/ffa/index.htm>
39. Thiel V., Jenisch A., Wörheide G., Löwenberg A., Reitner J., Michaelis W. // *Org. Geochem.* 1999. V. 30. P. 1–14. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(98\)00200-9](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(98)00200-9)
40. The LipidWeb. Fatty Acids: Branched-Chain. <https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/index.php?page=lipids/fa-eic/fa-branc/index.htm>
41. The LipidWeb. Fatty Acids: Natural Cyclic. <https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/index.php?page=lipids/fa-eic/fa-cycl/index.htm>
42. Reiswig H.M. // *Mar. Ecol.* 1981. V. 2. P. 273–293. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.1981.tb00271.x>
43. Hedrick D.B., Peacock A.D., Long Ph., White D.C. // *Lipids.* 2008. V. 43. P. 843–851. <https://doi.org/10.1007/s11745-008-3206-1>
44. Fejzagić A.V., Gebauer J., Huwa N., Classen T. // *Molecules.* 2019. V. 24. P. 4008. <https://doi.org/10.3390/molecules24214008>
45. Bayer K., Scheuermayer M., Fieseler L., Hentschel U. // *Mar. Biotechnol.* 2013. V. 15. P. 63–72. <https://doi.org/10.1007/s10126-012-9455-2>
46. Wang J., Pang X., Chen Ch., Gao Ch., Zhou X., Liu Y., Luo X. // *Chin. J. Chem.* 2022. V. 40. P. 1729–1750. <https://doi.org/10.1002/cjoc.202200064>
47. Vetter W., Walther W. // *J. Chromatogr. A.* 1990. V. 513. P. 405–407. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)89466-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)89466-8)
48. The LipidWeb. Mass Spectrometry of Methyl Esters. Derivatization of Double Bonds in Fatty Acids for Structural Analysis. <https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/index.php?page=ms/methesters/me-dbderivs/index.htm>
49. Santalova E.A., Svetashev V.I. // *Nat. Prod. Commun.* 2022. V. 17. P. 1–8. <https://doi.org/10.1177/1934578X221131408>

9-Chloro-5,9-dienoic and Other Fatty Acids from Marine Sponge *Penares* sp.

E. A. Santalova*,[#] and S. A. Kolesnikova*

[#]Phone: +7 (423) 231-11-68; e-mail: santalova@piboc.dvo.ru

* G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Branch of Russian Academy of Sciences, prosp. 100 let Vladivostoku 159, Vladivostok, 690022 Russia

The fatty acids and their ethyl esters from an extract of a sponge *Penares* sp. (South China Sea) were fractionated by high-performance liquid chromatography and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry using pyrrolidine, 4,4-dimethyloxazoline, dimethyl disulfide, and hydrogenated derivatives. In some cases, ¹H and ¹³C NMR spectroscopy was applied for the structural analysis of fatty acids. 71 C₁₂–C₂₈ acids, including 12 new compounds, were found. The new compounds were shown to be (5Z,9Z)-9-chloro-24-methyl-5,9-pentacosadienoic, (5Z,9Z)-9-chloro-25-methyl-5,9-hexacosadienoic, (5Z,9Z)-9-chloro-24-methyl-5,9-hexacosadienoic, (5Z,9Z)-9-chloro-25-methyl-5,9-heptacosadienoic, 6-chloro-20-methyl-4-heneicosenoic, 6-chloro-19-methyl-4-heneicosenoic, 6-chloro-20-methyl-4-docosenoic, *cis*-17,18-methylene-tetracosanoic, 16,21-dimethyldocosanoic, 18,23-dimethyltetracosanoic, 16,18,22-trimethyltricosanoic, and 18,20,24-trimethylpentacosanoic acids. It was shown that the characteristic features of the fatty acid mixture were a high level of constituents with monomethylated chains (over 50%) and the nearly total substitution of common demospongiac acids for their chloro-derivatives, previously unknown (5Z,9Z)-9-chloro-5,9-dienoic acids. The presence of analogous structural fragments in the fatty acids from *Penares* sp. and in some biologically active secondary metabolites from *Penares* sponges was discussed. The results of this work may be used for the structural, comparative and biosynthetic studies of marine lipids.

Keywords: sponge, *Penares*, fatty acids, chlorinated fatty acids, demospongiac acids, GC-MS



УДК 577.112.6

ПРОТЕИНАЗНАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ КАРНОЗИНА, ПИРРОЛИЛКАРНОЗИНА И САЛИЦИЛКАРНОЗИНА

© 2024 г. К. В. Шевченко^{*, #}, И. Ю. Нагаев^{*}, О. И. Куликова^{**}, С. Л. Стволинский^{**},
В. П. Шевченко^{*}, Н. Ф. Мясоедов^{*}

^{*} Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт” (НИЦ “Курчатовский институт”),
Россия, 123182 Москва, пл. Курчатова, 2

^{**} ФГБНУ “Научный центр неврологии” (ФГБНУ НЦН),
Россия, 125367 Москва, Волоколамское шоссе, 80

Поступила в редакцию 14.07.2023 г.

После доработки 10.08.2023 г.

Принята к публикации 11.08.2023 г.

Проведена оценка устойчивости карнозина, пирролилкарнозина (ПК) и салицилкарнозина (СК) к действию лейцинаминопептидазы, карбоксипептидазы В и У. Установлено, что протеолиз карнозина, ПК и СК под действием лейцинаминопептидазы не происходит. Карбоксипептидазы В и У, а также ферментная система плазмы крови и плазматических мембран клеток головного мозга крысы в разной степени деградировали пептиды, содержащие β-аланиловый, N-пирролиловый и N-салициловый фрагменты. Во всех случаях образовывался гистидин. Образования пиррола или салициловой кислоты не происходило. Установлено, что карнозин, ПК и СК проявляли высокую устойчивость к действию амино- и карбоксипептидаз в экспериментах *in vitro*.

Ключевые слова: дипептиды, пептидазы, протеолиз, карнозин, пирролилкарнозин, салицилкарнозин

DOI: 10.31857/S0132342324020042, **EDN:** ONHXKY

ВВЕДЕНИЕ

Биоактивные белки и пептиды с различными биологическими свойствами рассматриваются как новые терапевтические молекулы для применения в медицине [1]. Среди них значительный интерес привлекает группа гистидин-содержащих дипептидов (ГСД), из которых наиболее изучен β-аланил-L-гистидин (карнозин). Карнозин характеризуется как прямым, так и непрямым антиоксидантным действием, обладает свойствами молекулярного шаперона и тканевого рН-буфера, хелатора ионов двухвалентных металлов [2]. Имеются ограниченные данные о протективном действии карнозина при диабетических осложнениях, катарактогенезе, нейродегенеративных

заболеваниях, раке, возраст-зависимых патологиях [3]. Однако широкого распространения в клинической практике карнозин и другие ГСД не получили, что обусловлено их быстрым выведением из организма благодаря активному гидролизу специфическими пептидазами – карнозиназами: CN1 (ЕС 3.4.13.20 – сывороточная карнозиназа человека) и CN2 (ЕС 3.4.13.18 – тканевая карнозиназа человека) [4].

Были синтезированы новые производные карнозина: N-салицилкарнозин ([3-(N-салицил)-пропаноил-L-гистидин], СК) [5] и N-пирролилкарнозин ([3-(N-пирролил)-пропаноил-L-гистидин], ПК) [6], обладающие антиоксидантным, цитопротекторным и нейропротекторным действием (схема 1).

Сокращения: ПК – пирролилкарнозин; СК – салицилкарнозин; ГСД – гистидин-содержащие дипептиды; МФМК – микросомальная фракция мозга крысы; PMSF – фенилметилсульфонилфторид.

[#]Автор для связи: (тел.: +7 (499)196-02-16; эл. почта: ATCarma@mail.ru).

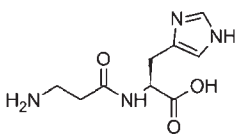
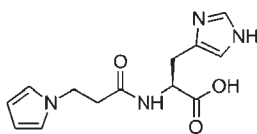
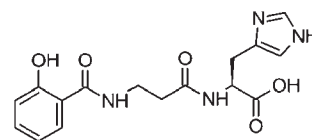
Карнозин (β -аланил-L-гистидин)ПК [3-(*N*-пирролил)-пропаноил-L-гистидин]СК [3-(*N*-салицил)-пропаноил-L-гистидин]

Схема 1. Структурные формулы карнозина (β -аланил-L-гистидина), пирролилкарнозина ([3-(*N*-пирролил)-пропаноил-L-гистидина]) и салицилкарнозина ([3-(*N*-салицил)-пропаноил-L-гистидина]).

Выбор салициловой кислоты и пиррола для получения конъюгатов с карнозином был обусловлен широким применением этих соединений и их производных в качестве эффективных лекарственных препаратов с широким спектром действия [7, 8].

Ранее по методу Pegova et al. [9] была исследована устойчивость карнозина, ПК и СК к действию сывороточной карнозины. Показано, что ПК и СК более устойчивы к гидролизу по сравнению с карнозином, который полностью деградирует в течение 3 ч. За это время содержание ПК и СК уменьшалось на несколько процентов [5, 6].

При гидролизе дипептидов под воздействием как амино-, так и карбоксипептидаз образуются аналогичные продукты: гистидин и модифицированный β -аланиловый фрагмент, поэтому необходимо было установить не только устойчивость карнозина, ПК и СК в этих условиях, но и основной путь их деградации, а также выяснить, как разные модификации *N*-концевой аминокислоты влияют на гидролиз связи между гистидином и модифицированным β -аланиловым фрагментом молекулы пептида.

Таким образом, целью данной работы была оценка устойчивости карнозина, ПК и СК к действию очищенных амино- и карбоксипептидаз, а также ферментной системы плазмы крови и микросомальной фракции мозга крысы (МФМК).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пептиды (карнозин, ПК и СК) инкубировали в фосфатно-солевом буфере в присутствии микросомальной лейцинаминопептидазы (ЕС 3.4.11.2),

карбоксипептидазы В (ЕС 3.4.17.2), карбоксипептидазы Y (ЕС 3.4.16.1), ферментной системы плазмы крови и МФМК. Такой набор пептидаз использовали при оценке устойчивости разных пептидов [10]. Этим методом тестируют, как правило, пептиды до 10 а.о.: 5-оксо-Pro-His-Pro-NH₂, 5-оксо-Pro-Arg-Pro, Pro-Gly-Pro-Leu, His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro, семакс (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro) и его аналоги [11].

Эксперименты с высокоспецифичным ферментом лейцинаминопептидазой показали, что данный фермент неэффективен для протеолиза карнозина, ПК и СК. Эти соединения оказались устойчивы к действию лейцинаминопептидазы в течение нескольких суток.

Оценка протеолиза карнозина, ПК и СК под действием карбоксипептидаз В и Y приведена в табл. 1. Для оценки воспроизводимости были проведены три серии экспериментов. Доверительный интервал рассчитывали, исходя из доверительной вероятности более 0.95.

Как видно из табл. 1, карбоксипептидазы В и Y в разной степени гидролизовали пептиды, содержащие β -аланиловый, *N*-пирролиловый и *N*-салициловый фрагменты.

В присутствии карбоксипептидазы Y карнозин деградировал в наибольшей степени (после 120 ч в реакционной смеси присутствовал 31% карнозина). Устойчивость ПК и СК была практически одинаковой и в ~2 раза превышала устойчивость карнозина. Карнозин не подвергался гидролизу карбоксипептидазой В, в то время как ПК за 120 ч полностью распадался на гистидин и *N*-пирролиловую часть.

Таблица 1. Протеолиз дипептидов под действием карбоксипептидаз В и У

Пептид	Время, ч				
	1	2	24	50	120
Карбоксипептидаза У					
Карнозин	94.6 ± 1.3	90.9 ± 1.5	76.5 ± 1.7	59.0 ± 2.0	31.0 ± 3.0
ПК	99.1 ± 0.8	98.1 ± 0.7	95.6 ± 0.9	86.3 ± 1.6	74.0 ± 2.0
СК	99.3 ± 0.4	98.3 ± 0.6	93.4 ± 0.8	86.3 ± 1.2	72.4 ± 1.5
Карбоксипептидаза В					
Карнозин	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
ПК	94.1 ± 0.4	92.9 ± 1.6	42.8 ± 1.7	9.3 ± 1.2	0.0
СК	98.6 ± 0.6	96.2 ± 0.9	89.7 ± 0.6	74.2 ± 1.4	11.1 ± 1.1

Приведено остаточное содержание карнозина, ПК и СК в инкубационной смеси в % от исходного количества.

* Доверительный интервал подсчитан для серии из трех повторов, исходя из доверительной вероятности $p > 0.95$.

Более устойчивым по сравнению с ПК оказался СК (после 120 ч в реакционной смеси оставалось 11.1% СК).

Также была исследована устойчивость карнозина, ПК и СК в присутствии плазмы крови и МФМК (табл. 2). При анализе проб, полученных при работе с плазмой крови и МФМК, число повторных измерений увеличили до 5 раз.

Полученные данные показали, что в присутствии плазмы крови к завершению срока инкубации (к 120 ч) содержание карнозина в инкубационной среде оказалось значительно ниже, чем ПК и СК, как это наблюдалось и при использовании карбоксипептидазы У. Можно предположить, что гидролиз карнозина, ПК и СК в основном определяется действием такого рода карбоксипептидаз. В мозге крыс присутствует другой набор ферментов, который относительно быстро полностью гидролизует карнозин к 24 ч инкубации, в то время как ПК полностью гидролизировался только к 120 ч, а СК оказался устойчив к действию этой ферментной системы. По-видимому, пирролиловый и особенно салициловый фрагмент этих пептидов препятствуют протеазной активности ферментов МФМК.

Хромато-масс-спектрометрический анализ реакционных смесей показал, что среди продуктов ферментативного гидролиза содержатся 3-(*N*-пирролил)-пропионовая кислота и *N*-салицил-β-аланин, образующиеся при отщеплении гистидина от исходных ПК и СК (табл. 3). Их структура дополнительно под-

тверждается масс-спектрами фрагментации в условиях ионных соударений при 35 эВ. Образования пиррола или салициловой кислоты не происходило.

Таким образом, карнозин, ПК и СК проявляли высокую устойчивость к действию ферментных систем плазмы крови, отдельных амино- и карбоксипептидаз в экспериментах *in vitro* (табл. 1, 2). Присутствие карнозина, ПК и СК в реакционной среде обнаруживалось в течение нескольких суток. В присутствии ферментной системы плазмы крови и МФМК гидролиз карнозина происходит эффективней, чем ПК и СК (табл. 2). В результате гидролиза происходит отщепление гистидина, при этом образования пиррола или салициловой кислоты не происходит.

Полученные результаты в совокупности с ранее опубликованными нами данными указывают на перспективность модификации природных гистидинсодержащих дипептидов по *N*-концевой аминокислоте (β-аланину) с целью повышения биодоступности таких соединений и открывают путь дальнейшим исследованиям возможности их применения в клинической практике.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и ферменты. Лейцинаминопептидаза (ЕС 3.4.11.2, Sigma-Aldrich, США, тип VI, микросомальная из почки свиньи, 9.2 ед. акт./мг), карбоксипептидаза У (ЕС 3.4.16.1, Sigma-Aldrich, из хлебо-

Таблица 2. Протеолиз дипептидов под действием ферментной системы плазмы крови и МФМК

Пептид	Время, ч				
	1	2	24	50	120
Ферментная система плазмы крови					
Карнозин	100.0	100.0	94.0 ± 0.7	78.2 ± 1.4	61.0 ± 2.5
ПК	100.0	100.0	100.0	98.0 ± 1.6	90.0 ± 1.8
СК	100.0	100.0	100.0	96.0 ± 1.5	87.0 ± 1.8
Ферментная система МФМК					
Карнозин	74.3 ± 1.7	65.4 ± 1.9	0.0	0.0	0.0
ПК	100.0	100.0	52.9 ± 1.6	41.2 ± 2.2	0.0
СК	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

Приведено содержание карнозина, ПК и СК в инкубационной смеси в % от исходного количества.

* Доверительный интервал подсчитан для серии из пяти повторов, исходя из доверительной вероятности $p > 0.95$.

пекарных дрожжей, 17 ед. акт./мг), карбоксипептидаза В (ЕС 3.4.17.2, Sigma-Aldrich, из поджелудочной железы свиньи, 70 ед. акт./мг), необходимые реактивы – коммерческие препараты. Карнозин, ПК и СК предоставлены ФГБНУ “Научный центр неврологии”, Россия.

Анализ состава продуктов протеолиза исследуемых соединений. Анализ реакционных смесей проводили на хроматографе Милихром-А02 (Институт хроматографии “Эконова”, Россия) с использованием колонки ProntoSIL-120-5-C₁₈ AQ (2 × 75 мм, размер частиц 5 мкм) в градиенте метанола в буфере (0.2 М LiClO₄ + 0.005 М HClO₄, pH 2.24) в течение 12 мин при 35°C. Длина волны – 210 нм, скорость подачи элюента – 0.2 мл/мин. Хроматографию проводили в линейном градиенте концентрации метанола 0–20% (система 1, карнозин), 5–20% (система 2, ПК) и 5–100% (система 3, СК). Время удерживания карнозина – 1.49 мин, ПК – 6.80 мин, СК – 5.74 мин.

Масс-спектрометрические данные исходных соединений и продуктов их протеолиза получали на приборе LCQ Advantage MAX (Термоэлектрон, США), с ионизацией электрораспылением, прямым вводом раствора образца с концентрацией 10 мкг/мл в метаноле и дальнейшей фрагментацией молекулярного пика в анализаторе методом ионных соударений при 35 эВ (табл. 3).

На рис. 1 приведена хроматограмма реакционной смеси продуктов гидролиза ПК в присутствии карбоксипептидазы В.

Устойчивость карнозина и его производных в присутствии лейцинаминопептидазы, карбоксипептидаз Y и В. Условия протеолиза под действием лейцинаминопептидазы и карбоксипептидаз подбирали по методике Regova et al. [9], используя в качестве репера семакс (Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Россия). Субстрат-ферментное соотношение в случае лейцин-

Таблица 3. Хромато-масс-спектрометрический анализ исходных пептидов и их метаболитов

Вещество	τ, мин	[M + H] ⁺ _{расч}	[M + H] ⁺ _{эксп}
Карнозин	1.49*	227.11	227.2
ПК	6.80**	276.13	277.2
3-(N-пирролил)-пропионовая кислота	9.65**	140.07	140.1
СК	5.74***	347.14	347.1
N-Салицил-β-аланин	6.88***	210.07	210.2

[M + H]⁺_{расч} – расчетное значение; [M + H]⁺_{эксп} – значение, полученное из масс-спектра (разрешение $m/z \pm 0.2$ Да).

* Система 1; ** система 2; *** система 3.

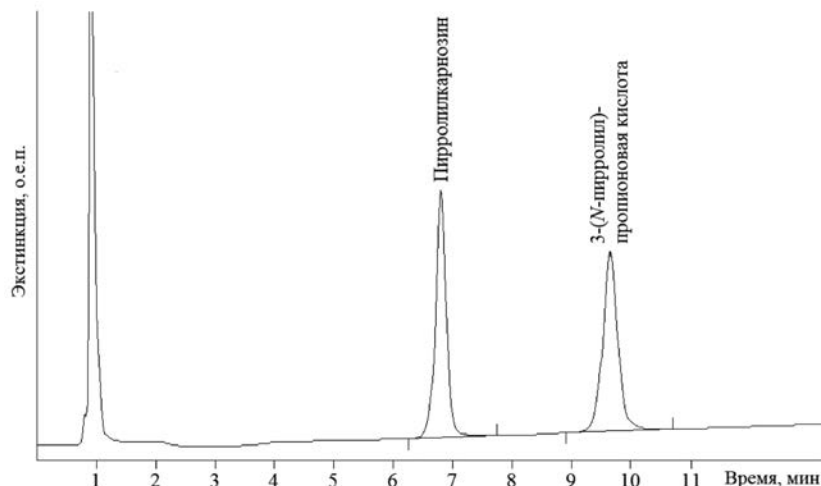


Рис. 1. Хроматограмма реакционной смеси ПК в присутствии карбоксипептидазы В через 24 ч инкубации. ПК (время удерживания 6.80 мин), $[M + H]^+ - 277.2$, метаболит (время удерживания 9.65 мин), $[M + H]^+ - 140.1$.

аминопептидазы составляло 1 мкмоль/ед. акт., в случае карбоксипептидазы Y – 0.092 мкмоль/ед. акт., в случае карбоксипептидазы В – 0.022 мкмоль/ед. акт.

Протеолиз карнозина и его производных проводили по следующей методике. К раствору 0.5 мкмоль субстрата в 280 мкл фосфатно-солевого буфера (27.4 mM NaCl, 0.4 mM KCl, 2 mM Na₃PO₄, pH 7.4) добавляли 0.5 ед. акт. лейцинаминопептидазы, или 5.44 ед. акт. карбоксипептидазы Y, или 22.4 ед. акт. карбоксипептидазы В в этом же буфере. Инкубационную смесь перемешивали и термостатировали при 30°C, отбирая алиquotы по 25 мкл через определенные промежутки времени. Протеолиз останавливали добавлением к отбираемым пробам равного объема метанола. Пробы, отобранные через заданные промежутки времени, анализировали на хроматографе Милихром А-02 (табл. 1).

Выделение плазматических мембран клеток головного мозга крысы. Выделение плазматических мембран проводили при 4°C. Взрослых крыс (самцы, линия Wistar, масса 220 г, 8 крыс, филиал “Столбовая” ФГБУН “Научный центр биомедицинских технологий” ФМБА России) усыпляли диэтиловым эфиром и декапитировали. Кровь собирали из туловища крысы и извлекали головной мозг. Мозг всех 8 крыс промывали холодным фосфатно-солевым

буфером. Полученные образцы гомогенизировали в 80 мл буфера А (10 mM Tris-HCl, pH 7.4 при 4°C, 0.32 M сахараза, 1 mM EDTA, 1 mM бензамидин, 0.1 mM PMSF) в гомогенизаторе тефлон–стекло. Гомогенат центрифугировали в течение 20 мин при 1000 g, осадок отбрасывали, а супернатант повторно центрифугировали при 30 000 g в течение 40 мин. Плотный коричневый осадок на дне пробирки, обогащенный митохондриями, отбрасывали, а супернатант разбавляли в 40 мл буфера А, переносили в чистую пробирку и осаждали мембраны центрифугированием при 40 000 g в течение 40 мин, супернатант удаляли. Остатки супернатанта удаляли, дважды промывая пробирку 20 мл буфера А. По окончании промывок осадок суспендировали в 10 мл буфера А2 (10 mM Tris-HCl, pH 7.4 при 4°C, 0.22 M сахараза), разделяли на порции по 1 мл и замораживали в жидком азоте. Хранили в кельвинаторе при –80°C.

Для получения плазмы крови собранную после декапитации кровь помещали в пробирку, содержащую 20 мкл гепарина (5000 Е/мл), и центрифугировали при комнатной температуре 15 мин при 1500 g. Плазму крови (верхний слой) аккуратно отбирали, перемешивали и разливали в охлажденные микропробирки. Хранили в кельвинаторе при –80°C.

Устойчивость карнозина и его производных в присутствии микросомальной фракции мозга крысы и плазмы крови. Биологическую активность ферментной системы плазмы крови и МФМК тестировали по методике Regova et al. [9]. Подбирали такое количество плазмы крови или МФМК, которое приводило к деградации семакса на 70–80% в течение 1 ч. Протеолиз исследуемых пептидов проводили по следующей методике: к раствору 0.5 мкмоль пептида, приготовленного на 100 мкл фосфатно-солевого буфера (27.4 мМ NaCl, 0.4 мМ KCl, 2 мМ Na₃PO₄, pH 7.4), добавляли 323 мкл раствора плазматических мембран клеток головного мозга крыс (концентрация белка 8.6 мг/мл) или 256 мкл плазмы крови (концентрация белка 70 мг/мл). Инкубационную смесь перемешивали и термостатировали при 30°C, отбирая аликвоты по 60 мкл через определенные промежутки времени. Протеолиз останавливали добавлением к отбираемым пробам равного объема метанола.

Полученные пробы (120 мкл) наносили на патрон, упакованный 20 мг обращенной фазы Lichogrep RP-18, уравновешенной в смеси метанол–вода (1 : 1), с последующим элюированием метанолом с 0.1% трифторуксусной кислоты. При этом на обращенной фазе осаждались высокомолекулярные продукты, а метанольный раствор содержал искомую пептидную фракцию. В результате при анализе реакционных смесей хроматографическая колонка не дезактивировалась. Собранные метанольные растворы упаривали и растворяли в 200 мкл воды. Анализ продуктов реакции проводили методом ВЭЖХ (табл. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что карнозин, ПК и СК проявляют высокую устойчивость к действию лейцинаминопептидазы, карбоксипептидаз В и У, а также к ферментным системам МФМК и плазмы крови в экспериментах *in vitro*. Эти соединения оказались устойчивы к действию лейцинаминопептидазы в течение нескольких суток. В присутствии карбоксипептидазы У карнозин деградировал в наибольшей

степени. Устойчивость ПК и СК была практически одинаковой и в ~2 раза превышала устойчивость карнозина. Карнозин не подвергался гидролизу карбоксипептидазой В, в то время как ПК и СК за 120 ч деградировали на 100 и 89% соответственно. В присутствии ферментной системы плазмы крови и МФМК гидролиз карнозина происходил эффективней, чем ПК и СК. Среди продуктов ферментативного гидролиза содержались 3-(*N*-пирролил)-пропионовая кислота и *N*-салицил-β-аланин, образовавшиеся при отщеплении гистидина от исходных ПК и СК. Образование пиррола или салициловой кислоты не происходило.

Полученные результаты показали, что, во-первых, устойчивость карнозина, ПК и СК к действию лейцинаминопептидазы, карбоксипептидаз В и У высокая. Во-вторых, синтезированные производные карнозина (ПК и СК) менее подвержены протеолизу в присутствии ферментной системы плазмы крови и МФМК, чем исходный карнозин. При этом из производных карнозина (ПК и СК) не образуются салициловая кислота и пиррол. Таким образом, ПК и СК могут рассматриваться как возможные кандидаты для применения в клинической практике.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания по плану НИОКР НИЦ “Курчатовский институт” и в рамках темы №1021052806528-6-1.6.4;3.1.1;3.1.9;3.1.8;3.2.25 “Фундаментальные аспекты нейропластичности в рамках модели трансляционной неврологии” Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Научный центр неврологии”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Экспериментальные процедуры для получения тканей из крыс были одобрены местным комитетом по этике Общества экспериментального ухода за животными (НИЦ “Курчатовский институт”).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Agyei D., Ahmed I., Akram Z., Iqbal H.M.N., Danquah M.K.* // *Protein Pept. Lett.* 2017. V. 24. P. 94–101.
<https://doi.org/10.2174/0929866523666161222150444>
2. *Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W.* // *Physiol. Rev.* 2013. V. 93. P. 1803–1845.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2012>
3. *Hipkiss A.R.* // In: *Advances in Food and Nutrition Research* / Ed. Taylor S.L. Burlington: Academic Press, 2009. V. 57. P. 87–154.
4. *Bellia F., Vecchio G., Rizzarelli E.* // *Molecules.* 2014. V. 19. P. 2299–2329.
<https://doi.org/10.3390/molecules19022299>
5. *Танащян М.М., Федорова Т.Н., Стволинский С.Л., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Мигулин В.А., Шабалина А.А., Трубицына И.Е., Лопачев А.В., Куликова О.И., Абаимов Д.А.* // Патент RU 2694061 С1, опубл. 09.07.2019.
6. *Федорова Т.Н., Стволинский С.Л., Мигулин В.А., Лопачев А.В., Хуторова А.В., Куликова О.И., Музычук О.А., Абаимов Д.А.* // Патент RU 2777391 С1, опубл. 03.08.2022.
7. *Baltazar M.T., Dinis-Oliveira R.J., Duarte J.A., Bastos M.L., Carvalho F.* // *Curr. Med. Chem.* 2011. V. 18. P. 3252–3264.
<https://doi.org/10.2174/092986711796391552>
8. *Bhardwaj V., Gumber D., Abbot V., Dhimana S., Sharma P.* // *RSC Adv.* 2015. V. 5. P. 15233–15266.
<https://doi.org/10.1039/C4RA15710A>
9. *Pegova A., Abe H., Boldyrev A.* // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2000. V. 127. P. 443–446.
[https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(00\)00279-0](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(00)00279-0)
10. *Шевченко К.В., Нагаев И.Ю., Андреева Л.А., Шевченко В.П., Мясоедов Н.Ф.* // *Биомед. химия.* 2019. Т. 65. № 3. С. 180–201. [*Shevchenko K.V., Nagaev I.Yu., Andreeva L.A., Shevchenko V.P., Myasoedov N.F.* // *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B Biomed. Chem.* 2019. V. 13. P. 179–201.]
<https://doi.org/10.1134/S1990750819030089>
11. *Овчинников Ю.А.* // *Биоорганическая химия.* М.: Просвещение, 1987.

Proteinase Resistance of Carnosine, Pyrrolylcarnosine, and Salicylcarnosine

K. V. Shevchenko^{*,#}, I. Yu. Nagaev^{*}, O. I. Kulikova^{}, S. L. Stvolinsky^{**},
V. P. Shevchenko^{*}, and N. F. Myasoedov^{*}**

[#] Phone: 8 (499)196-02-16; e-mail: ATCarma@mail.ru

^{*} National Research Centre “Kurchatov Institute” (NRC “Kurchatov Institute”),
pl. Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia

^{**} Research Center of Neurology (RCN), Volokolamskoe shosse 80, Moscow, 125367 Russia

The stability of carnosine, pyrrolylcarnosine (PC) and salicylcarnosine (SC) to the action of leucine aminopeptidase, carboxypeptidases B and Y was evaluated. It was found that proteolysis of carnosine, PC and SC under the action of leucine aminopeptidase does not occur. Carboxypeptidases B and Y, as well as the enzyme system of blood plasma and plasma membranes of rat brain cells, degraded peptides containing β -alanyl, *N*-pyrrolyl, *N*-salicylic fragments to varying degrees. In all cases, histidine is formed. The formation of pyrrole or salicylic acid does not occur. It was found that carnosine, PC and SC showed high stability to the action of amino- and carboxypeptidases in *in vitro* experiments.

Keywords: dipeptides, peptidases, proteolysis, carnosine, pyrrolylcarnosine, salicylcarnosine



УДК 577.181.5

АНТИМИКРОБНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ ИЗ НАЗАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ СВИНЕЙ¹

© 2024 г. А. А. Баранова*, Ю. В. Закалюкина**, А. П. Тюрин*, В. А. Коршун*,
О. А. Белозерова*, М. В. Бирюков***, А. В. Моисеенко*, ***,
С. С. Терехов*, В. А. Алферова*, #

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

** Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет почвоведения,
Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1с12

*** Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1с12

Поступила в редакцию 18.07.2023 г.

После доработки 28.07.2023 г.

Принята к публикации 29.07.2023 г.

Микробиом млекопитающих считается потенциальным источником биологически активных соединений, в том числе антибиотиков. В данной работе мы изучили культивируемые микроорганизмы из назальной микробиоты венгерской домашней свиньи (*Sus domesticus*). Таксономическое положение 20 выделенных штаммов (включая 18 бактерий, по одному виду дрожжевых и мицелиальных грибов) было определено с помощью филогенетического анализа, морфологических и биохимических исследований. Штаммы были подвергнуты тестированию на чувствительность к антибиотикам и скринингу антимикробной активности. Установлено, что штамм *Pseudomonas aeruginosa* SM-11 продуцирует четыре известные антибактериальные молекулы (пиоцианин, пиохелин, пиолутеорин, монорамнолипид). Продукция пиоцианина была индуцирована сокультивированием с грамотрицательными тест-микроорганизмами *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и *Escherichia coli* ATCC 25922. Показано, что микробиота млекопитающих может служить ценным источником штаммов, продуцирующих антимикробные препараты, а также штаммов редких таксонов. Для ее изучения наиболее перспективны биотехнологические подходы, основанные на индукции биосинтеза вторичных метаболитов с помощью сокультивирования с тест-микроорганизмами. Методы сокультивирования – перспективный подход для изучения противомикробных препаратов из молчащих кластеров биосинтетических генов.

Ключевые слова: респираторный тракт, назальный микробиом, домашняя свинья, *Sus domesticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, антибиотики, ESEM

DOI: 10.31857/S0132342324020051, **EDN:** ONFXKK

ВВЕДЕНИЕ

Для лечения заболеваний, вызванных антибиотикоустойчивыми микроорганизмами, необходимы обнаружение, исследование и введение в практику новых антибиотиков. Хотя исследование и выведение на рынок новых действующих веществ – это слож-

ные и длительные этапы [1–4], обнаружение активных соединений из природных источников остается ключевым шагом на пути к созданию новых противомикробных препаратов [5–9]. Микроорганизмы, циркулирующие в дикой природе, распространены повсеместно (рис. 1), и антибиотичес-

¹ Дополнительные материалы к этой статье доступны по doi 10.31857/S0132342324020051 для авторизованных пользователей. Сокращения: ESEM – сканирующая электронная микроскопия с режимом естественной среды; ITS – внутренний транскрибируемый спейсер; LB – лизогенная питательная среда; PDA – картофельно-декстрозный агар; SEM – сканирующая электронная микроскопия. #Автор для связи: (тел.: +7-926-611-36-49; эл. почта: alferovava@gmail.com).



Рис. 1. Повсеместное присутствие и постоянная циркуляция микроорганизмов в экосистемах.

кие вещества вырабатываются ими как средство межвидовой конкуренции и/или внутривидовой коммуникации. Традиционно поиск новых продуцентов антибиотиков долгое время проводился в микробных сообществах легкодоступных биосистем. Однако в последнее время исследователи все чаще обращаются к необычным местообитаниям живых организмов [10, 11] и активно изучают микроорганизмы-симбионты морских губок [12], насекомых [11], энтомопатогенных нематод [13] и др. Симбионты млекопитающих [14], в том числе человека [15–18], – перспективные источники биоактивных молекул с ценными фармацевтическими свойствами [19]. Адаптация к таким уникальным экологическим условиям благоприятствует селекции штаммов с вторичными метаболитами, нетоксичными для млекопитающих. Разумеется, большинство исследований посвящено микробиоте желудочно-кишечного тракта [20–23]. Однако продуценты, локализованные в области взаимодействия организма-хозяина с окружающей средой, также могут быть очень интересны, например, антимикробные соединения, производимые микробиотой кожи [24–29]. Один из таких примеров – выделение продуцента амикумацина из пасти медведя [30]. Недавно описанные бактериостатические пептиды треоглюцины продуцируются *Streptococcus suis* ATCC 43765 [31]. *S. suis* – важный патоген свиней, связанный с зоонозными инфекциями дыхательных путей. Такие антибиотики, очевидно, играют важную роль в экосистемах, регулируя микробиом хозя-

ина. Они могут защищать организм хозяина от колонизации другими микроорганизмами, включая близкородственные штаммы.

В данной работе мы изучали микробное сообщество, выделенное из микробиоты слизистой оболочки носа домашних свиней (*Sus domesticus*) породы мангалица. Мангалица – это порода свиней сального типа с кудрявой шерстью, выведенная в середине XIX века в Венгрии [32]. Эти свиньи неприхотливы: они могут переносить низкие температуры и не привередливы к питанию. Обычно их содержат на смешанных или свободных пастбищах, их рацион дополняют корнеплоды, выращенные на ферме (тыква, кормовая свекла, картофель), свежескошенная зелень летом и сено зимой. Эти животные хорошо приспособлены к постоянной жизни на открытом воздухе, могут спать в снегу, питаться подножным кормом, почти не страдают от некоторых болезней свиней [33]. Выбор данной породы свиней в качестве источника возможных продуцентов антибиотиков был обусловлен, во-первых, образом жизни животных – постоянном контакте с окружающей средой, а во-вторых, фактом, что до отбора проб животные не подвергались антибиотикотерапии.

Мы выделили в индивидуальном виде и культивировали 20 штаммов микроорганизмов, идентифицировали их с помощью полифазного подхода и изучили их способность продуцировать антибиотические метаболиты. Целью данной работы была

оценка биотехнологического потенциала назальной микробиоты домашних свиней породы мангалица.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Зимой 2022 г. были взяты пробы со слизистой носовой полости домашних свиней (порода мангалица). Первоначально пробы были взяты у трех взрослых особей, однако обнаружить антимикробную активность среди выделенных чистых культур удалось только у одной свиньи. Поэтому дальнейший поиск продуцентов антибиотиков был сосредоточен на образцах от одной особи. Всего от нее было получено 20 изолятов микроорганизмов. Нашей задачей было провести первичную оценку штаммов-продуцентов антибиотиков из этого объекта. Несмотря на очень широкие и всесторонние исследования микробиоты млекопитающих, случаев получе-

ния антибиотиков из таких местообитаний не-много [14–30].

Большинство выделенных штаммов (18 штаммов) – это бактерии, один штамм – мицелиальный и один – дрожжевой грибок (табл. S1 в дополнительных материалах). Из этих 18 первичных бактериальных изолятов 8 изолятов (SM-1, SM-2, SM-7, SM-8, SM-9, SM-12, SM-18, SM-19) показали положительный результат при окрашивании по Граму, а остальные были грамотрицательными бактериями. Филогенетический анализ первичных изолятов (табл. 1) показал идентичность изолятов SM-1 и SM-2; SM-3, SM-4 и SM-5; SM-7 и SM-8; SM-15, SM-16 и SM-17.

Дополнительное подтверждение видовой принадлежности проводили с использованием биохимических данных по утилизации субстратов, ферментативной активности и способности продуцировать серо-

Таблица 1. Филогенетический анализ выделенных штаммов микроорганизмов

Штамм	Ближайший типовой штамм в GenBank	Идентичность, %
SM-1 SM-2	<i>Nocardiosis alba</i> DSM 43377 ^T	99.70
SM-3 SM-4 SM-5	<i>Moraxella porci</i> DSM 25326 ^T	100
SM-6	<i>Rhodotorula frigidialcoholis</i> EXF 10854 ^T	99.80
SM-7	<i>Weissella cibaria</i> JCM 12495 ^T	100
SM-8	<i>Weissella confusa</i> JCM 1093 ^T	100
SM-9	<i>Enterococcus italicus</i> DSM 15952 ^T	99.15
SM-10	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8030 ^T	99.82
SM-11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JCM 5962 ^T	99.85
SM-12	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> JCM 5805	99.88
SM-13	<i>Glaesserella parasuis</i> NCTC 4557 ^T	99.53
SM-14	<i>Proteus cibi</i> DSM 106178 ^T	99.69
SM-15 SM-16 SM-17	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> ATCC 13880 ^T	99.83
SM-18	<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10 ^T	100
SM-19	<i>Arthrobacter psychrochitiniphilus</i> GP3 ^T	99.17
SM-20	<i>Chaetomium anastomosans</i> CGMCC 3.19350 ^T	100

водород (табл. S1 в дополнительных материалах). Таким образом, для идентификации выделенных микроорганизмов был использован полифазный подход, сочетающий анализ их филогенетического положения на основе анализа нуклеотидных последовательностей значимых геномных фрагментов (гены β -тубулина, ITS и 16S рРНК) (рис. S7–S10 в дополнительных материалах) с оценкой их морфологических и биохимических характеристик (табл. S1 в дополнительных материалах).

Мы использовали два метода сканирующего анализа: сканирующую электронную микроскопию (SEM) и сканирующую электронную микроскопию с режимом естественной среды (ESEM), основываясь на имеющихся на данный момент опубликованных данных о том, что ESEM и SEM могут дополнять друг друга [34]. Используя SEM, можно получать изображения поверхности биологических образцов с высоким разрешением, однако этот метод требует

дополнительной пробоподготовки. В свою очередь, ESEM позволяет исследовать препараты в их естественном состоянии, но получаемые изображения будут иметь меньшее разрешение и соотношение сигнал/шум. Результаты, полученные этими методами, могут немного отличаться из-за разницы в процессе подготовки образцов [35, 36]. SEM обладает уникальными преимуществами, такими как высокое разрешение и большая глубина резкости [37]. Основное преимущество ESEM – возможность визуализации гидратированных и непроводящих образцов, таких как биологические ткани и (бактериальные) клетки, без предварительного обезвоживания или нанесения проводящего покрытия [36, 37].

Микроморфологическая структура мицелиальных микроорганизмов (SM-1, SM-20), дрожжей (SM-6) и наиболее активного бактериального изолята (SM-11) была изучена с помощью SEM (рис. 2–5).

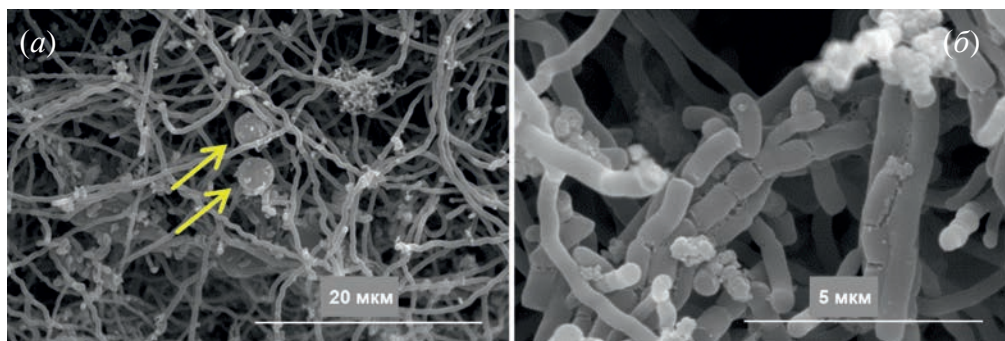


Рис. 2. Сканирующая электронная микроскопия штамма *Nocardioopsis alba* SM-1, выращенного на среде Мюллера–Хинтона в течение 5 сут при 28°C. Стрелками показаны округлые спорангиеподобные структуры.

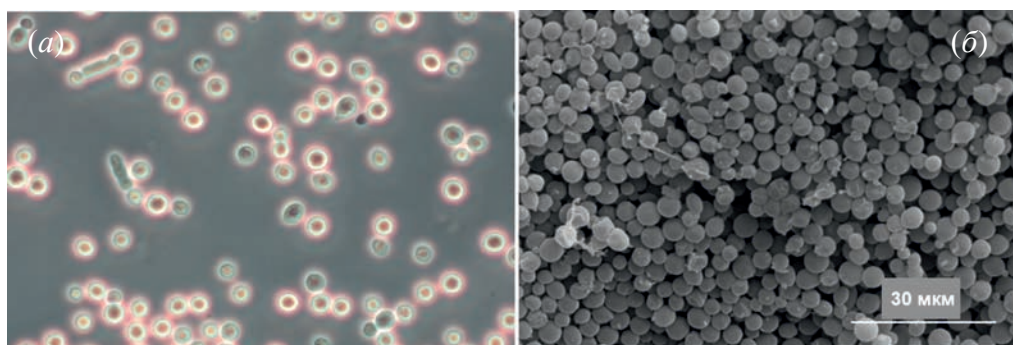


Рис. 3. Морфология *Rhodotorula frigidialcoholis* (SM-6): световая микроскопия (a), сканирующая электронная микрофотография после 3 сут инкубации на среде Мюллера–Хинтона при 28°C (б).

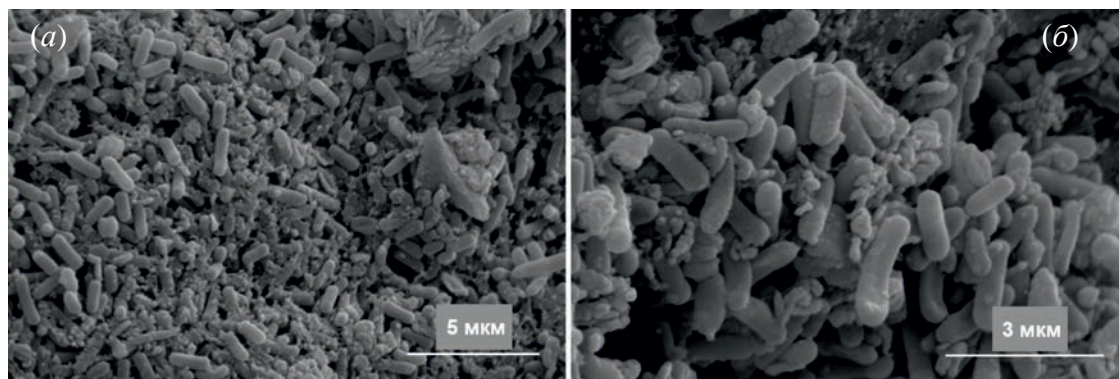


Рис. 4. Изображение со сканирующего электронного микроскопа биопленки штамма *Pseudomonas aeruginosa* SM-11, сформированной через 48 ч на среде LB при 37°C.

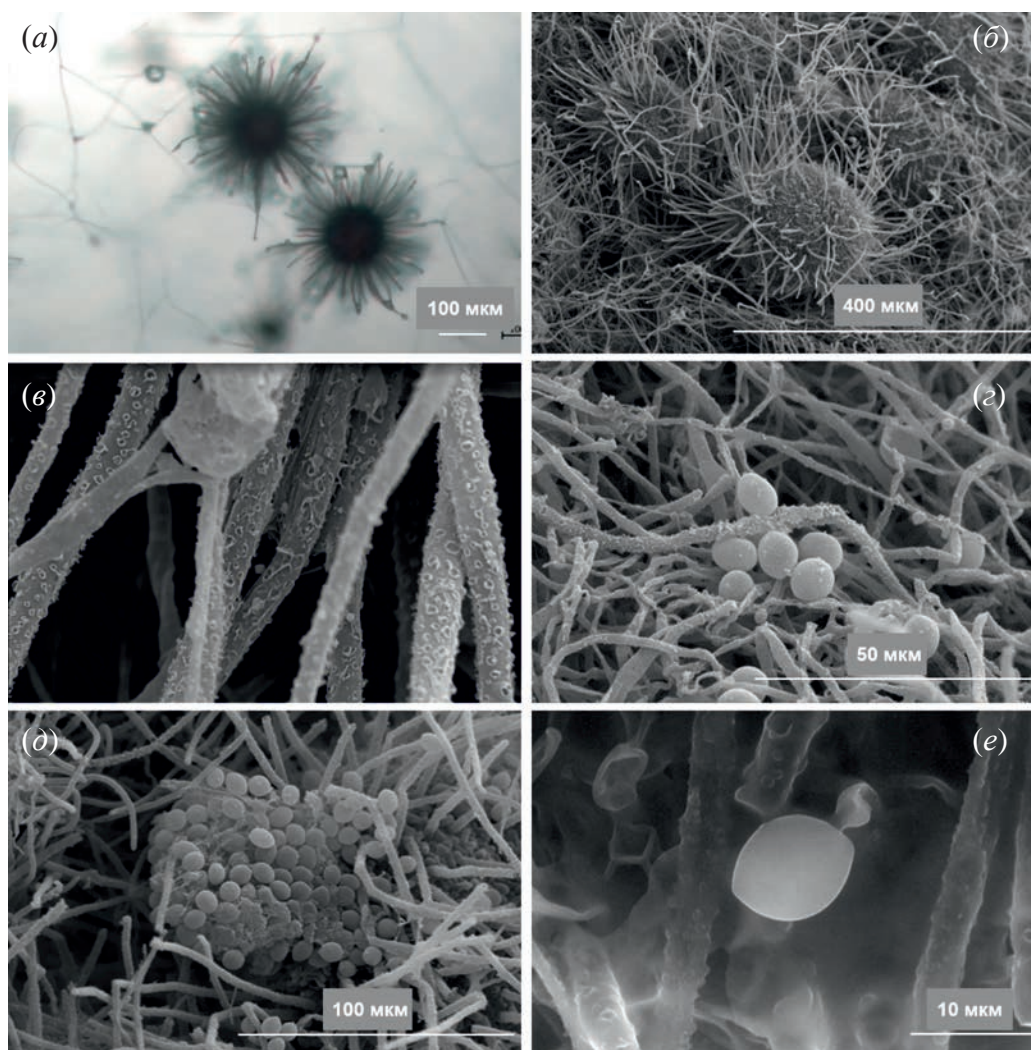


Рис. 5. Микроморфология *Chaetomium anastomosans* SM-20 на среде PDA через 7 сут инкубации при $25 \pm 1^\circ\text{C}$: зрелые плодовые тела (перитеции), рассмотренные с помощью световой микроскопии (a) и сканирующего электронного микроскопа (b), волоски перитеция в SEM (c), аскоспоры в SEM (d) и в ESEM (e).

В целом морфология штамма SM-1 (рис. 2) соответствует морфологии типового штамма *Nocardiosis alba* [38]: зигзагообразные гифы воздушного мицелия, характерные для начальных этапов споруляции (рис. 2а), и прямые гибкие гифы, фрагментирующиеся на гладкие палочковидные элементы (рис. 2б). Интересно, что на препарате штамма SM-1 были обнаружены округлые спорогангиеподобные структуры (показаны стрелкой на рис. 2), ранее не описанные для *Nocardiosis alba*.

В случае дрожжевого штамма *Rhodotorula frigidialcoholis* SM-6, используя световую микроскопию, мы обнаружили округлые одиночные или почкующиеся клетки, окруженные толстыми капсулами, морфология была дополнительно визуализирована с помощью SEM (рис. 3).

Штамм *Pseudomonas aeruginosa* SM-11 имел тенденцию к образованию биопленок (рис. 4).

Для штамма *Chaetomium anastomosans* SM-20, в дополнение к световой и классической электронной микроскопии, мы использовали ESEM для визуализации аскоспор в их нативной форме (рис. 5).

Далее методом агаровых блоков тестировали антимикробную активность изолятов. Скрининг выявил выраженную антибиотическую активность широкого спектра действия штамма *P. aeruginosa* SM-11 против грамположительных бактерий (*B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212), грамотрицательных бактерий (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853) и дрожжей (*C. albicans* CBS 8837).

Штамм SM-11 культивировали как на жидкой, так и на твердой среде Мюллера–Хинтона. Однако процесс выделения был затруднен характерным для *P. aeruginosa* образованием матрикса биопленки [39]. Этот штамм в процессе роста выделял большое количество матрикса биопленки, поэтому выделить антибиотика из жидкой среды не представлялось возможным. В результате культивирование проводили на твердой среде для упрощения процесса выделения. Экстрагировали бутанолом, экстракты фильтровали и выпаривали в вакууме, остаток растворяли в воде и фракционировали с помощью колонки с сорбентом LPS-500H. Было обнаружено,

что штамм продуцирует несколько антибиотических соединений.

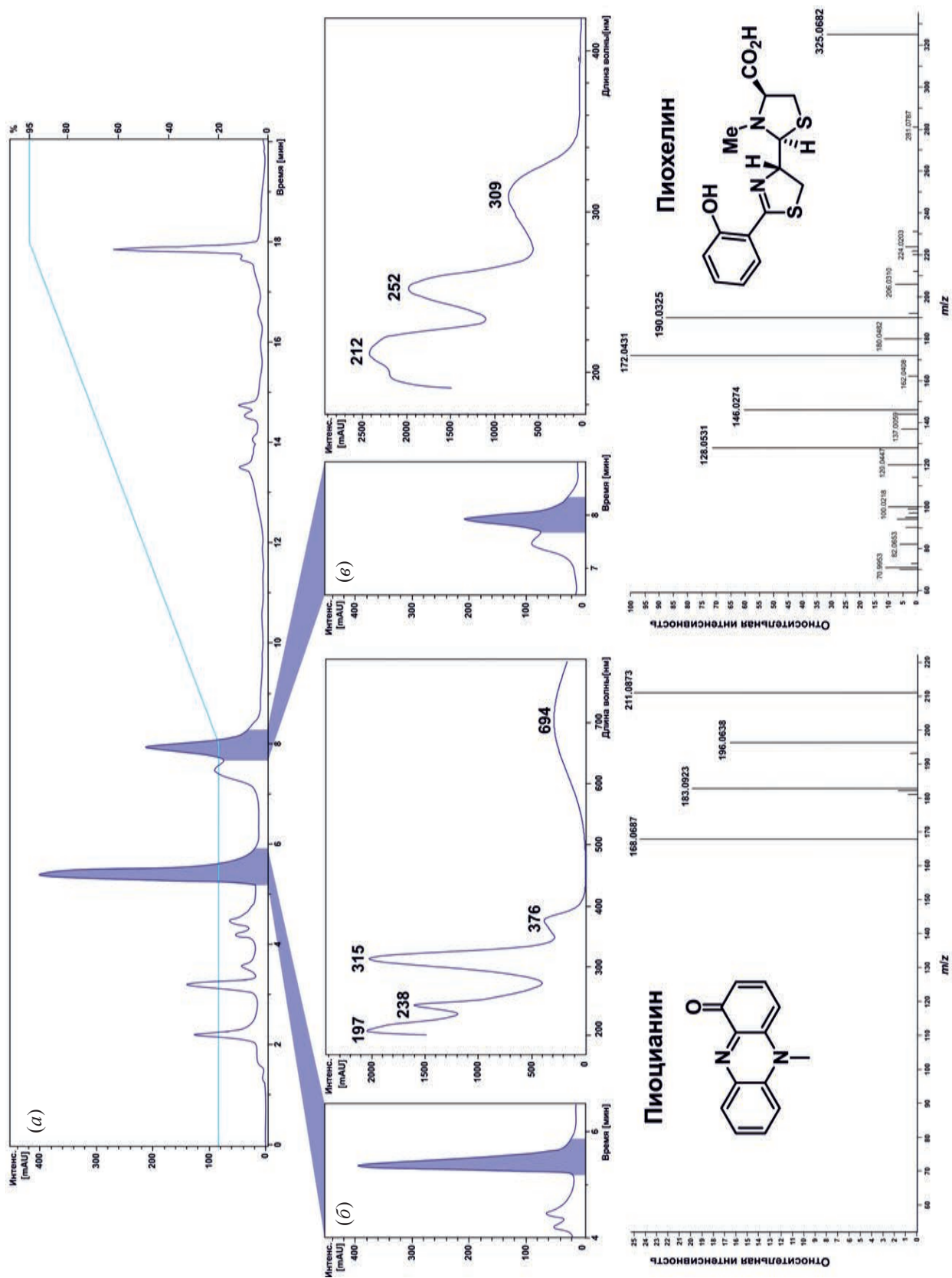
Наиболее гидрофильная антибактериальная фракция элюировалась 20%-ным водным ацетонитрилом (SM11-MeCN20). Первоначально штамм SM-11 не продуцировал флуоресцентный пигмент. При исследовании антагонистической активности методом перекрестных культур штамм SM-11 начал продуцировать синий флуоресцентный пигмент, который также элюировался в SM11-MeCN20.

Фракционирование с помощью ВЭЖХ (рис. 6) показало, что первоначальная антибактериальная активность была связана с производством пиохелина. Дерепликацию проводили путем сравнения со спектром библиотеки GNPS для пиохелина (рис. S11 в дополнительных материалах). Пиохелин – железохелатирующий сидерофор, продуцируемый многими видами микроорганизмов, включая *Pseudomonas* sp. [40].

Индукцированное флуоресцентное вещество также продемонстрировало антибактериальную активность. Анализ очищенной флуоресцентной фракции показал характерное УФ-поглощение (694 нм) и точную массу соединения, соответствующую составу $C_{13}H_{10}N_2O$. Идентичность соединения с известным феназиновым антибиотиком пиоцианином была подтверждена сравнением картины фрагментации (рис. S12 в дополнительных материалах). Этот редокс-активный пигмент часто вырабатывается *P. aeruginosa* [41].

Следующую антимикробную фракцию элюировали с колонки LPS-500H 50%-ным водным ацетонитрилом. Фракционирование с помощью ВЭЖХ и МС-анализ выявили известный антибиотик пиолотеорин (рис. 7). Пиолотеорин – хлорированное производное пиррола с антибиотической, противогрибковой и гербицидной активностью [42], характерной для *Pseudomonas* sp.

Самым гидрофобным антибиотиком, элюируемым ацетонитрилом, оказался монорамнолипид RhaC10C10 (рис. 8). Рамнолипиды – это гликолипидные биосурфактанты с привлекательными свойствами, включая низкую токсичность, быструю биоразлагаемость и стабильное образование микроэмульсий [43].



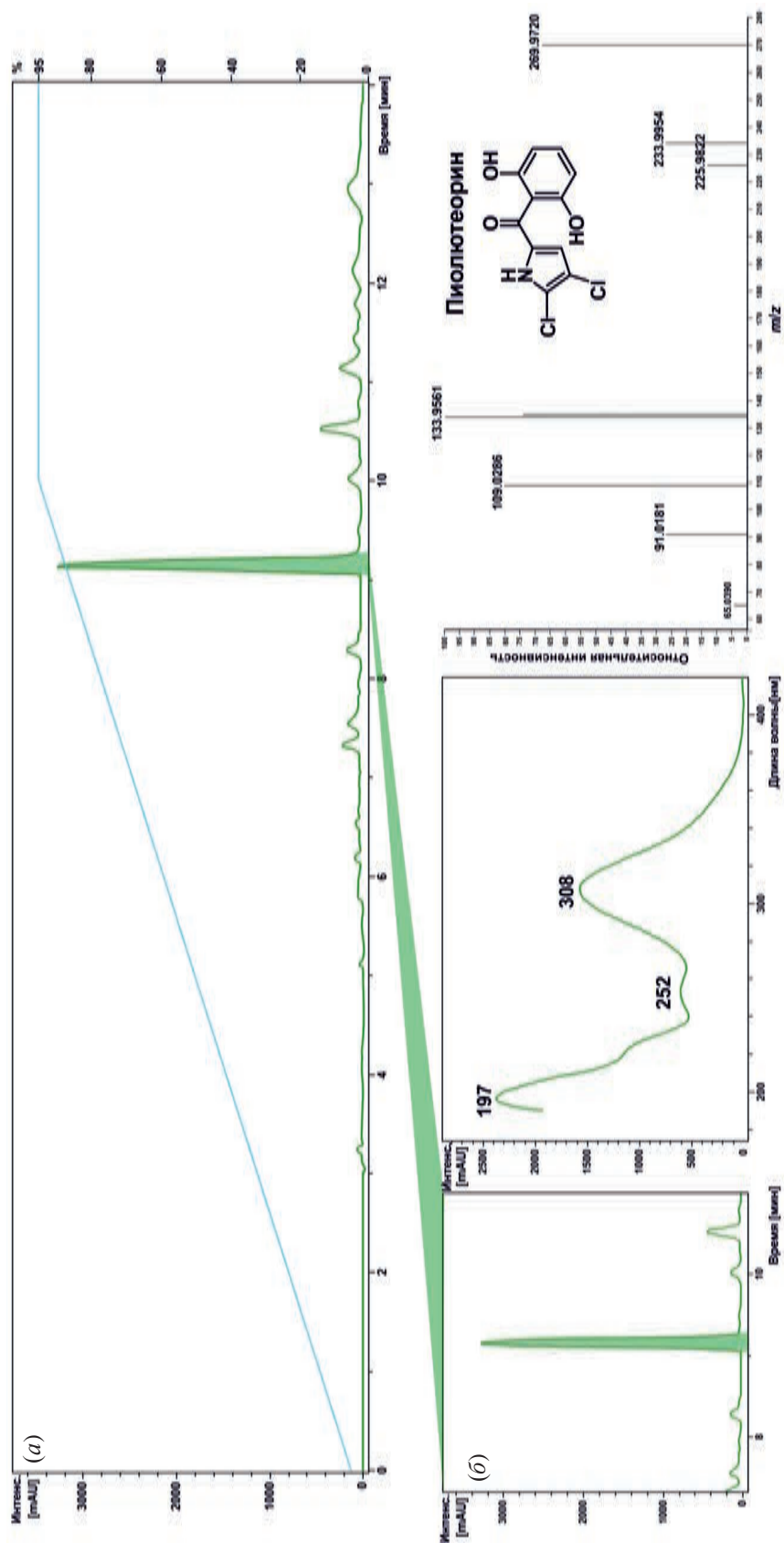


Рис. 7. Профиль ВЭЖХ (контролируется по УФ-поглощению при 350 нм) и условия элюирования (голубая линия) для SM-11-MeCN50 (а), УФ-спектр и схема фрагментации MS² ([M – H]⁻, в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов) для пиоглеторина (б).

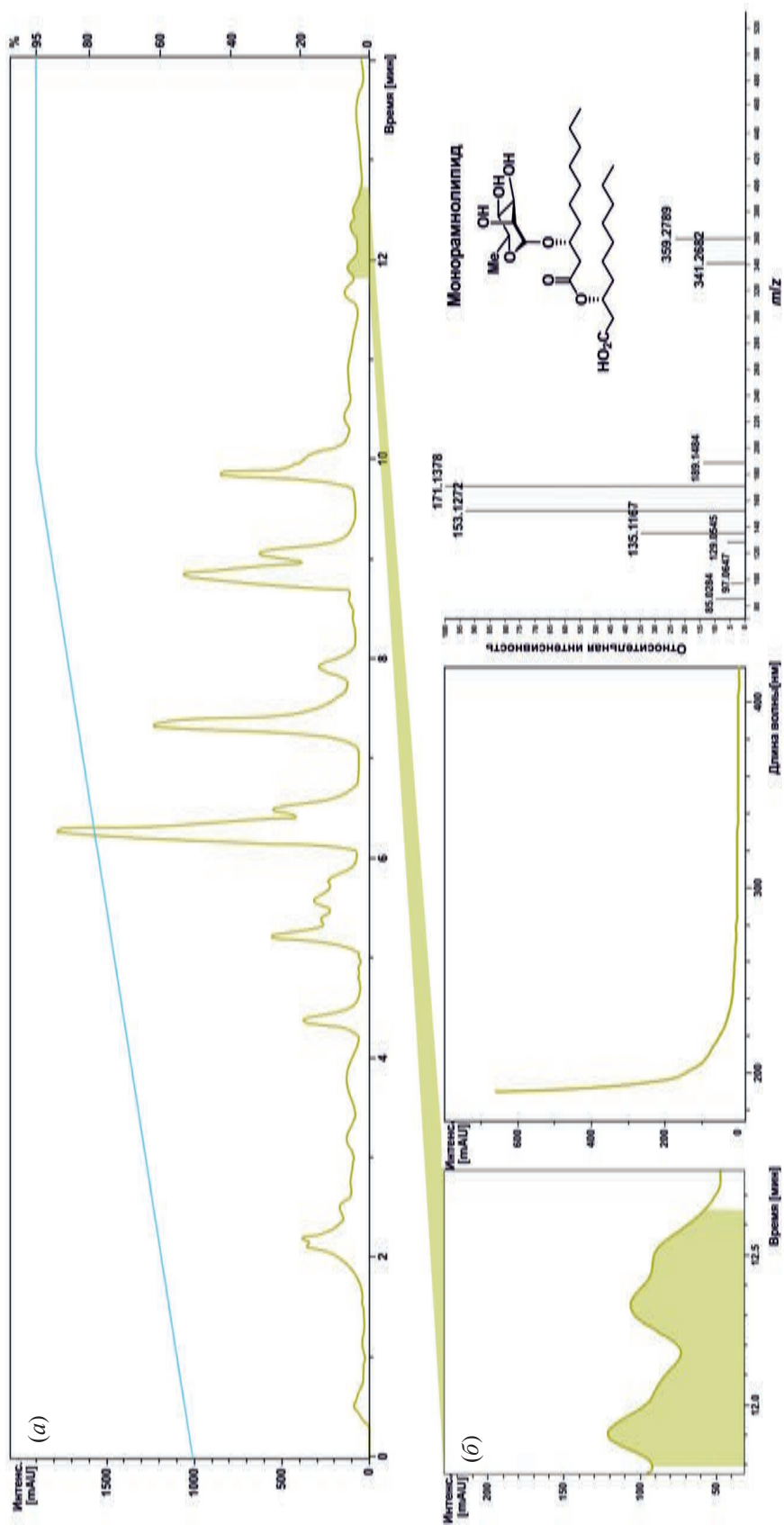


Рис. 8. Профиль ВЭЖХ (контролируется по УФ-поглощению при 210 нм) и условия элюирования (голубая линия) для SM-11-MeCN100 (а). УФ-спектр и схема фрагментации MS² для монотерпенолипида RhaC10C10 (б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поиск продуцентов биологически активных соединений среди микроорганизмов, ассоциированных с животными, в силу их поразительного разнообразия, имеет неисследованные перспективы [11, 44, 45]. Однако до сих пор такие работы были сосредоточены больше на беспозвоночных хозяевах [46–48]. Тем не менее позвоночные, включая млекопитающих, также представляют собой перспективный источник микроорганизмов с антимикробной активностью [30].

Общепризнанно, что свинья считается лучшей биологической моделью человека в биомедицинских экспериментах из-за сходства широкого спектра анатомических и физиологических характеристик [49, 50]. Восприимчивость патогенных бактерий свиней к антибиотикам и их возможная передача человеку также привлекает внимание исследователей [51–53].

Чаще всего фокус исследования в подобных работах сосредоточен на анализе состава и возможных функций микробиома желудочно-кишечного тракта хозяина с акцентом на параметры здоровья животного [54–56]. Однако не менее важны микробные сообщества, населяющие поверхность кожи, ротовую полость, мочеполовую систему и дыхательные пути.

Носовая микробиота домашних свиней была объектом исследования лишь в нескольких работах [20, 57–61], где она изучалась с точки зрения здоровья дыхательных путей свиней и ее участия в патогенезе, вызванном инфекцией *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* и других патогенов. Однако микробные сообщества, ассоциированные с домашними свиньями, еще не стали источником для поиска антибиотически активных штаммов. В данном исследовании мы охарактеризовали биосинтетический потенциал микроорганизмов, присутствующих в этой специфической

экологической нише, используя стандартный культурально-зависимый подход.

Стоит отметить, что нос свиньи – это не просто орган обоняния, а слизистая оболочка носа – не только часть верхних дыхательных путей, как у других животных, включая человека. Нос свиньи – это орган осязания, и с древних времен он служит диким и домашним свиньям для поиска и извлечения пищи, находясь в постоянном контакте с почвой, растительными остатками, отходами жизнедеятельности и т.д. Таким образом, в условиях постоянного притока микроорганизмов извне микробные сообщества, населяющие ноздри свиней, должны характеризоваться стабильностью и насыщенностью. Не будет преувеличением сказать, что с точки зрения микробной экологии нос свиньи – “горячая точка”, где благодаря постоянному взаимодействию между иммунной системой хозяина и разнообразным пулом микроорганизмов поддерживается высокая интенсивность межорганизменных взаимодействий – от симбиотических до антагонистических. С одной стороны, часть этой микробиоты состоит из видов, характерных для свиней, и может рассматриваться как относительно постоянный компонент назальной микробиоты, а с другой стороны, присутствует переходная микробиота, которая меняется в результате взаимодействия с внешней средой.

Среди видов микроорганизмов, выделенных в данном исследовании (табл. 1), прежде всего следует отметить идентификацию характерных представителей назальной микробиоты свиней, обнаруженных в более ранних исследованиях [20, 57–61]: *Moraxella porci* (SM-3, SM-4, SM-5), *Glaesserella parasuis* (SM-13) и *Weissella* sp. (SM-7, SM-8). Кроме того, бактерии, характерные для животных в целом и свиней в частности, могут включать представителей порядка *Lactobacillales*: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (штамм SM-12) и *Enterococcus italicus* (штамм SM-9). Также неудивительно встретить виды порядка

Enterobacteriales, представители которого часто ассоциируются с очень широким кругом животных, а также часто выделяются из пищи: *Citrobacter freundii* (штамм SM-10), *Serratia marcescens* (штаммы SM-15, SM-16, SM-17) и *Proteus cibi* (штамм SM-14) [62]. Вполне естественно выделение из слизистой носа *Bacillus subtilis* (штамм SM-18), *Pseudomonas aeruginosa* (SM-11) и актинобактерий *Nocardiosis alba* (SM-1, SM-2), которые, хотя и широко распространены в природе, в основном встречаются в образцах животных, среди которых свиньи занимают третье и пятое места соответственно (согласно проекту Microbial Atlas Project, microbeatlas.org) [63].

В то же время *Arthrobacter psychrochitiniphilus* SM-19, *Rhodotorula frigidialcoholis* SM-6 и *Chaetomium anastomosans* SM-20, которые ранее не были обнаружены у свиней, по-видимому, представляют собой лишь переходные виды, заимствованные из внешней среды [64–66].

Многие виды, обнаруженные нами у здоровых животных, характеризуются способностью вырабатывать антибиотики, токсины и другие биоактивные метаболиты, которые они обычно используют для общения или конкуренции друг с другом [11] (табл. 2).

Скрининг антимикробной активности среди всех изолятов показал, что штамм SM-11 наиболее активен и способен подавлять рост грамположительных бактерий (*B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212), грамотрицательных бактерий (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853) и дрожжей (*C. albicans* CBS 8837). Культивирование, очистка и идентификация активного соединения показали, что SM-11 продуцирует феназиновый пиоцианин, редокс-активный пигмент, производимый 90–95% изолятов *P. aeruginosa* [41].

В аксенических условиях, после одного или двух пассажей, штамм SM-11 терял способность продуцировать пиоцианин, но сокультивирование с другими микроорганизмами немедленно восстанавли-

вало эту способность, которая легко контролируется благодаря характерной флуоресценции и оптическим свойствам этого соединения (максимум поглощения при 694 нм). Интересно, что штамм SM-11 не продуцировал токсичный пиоцианин при выделении из свиной микробиоты, но его производство индуцировалось при культивировании с тест-микроорганизмами. Индукция биосинтеза антибиотиков [80], в том числе с помощью методов совместного культивирования, для штаммов, ассоциированных с млекопитающими, может раскрыть их скрытый биосинтетический потенциал.

В сочетании со способностью образовывать устойчивые биопленки (рис. 4) благодаря чувству кворума (quorum sensing) и высокой ферментативной активности в отношении многих субстратов (табл. S1 в дополнительных материалах), наибольшей среди других выделенных бактерий способностью синтезировать сидерофоры, например, пиохелин (рис. 6), делают штамм SM-11 мощным конкурентом и угрозой как для других микроорганизмов, так и для клеток хозяина. Тем не менее назальное сообщество, выделенное культурально-зависимым методом, довольно разнообразно, и *P. aeruginosa* не вытесняет другие виды. Вполне вероятно, что один из сдерживающих факторов колонизации слизистой оболочки верхних дыхательных путей – присутствие молочнокислых бактерий (LAB), также обнаруженных в слизистой свиней: штаммы SM-7, SM-8 [81], SM-9 [82] и, главным образом, SM-12. LAB способны снижать подвижность многих патогенных бактерий за счет производства ацетата [76]. Более того, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* SM-12 обладает способностью производить низины – полициклические антибактериальные пептиды класса лантибиотиков с широким спектром активности против грамположительных и грамотрицательных бактерий [83].

Носовая полость может рассматриваться как “входные ворота” в организм животного, где бактериаль-

Таблица 2. Характеристика выделенных штаммов микроорганизмов

Штамм	Ближайший типовой штамм (идентичность в GenBank, %)	Биологически активное соединение	Активность	Ссылка
SM-1 SM-2	<i>N. alba</i> DSM 43377 ^T (99.70%)	Производные феназина Нокардиопептины А-С (nocardiopsistins А-С) Гризеусин D (griseusin D) Нокапироны (носаругтоны) Метоксиейгумицин (methoxuinehumicin)	Антибактериальная Антибактериальная Противогрибковая Противораковая Противораковая	[67, 68]
SM-3 SM-4 SM-5	<i>M. porci</i> DSM 25326 ^T (100%)	Не исследовано	Видимо, оппортунистический, обнаруживается как у здоровых, так и у больных свиней	[69, 70]
SM-6	<i>R. frigidialcoholis</i> EXF 10854 ^T (99.80%)	Не исследовано	Нет данных	[65]
SM-7 SM-8	<i>W. cibaria</i> JCM 12495 ^T (100%) <i>W. confusa</i> JCM 1093 ^T (100%)	Вайселлицины (weissellicins)	Активность широкого спектра действия против грамположительных и грамотрицательных бактерий (например, <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>L. lactis</i> и др.)	[71]
SM-9 SM-10	<i>E. italicus</i> DSM 15952 ^T (99.15%) <i>C. freundii</i> ATCC 8030 ^T (99.82%)	Продукция H ₂ O ₂ Энтероцины (Enterocins) Пептидные термостабильные энтерооксины	Антибактериальная активность в отношении <i>Listeria monocytogenes</i> Вызывают диарею у человека и млекопитающих	[72, 73] [74]
SM-11 SM-12	<i>P. aeruginosa</i> JCM 5962 ^T (99.85%) <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> JCM 5805 (99.88%)	Многочисленные активные соединения Лантибиотик низин, ацетат	Антибактериальная, противогрибковая Активность широкого спектра действия нарушает подвижность патогенных бактерий <i>Pseudomonas</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Leptospira</i> и др.	[75] [76]
SM-13	<i>G. parasuis</i> NCTC 4557 ^T (99.53%)	Не исследовано	Комменсал в верхних дыхательных путях свиней, этиологический агент болезни Гляссера	[77]

Таблица 2. (окончание)

Штамм	Ближайший типовой штамм (идентичность в GenBank, %)	Биологически активное соединение	Активность	Ссылка
SM-14	<i>P. cibi</i> DSM 106178 ^T (99.69%)	Не исследовано	Нет данных	[62]
SM-15	<i>S. marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> ATCC 13880 ^T (99.83%)	Бактериоцин (марцесцин) (bacteriocin (marcescin))	Ингибирует рост <i>Corynebacterium diptheriae</i> и <i>Staphylococcus aureus</i>	[78]
SM-16				
SM-17				
SM-18	<i>B. subtilis</i> DSM 10 ^T (100%)	Субтилин (subtilin), субтилозин (subtilosin), бацилизин (bacilysin), сурфактин (surfactin), фактор убийства Skf и спороассоциированный антимикробный полипептид TasA	Широкий спектр антибактериального и противогрибкового действия	[79]
SM-19	<i>A. psychrochitiniphilus</i> GРЗТ (99.17%)	Не исследовано	Нет данных	[64]
SM-20	<i>C. anastomosans</i> CGMCC 3.19350 ^T (100%)	Не исследовано	Нет данных	[66]

ное богатство и разнообразие верхних дыхательных путей действует как естественный фильтр, ограничивающий попадание микроорганизмов извне в нижние отделы респираторного тракта [18]. Эффективность и стабильность такого фильтра во многом определяется биотическими взаимоотношениями в микробном сообществе, которые могут быть реализованы через производство метаболитов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Отбор проб и выделение штаммов. Образцы были взяты в январе 2022 г. от однолетних половозрелых домашних свиней (две самки и один самец, порода венгерская мангалица, вес 150–160 кг), которые не были серьезно больны, не проходили лечение антибиотиками и не были вакцинированы. Свиньи постоянно находились на открытом воздухе. Их ежедневный зимний рацион состоял из смеси дробленого ячменя и пшеницы, корнеплодов (тыква, кормовая свекла, картофель) и сухого сена. Свиньи были выращены в селе Хомбусь-Батырево Чувашской Республики Российской Федерации (55.293515 N, 47.088331 E). Средняя температура в январе 2022 г. составляла –9°C, влажность 85% при устойчивом снежном покрове (~40 см). Пробы были взяты из обеих ноздрей носа свиньи. Свабы (зонд-тампоны) с образцами слизистой носа хранили в транспортной среде Стюарта при 0–4°C в течение 20 ч до обработки (рис. 9).

Образцы суспендировали в трех экземплярах в 10 мл 0.9%-ного раствора NaCl, полученную суспензию использовали для инокуляции. Инокулят (1 мл на чашку) распределяли на квадратные чашки Петри размером 15 × 15 см с твердой питательной средой Сабуро (с налидиксовой кислотой, 30 мкг/мл, и без антибиотиков) или Мюллера–Хинтона (HiMediaLab) (с антибиотиком амфотерицином В, 50 мкг/мл, и без антибиотиков). Чашки инкубировали при 28°C в аэробных условиях в течение 10 сут, чтобы обеспечить выделение медленно растущих микроорганизмов, поскольку им требуется более длительный период культивирования для образования

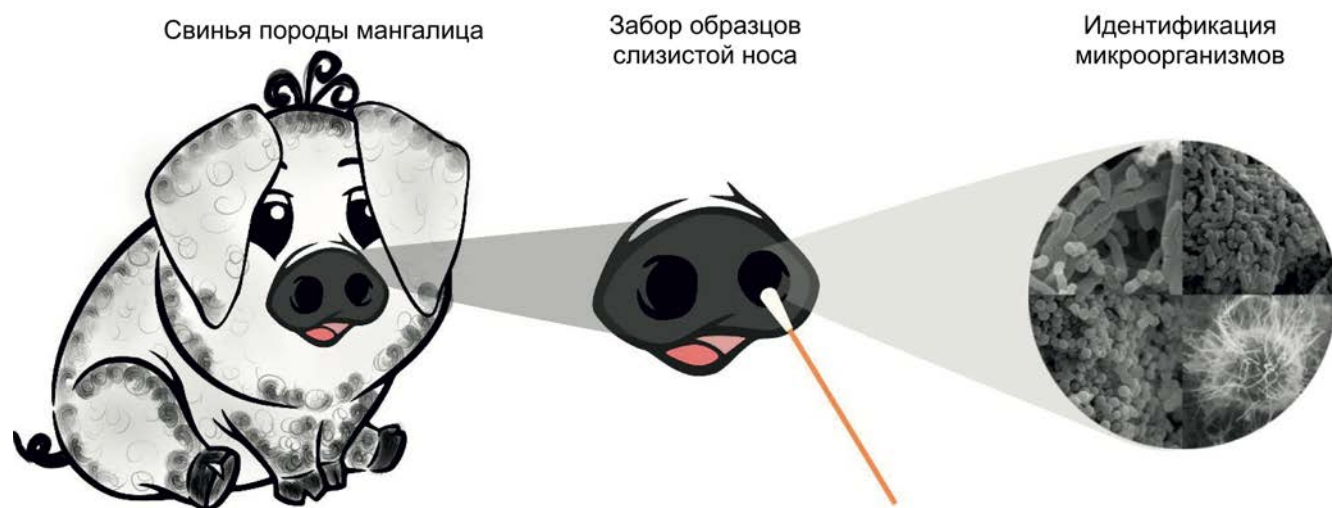


Рис. 9. Сбор образцов и выделение микроорганизмов.

колоний. По мере роста колоний их переносили, очищали на картофельно-декстрозном агаре (грибы) или агаре Мюллера–Хинтона (бактерии). Штаммы хранили в растворе глицерина (20%, v/v) при -87°C .

Антимикробная и антагонистическая активность. Антимикробную активность тестировали методом диффузии в агар в отношении *C. albicans* CBS 8837, *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853. Антагонистическую активность штаммов определяли методом поперечных штрихов [84] (рис. 10а). В дополнение к анализу поперечных полос антибиотическую активность проверяли методом агаровых блоков (рис. 10б) [85].

Метод поперечных штрихов. Изолированные культуры наносили перекрестными штрихами в виде одной линии на затвердевшую питательную среду (агар Мюллера–Хинтона для бактерий, PDA для грибов) в чашке Петри, грибковые штаммы инкубировали при 28°C в течение 7 сут, а бактериальные тест-культуры – при 37°C в течение 2 сут. Затем тест-микроорганизмы пересеивали перпендикулярно исходной полосе изолятов. Чашки с грибковыми тест-культурами инкубировали при 28°C в течение 2 сут, а бактериальные тест-культуры – при 37°C в течение

1 сут. Антагонистическую активность оценивали по зоне ингибирования вокруг изолятов. Если тест-культура чувствительна к штаммам-продуцентам антибиотиков, то она не будет расти рядом с их колониями.

Метод агаровых блоков. Из выросших на агаризованной среде колоний вырезали агаровый блок диаметром 5 мм и переносили его в центр чашки с тест-культурами. Чашки с грибковыми тест-культурами инкубировали при 28°C в течение 2 сут. Чашки с бактериальными тест-культурами инкубировали при 37°C в течение 2 сут, затем измеряли диаметр зоны ингибирования роста вокруг агарового блока.

Антимикробную активность *in vitro* определяли с помощью диффузионного анализа в агаре в соответствии с рекомендациями CLSI [86–88].

Ассимиляция микроорганизмами субстратов, окрашивание по Граму. Биохимическое тестирование выделенных штаммов проводили на фильтровальных бумажных дисках, пропитанных различными субстратами и хромогенными индикаторами (Микроген, Россия), по методике, рекомендованной производителем. Морфологическую характеристику выделенных микроорганизмов проводили путем окрашивания по Граму [89].

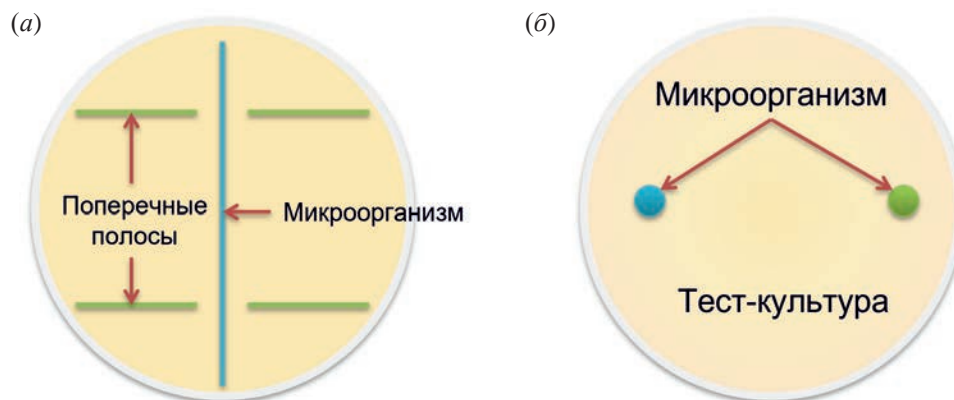


Рис. 10. Дизайн экспериментов по тестированию антагонистической активности выделенных микроорганизмов: (а) – метод поперечных полос, (б) – метод агаровых блоков.

Таксономическая идентификация выделенных штаммов. Амплификация генов и филогенетический анализ. Геномную ДНК изолятов выделяли с помощью набора LumiPure Kit (Люмипроб, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Амплификацию различных участков ДНК грибов и бактерий проводили с использованием соответствующих комбинаций праймеров (табл. 3). Реакционные смеси для ПЦР содержали 0.5 мкл матричной ДНК, 10 мкл готового полимеразного реагента 2× PCR Basic Mix (Lumiprobe, Россия), 0.05 мкл 100 мкМ каждого праймера и стерильную воду Milli-Q до конечного объема 20 мкл.

Продукты ПЦР разделяли электрофорезом на 1%-ном агарозном геле и вырезали соответствующие полосы. Ампликоны очищали с помощью набора для экстракции ДНК в геле (Люмипроб, Россия) и передавали для секвенирования в Центр коллективного пользования “Геном” (Москва, Россия). Секвенирование проводили с использованием набора ABI Prism BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Waltham, США) на анализаторе ДНК Applied Biosystems 3730 (Life Technologies, Carlsbad, США). Последовательности обрабатывали и собирали с помощью программного обеспечения GeneStudio Pro (версия 2.2.0.0).

Таксономическую принадлежность изолятов оценивали, используя соответствующие генные последовательности в качестве запроса в веб-сервисах

BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и EzTaxon (www.ezbiocloud.net). Филогенетический анализ выполняли в программе MEGA 7 (<https://www.megasoftware.net/mega7/>). Филограмму для бактерий строили методом максимального подобия (maximum likelihood), для дрожжей, гриба и актиномицетов – методом присоединения соседей (neighbor joining).

Электронная микроскопия. Образцы для сканирующей электронной микроскопии (SEM) были подготовлены в соответствии с литературными данными [93]. Образцы подвергали сушке в критической точке и покрытию золотом. Изображения SEM получали с помощью сканирующего электронного микроскопа Thermo Quattro S (Thermo Fisher Scientific, Нидерланды), работающего при напряжении 15–30 кВ, увеличение от 600× до 39600×.

Исследования с помощью сканирующей электронной микроскопии в естественной среде (ESEM) проводили с использованием стадии холодного образца. Для предотвращения обезвоживания образцы предварительно охлаждали до 4°C, а перед откачкой воды из камеры рядом с образцом помещали маленькие капли воды. Давление водяных паров и температуру ступени изменяли для поддержания равновесия образца, что минимизировало эффект обезвоживания. Изображения ESEM были получены во

Таблица 3. ПЦР-праймеры и условия термоциклирования

Организм	Штамм	Аmplифицированные гены	Праймеры	Условия термоциклирования
Грибы	SM-20	Ген β -тубулина	Bt2a/Bt2b [90]	95°C – 5 мин; (95°C – 10 с, 58°C – 15 с, 72°C – 30 с) \times 40; 72°C – 5 мин
Дрожжи	SM-6	ITS (внутренний транскрибируемый спейсер)	ITS1/ITS4 [91]	95°C – 5 мин; (95°C – 10 с, 58.5°C – 15 с, 72°C – 30 с) \times 40; 72°C – 5 мин
Бактерии	SM-1–SM-5, SM-7–SM-19	Фрагменты генов, кодирующих 16S рРНК	27F/1492R [92]	95°C – 6 мин; (95°C – 20 с, 57°C – 20 с, 72°C – 1 мин 20 с) \times 35; 72°C – 5 мин

вторичных электронах с детектором GSED и рабочим расстоянием 7–8 мм.

Выделение и идентификация антибиотиков.

Штаммы бактерий культивировали в бульоне Мюллера–Хинтона (HiMediaLab), а грибы – в жидком картофельно-декстрозном бульоне (HiMediaLab). Для получения антибиотиков среду Мюллера–Хинтона и картофельно-декстрозный бульон (50 мл в 250 мл колбе Эрленмейера) инокулировали 1 мл соответствующей посевной культуры. Затем колбы инкубировали при 28°C на шейкере (250 об/мин) в течение 7 сут. Пробы культуральной жидкости отбирали каждый день, а антибиотическую активность оценивали методом диффузии в агар.

После скрининга на антибиотическую активность штамм SM-11 был отобран для дальнейшего изучения. Для получения антибиотика штамм SM-11 культивировали на агаре Мюллера–Хинтона (чашки Петри диаметром 90 мм) при 37°C в течение 2 сут. Антибиотическую активность штамма SM-11 контролировали методом диффузии в агар, используя *B. subtilis* ATCC 6633 в качестве тест-микроорганизма.

Экстракция и установление структуры антибиотиков.

Для экстракции SM-11 из суточных культур в бульоне и агаре использовали *n*-бутанол. Полученный экстракт упаривали в вакууме, остаток растворяли в воде и фракционировали с использованием колонки с сорбентом LPS-500-H (Techno-

sorbent, Россия). После первоначальной сорбции проводили поэтапную элюцию с возрастающей концентрацией ацетонитрила в воде: 0%→10%→20%→50%→100% MeCN. Фракции с антимикробной активностью анализировали методом ВЭЖХ.

ВЭЖХ-анализ осуществляли с использованием колонки 4.6 \times 250 мм (Macherey-Nagel, Германия; Nucleodur C18 Gravity, 5 мкм). Хроматографию проводили в линейном градиенте ацетонитрила в воде при скорости потока 1 мл/мин с детекцией по поглощению при 210, 254, 350 и 500 нм. Использовали следующие градиенты: MeCN20 (20% изократическая элюция в течение 8 мин, 20→95% линейный градиент и изократическая элюция с 95% в течение 2 мин), MeCN50 (5→95% линейный градиент и изократическая элюция с 95% в течение 4 мин), MeCN100 (50→95% линейный градиент в течение 10 мин и изократическая элюция с 95% в течение 4 мин).

LC-MS-анализ проводили на системе ВЭЖХ Ultimate 3000 RSLCnano (Thermo Scientific, Германия), подключенной к масс-спектрометру Orbitrap Fusion Lumos (ThermoFisher Scientific, США). Образцы разделяли на колонке Luna Omega C18 (Phenomenex, США; 2.5 мкм 100 Å 100 \times 2.1 мм) при скорости потока 200 мкл/мин в линейном градиенте ацетонитрила в воде с добавлением 10 мМ формиата аммония и 0.1%-ной муравьиной кислоты. УФ-поглощение регистрировали при длине волны 220 нм. MS1- и

MS2-спектры регистрировали с разрешением 30 и 15K соответственно с фрагментацией HCD. Дерепликацию проводили с использованием библиотеки MS-спектров GNPS [94].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучены микроорганизмы культивируемой назальной микробиоты здоровых домашних свиней и оценен их биотехнологический потенциал в качестве продуцентов антимикробных соединений. Таксономический состав культивируемой микробиоты был изучен на основании полифазного подхода. В результате скрининга антибиотической активности был отобран штамм *Pseudomonas aeruginosa* SM-11. С помощью ВЭЖХ-МС-метаболомики в экстракте данной культуры идентифицирован ряд антимикробных соединений (пиоцианин, пиохелин, пиолотеорин и гликолипид RhaC10C10). Показано, что продукция вторичных метаболитов существенно изменяется при совместном культивировании штамма SM-11 с другими бактериями. В результате было показано, что микробиота, ассоциированная с млекопитающими, представляет существенный интерес в качестве источника антимикробных соединений, а для ее дальнейшего изучения наиболее перспективны биотехнологические подходы, основанные на индукции биосинтеза вторичных метаболитов с помощью сокультивирования с тест-микроорганизмами.

БЛАГОДАРНОСТИ

SEM-исследования проводили на совместной научной установке “Электронная микроскопия в науках о жизни” (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (МГУ), уникальная установка “Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия”).

Авторы выражают благодарность А. В. Коршуну за полезные советы по оформлению публикации.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00409, <https://rscf.ru/en/project/23-24-00409/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Вред животным во время всех манипуляций по отбору проб был минимизирован в соответствии с принципами надлежащей ветеринарной практики и Федеральным законом “Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации” от 27 декабря 2018 года (№ 498-ФЗ). Все процедуры проводили с информированного согласия владельца животного и под его наблюдением. Согласно местному законодательству, данная процедура не требовала специального одобрения Этического комитета.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hutchings M.I., Truman A.W., Wilkinson B.* // *Curr. Opin. Microbiol.* 2019. V. 51. P. 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
2. *Miethke M., Pieroni M., Weber T., Brönstrup M., Hammann P., Halby L., Arimondo P.B., Glaser P., Aigle B., Bode H.B., Moreira R., Li Y., Luzhetskyy A., Medema M. H., Pernodet J., Stadler M., Tormo J.R., Genilloud O., Truman A.W., Weissman K.J., Takano E., Sabatini S., Stegmann E., Brötz-Oesterhelt H., Wohlleben W., Seemann M., Empting M., Hirsch A.K.H., Loretz B., Lehr C.M., Titz A., Herrmann J., Jaeger T., Alt S., Hesterkamp T., Winterhalter M., Schiefer A., Pfarr K., Hoerauf A., Graz H., Graz M., Lindvall M., Ramurthy S., Karlén A., Dongen M., Petkovic H., Keller A., Peyrane F., Donadio S., Fraisse L., Pidcock L.J.V., Gilbert I.H., Moser H.E., Müller R.* // *Nat. Rev. Chem.* 2021. V. 5. P. 726–749. <https://doi.org/10.1038/s41570-021-00313-1>
3. *Bernal F.A., Hammann P., Kloss F.* // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2022. V. 78. P. 102783.

- <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102783>
4. Cook M.A., Wright G.D. // *Sci. Transl. Med.* 2022. V. 14. P. eabo7793.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abo7793>
 5. Dai J., Han R., Xu Y., Li N., Wang J., Dan W. // *Bioorg. Chem.* 2020. V. 101. P. 103922.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103922>
 6. Atanasov A., Zotchev S., Dirsch V., Orhan I., Banach M., Rollinger J., Barreca D., Weckwerth W., Bauer R., Edward B., Majeed M., Bishayee A., Bochkov V., Bonn G., Braidly N., Bucar F., Cifuentes A., D'Onofrio G., Bodkin M., Supuran C. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2021. V. 20. P. 1–17.
<https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>
 7. Newman D.J., Cragg G.M. // *J. Nat. Prod.* 2020. V. 83. P. 770–803.
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
 8. Baranova A.A., Alferova V.A., Korshun V.A., Tyurin A.P. // *Life.* 2023. V. 13. P. 1073.
<https://doi.org/10.3390/life13051073>
 9. Walesch S., Birkelbach J., Jézéquel G., Haeckl F.P.J., Hegemann J.D., Hesterkamp T., Hirsch A.K.H., Hammann P., Müller R. // *EMBO Rep.* 2023. V. 24. P. e56033.
<https://doi.org/10.15252/embr.202256033>
 10. Баранова А.А., Алферова В.А., Коршун В.А., Тюрин А.П. // *Биоорг. химия.* 2020. Т. 46. С. 593–665. [Baranova A.A., Alferova V.A., Korshun V.A., Tyurin A.P. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. P. 903–971.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162020060023>
 11. Baranova A.A., Zakalyukina Y.V., Ovcharenko A.A., Korshun V.A., Tyurin A.P. // *Biology (Basel).* 2022. V. 11. P. 1676.
<https://doi.org/10.3390/biology11111676>
 12. Abdelaleem E.R., Samy M.N., Abdelmohsen U.R., Desoukey S.Y. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2022. V. 74. P. 8–16.
<https://doi.org/10.1111/lam.13559>
 13. Imai Y., Meyer K.J., Iinishi A., Favre-Godal Q., Green R., Manuse S., Caboni M., Mori M., Niles S., Ghiglieri M., Honrao C., Ma X., Guo J.J., Makriyanis A., Linares-Otaya L., Böhringer N., Wuisan Z.G., Kaur H., Wu R., Mateus A., Typas A., Savitski M.M., Espinoza J.L., O'Rourke A., Nelson K.E., Hiller S., Noinaj N., Schäberle T.F., D'Onofrio A., Lewis K. // *Nature.* 2019. V. 576. P. 459–464.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1791-1>
 14. Wang L., Ravichandran V., Yin Y., Yin J., Zhang Y. // *Trends Biotechnol.* 2019. V. 37. P. 492–504.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.10.003>
 15. Donia M.S., Fischbach M.A. // *Science.* 2015. V. 349. P. 1254766.
<https://doi.org/10.1126/science.1254766>
 16. Mousa W.K., Athar B., Merwin N.J., Magarvey N.A. // *Nat. Prod. Rep.* 2017. V. 34. P. 1302–1331.
<https://doi.org/10.1039/C7NP00021A>
 17. Chiumento S., Roblin C., Kieffer-Jaquinod S., Tachon S., Leprêtre C., Basset C., Adityarini D., Olleik H., Nicoletti C., Bornet O., Iranzo O., Maresca M., Hardré R., Fons M., Giardina T., Devillard E., Guerlesquin F., Couté Y., Atta M., Perrier J., Lafond M., Duarte V. // *Sci. Adv.* 2019. V. 5. P. eaaw9969.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw9969>
 18. Barber C.C., Zhang W. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2021. V. 48. P. kuab010.
<https://doi.org/10.1093/jimb/kuab010>
 19. Lewis K. // *Cell.* 2020. V. 181. P. 29–45.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.056>
 20. Pirolo M., Espinosa-Gongora C., Alberdi A., Eisenhofer R., Soverini M., Eriksen E.Ø., Pedersen K.S., Guardabassi L. // *Anim. Microbiome.* 2023. V. 5. P. 5.
<https://doi.org/10.1186/s42523-023-00226-y>
 21. Petrelli S., Buglione M., Riviaccio E., Ricca E., Baccigalupi L., Scala G., Fulgione D. // *Anim. Microbiome.* 2023. V. 5. P. 14.
<https://doi.org/10.1186/s42523-023-00235-x>
 22. Vasco K., Guevara N., Mosquera J., Zapata S., Zhang L. // *Anim. Microbiome.* 2022. V. 4. P. 65.
<https://doi.org/10.1186/s42523-022-00218-4>
 23. Kauter A., Epping L., Semmler T., Antao E.-M., Kannapin D., Stoeckle S.D., Gehlen H., Lübke-Becker A., Günther S., Wieler L.H., Walther B. // *Anim. Microbiome.* 2019. V. 1. P. 14.
<https://doi.org/10.1186/s42523-019-0013-3>
 24. O'Sullivan J.N., Rea M.C., O'Connor P.M., Hill C., Ross R.P. // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2019. V. 95. P. fiy241.

- <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy241>
25. *Wertz P.W., De Szalay S.* // *Antibiotics*. 2020. V. 9. P. 159. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040159>
26. *O'Sullivan J.N., O'Connor P.M., Rea M.C., O'Sullivan O., Walsh C.J., Healy B., Mathur H., Field D., Hill C., Ross R.P.* // *J. Bacteriol.* 2020. V. 202. P. e00639-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00639-19>
27. *O'Neill A.M., Worthing K.A., Kulkarni N., Li F., Nakatsuji T., McGrosso D., Mills R.H., Kalla G., Cheng J.Y., Norris J.M., Pogliano K., Pogliano J., Gonzalez D.J., Gallo R.L.* // *eLife*. 2021. V. 10. P. e66793. <https://doi.org/10.7554/eLife.66793>
28. *Swaney M.H., Kalan L.R.* // *Infect. Immun.* 2021. V. 89. P. e00695-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00695-20>
29. *Heilbronner S., Krismer B., Brötz-Oesterhelt H., Peschel A.* // *Nat. Rev. Microbiol.* 2021. V. 19. P. 726–739. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00569-w>
30. *Terekhov S.S., Smirnov I.V., Malakhova M.V., Samoilov A.E., Manolov A.I., Nazarov A.S., Danilov D.V., Dubiley S.A., Osterman I.A., Rubtsova M.P., Kostryukova E.S., Ziganshin R.H., Kornienko M.A., Vanyushkina A.A., Bukato O.N., Ilina E.N., Vlasov V.V., Severinov K.V., Gabibov A.G., Altman S.* // *PNAS*. 2018. V. 115. P. 9551–9556. <https://doi.org/10.1073/pnas.1811250115>
31. *Covington B.C., Seyedsayamdost M.R.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2022. V. 144. P. 14997–15001. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c05790>
32. *Egerszegi I., Rátky J., Solti L., Brüssow K.-P.* // *Arch. Anim. Breed.* 2003. V. 46. P. 245–256. <https://doi.org/10.5194/aab-46-245-2003>
33. Breed cards: Mangalitsa (Swallow-Belly Mangalitsa) Pig. https://www.pig333.com/articles/breed-cards-mangalitsa-swallow-belly-mangalitsa-pig_15977/
34. *Alhede M., Qvortrup K., Liebrechts R., Høiby N., Givskov M., Bjarnsholt T.* // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2012. V. 65. P. 335–342. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00956.x>
35. *Tihlaříková E., Neděla V., Đorđević B.* // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 2300. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38835-w>
36. *Muscariello L., Rosso F., Marino G., Giordano A., Barbarisi M., Cafiero G., Barbarisi A.* // *J. Cell. Physiol.* 2005. V. 205. P. 328–334. <https://doi.org/10.1002/jcp.20444>
37. *Bergmans L., Moisiadis P., Van Meerbeek B., Quirynen M., Lambrechts P.* // *Int. Endod. J.* 2005. V. 38. P. 775–788. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2005.00999.x>
38. *Grund E., Kroppenstedt R.M.* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1990. V. 40. P. 5–11. <https://doi.org/10.1099/00207713-40-1-5>
39. *Wei Q., Ma L.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. P. 20983–21005. <https://doi.org/10.3390/ijms141020983>
40. *Brandel J., Humbert N., Elhabiri M., Schalk I.J., Mislin G.L.A., Albrecht-Gary A.-M.* // *Dalton Trans.* 2012. V. 41. P. 2820. <https://doi.org/10.1039/c1dt11804h>
41. *Abdelaziz A.A., Kamer A.M.A., Al-Monofy K.B., Al-Madboly L.A.* // *Microb. Cell Fact.* 2022. V. 21. P. 262. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01988-x>
42. *Brodhagen M., Henkels M.D., Loper J.E.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. V. 70. P. 1758–1766. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1758-1766.2004>
43. *Esposito R., Speciale I., De Castro C., D'Errico G., Russo Krauss I.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 5395. <https://doi.org/10.3390/ijms24065395>
44. *Gogineni V., Chen X., Hanna G., Mayasari D., Hamann M.T.* // *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2020. V. 73. P. 490–503. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0321-6>
45. *Masson F., Lemaitre B.* // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2020. V. 84. P. e00089-20. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00089-20>
46. *Olofsson T.C., Butler È., Markowicz P., Lindholm C., Larsson L., Vásquez A.* // *Int. Wound J.* 2016. V. 13. P. 668–679. <https://doi.org/10.1111/iwj.12345>
47. *Varijakzhan D., Loh J.-Y., Yap W.-S., Yusoff K., Seboussi R., Lim S.-H.E., Lai K.-S., Chong C.-M.* // *Marine Drugs*. 2021. V. 19. P. 246.

- <https://doi.org/10.3390/md19050246>
48. *Abd-Elgawad M.M.M.* // *Life*. 2022. V. 12. P. 1360.
<https://doi.org/10.3390/life12091360>
 49. *Bassols A., Costa C., Eckersall P.D., Osada J., Sabrià J., Tibau J.* // *Proteomics Clin. Appl.* 2014. V. 8. P. 715–731.
<https://doi.org/10.1002/prca.201300099>
 50. *Heinritz S.N., Mosenthin R., Weiss E.* // *Nutr. Res. Rev.* 2013. V. 26. P. 191–209.
<https://doi.org/10.1017/S0954422413000152>
 51. *Espinosa-Gongora C., Larsen N., Schønning K., Fredholm M., Guardabassi L.* // *PLoS One*. 2016. V. 11. P. e0160331.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160331>
 52. *Chlebicz A., Śliżewska K.* // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2018. V. 15. P. 863.
<https://doi.org/10.3390/ijerph15050863>
 53. *Meurens F., Summerfield A., Nauwynck H., Saif L., Gerdts V.* // *Trends Microbiol.* 2012. V. 20. P. 50–57.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.11.002>
 54. *Gaskins H.R.* // In: *Swine Nutrition* / Eds. Lewis A.J., Southern L.L. CRC Press, 2000. P. 585–609.
<https://doi.org/10.1201/9781420041842>
 55. *Crespo-Piazuelo D., Estellé J., Revilla M., Criado-Mesas L., Ramayo-Caldas Y., Óvilo C., Fernández A.I., Ballester M., Folch J.M.* // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 12727.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-30932-6>
 56. *Isaacson R., Kim H.B.* // *Anim. Health Res. Rev.* 2012. V. 13. P. 100–109.
<https://doi.org/10.1017/S1466252312000084>
 57. *Correa-Fiz F., Gonçalves dos Santos J.M., Illas F., Aragon V.* // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 6545.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-43022-y>
 58. *Correa-Fiz F., Fraile L., Aragon V.* // *BMC Genomics*. 2016. V. 17. P. 404.
<https://doi.org/10.1186/s12864-016-2700-8>
 59. *Obregon-Gutierrez P., Aragon V., Correa-Fiz F.* // *Pathogens*. 2021. V. 10. P. 697.
<https://doi.org/10.3390/pathogens10060697>
 60. *Correa-Fiz F., Neila-Ibáñez C., López-Soria S., Napp S., Martínez B., Sobrevia L., Tibble S., Aragon V., Migura-García L.* // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. P. 20354.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-77313-6>
 61. *Wang T., He Q., Yao W., Shao Y., Li J., Huang F.* // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 1083.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01083>
 62. *Dai H., Chen A., Wang Y., Lu B., Wang Y., Chen J., Huang Y., Li Z., Fang Y., Xiao T., Cai H., Du Z., Wei Q., Kan B., Wang D.* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2019. V. 69. P. 852–858.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003248>
 63. *Matias Rodrigues J.F., Schmidt T.S.B., Tackmann J., Mering C. von* // *Bioinformatics*. 2017. V. 33. P. 3808–3810.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx517>
 64. *Wang F., Gai Y., Chen M., Xiao X.* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009. V. 59. P. 2759–2762.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.008912-0>
 65. *Touchette D., Altshuler I., Gostinčar C., Zalar P., Raymond-Bouchard I., Zajc J., McKay C.P., Gunde-Cimerman N., Whyte L.G.* // *ISME J.* 2022. V. 16. P. 221–232.
<https://doi.org/10.1038/s41396-021-01030-9>
 66. *Raza M., Zhang Z.-F., Hyde K.D., Diao Y.-Z., Cai L.* // *Fungal Diversity*. 2019. V. 99. P. 1–104.
<https://doi.org/10.1007/s13225-019-00434-5>
 67. *Bennur T., Ravi Kumar A., Zinjarde S.S., Javdekar V.* // *J. Appl. Microbiol.* 2016. V. 120. P. 1–16.
<https://doi.org/10.1111/jam.12950>
 68. *Xu D., Nepal K.K., Chen J., Harmody D., Zhu H., McCarthy P.J., Wright A.E., Wang G.* // *Synth. Syst. Biotechnol.* 2018. V. 3. P. 246–251.
<https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.10.008>
 69. *Vela A.I., Sánchez-Porro C., Aragón V., Olvera A., Domínguez L., Ventosa A., Fernández-Garayzábal J.F.* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010. V. 60. P. 2446–2450.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.016626-0>
 70. *Vela A.I., Arroyo E., Aragon V., Sanchez-Porro C., Latre M.V., Cerda-Cuellar M., Ventosa A., Dominguez L., Fernandez-Garayzabal J.F.* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009. V. 59. P. 671–674.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.006205-0>
 71. *Fusco V., Quero G.M., Cho G.-S., Kabisch J., Meske D., Neve H., Bockelmann W., Franz C.M.A.P.* // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. P. 155.

- <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00155>
72. *Borgo F., Ballestriero F., Ferrario C., Fortina M.G.* // *Ann. Microbiol.* 2015. V. 65. P. 833–839.
<https://doi.org/10.1007/s13213-014-0924-x>
73. *Gaaloul N., Ben Braïek, O., Berjeaud J.M., Arthur T., Cavera V.L., Chikindas M.L., Hani K., Ghraïri T.* // *J. Food Saf.* 2014. V. 34. P. 300–311.
<https://doi.org/10.1111/jfs.12126>
74. *Guarino A., Giannella R., Thompson M.R.* // *Infect. Immun.* 1989. V. 57. P. 649–652.
<https://doi.org/10.1128/iai.57.2.649-652.1989>
75. *Rieusset L., Rey M., Muller D., Vacheron J., Gerin F., Dubost A., Comte G., Prigent-Combaret C.* // *Microb. Biotechnol.* 2020. V. 13. P. 1562–1580.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13598>
76. *Kudo S., Morimoto Y.V., Nakamura S.* // *Microbiology.* 2015. V. 161. P. 701–707.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.000031>
77. *Dickerman A., Bandara A.B., Inzana T.J.* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020. V. 70. P. 180–186.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003730>
78. *Fuller A.T., Horton J.M.* // *J. Gen. Microbiol.* 1950. V. 4. P. 417–433.
<https://doi.org/10.1099/00221287-4-3-417>
79. *Caulier S., Nannan C., Gillis A., Licciardi F., Bragard C., Mahillon J.* // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 302.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>
80. *Tyurin A., Alferova V., Korshun V.* // *Microorganisms.* 2018. V. 6. P. 52.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms6020052>
81. *Björkroth K.J., Schillinger U., Geisen R., Weiss N., Hoste B., Holzapfel W.H., Korkeala H.J., Vandamme P.* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002. V. 52. P. 141–148.
<https://doi.org/10.1099/00207713-52-1-141>
82. *Fortina M.G., Ricci G., Mora D., Manachini P.L.* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004. V. 54. P. 1717–1721.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.63190-0>
83. *Jančić U., Gorgieva S.* // *Pharmaceutics.* 2021. V. 14. P. 76.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010076>
84. *Muthukrishnan P., Chithra Devi D., Mostafa A.A., Alsamhary K.I., Abdel-Raouf N., Nageh Sholkamy E.* // *J. Infect. Public Health.* 2020. V. 13. P. 1522–1532.
<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.025>
85. *Baranova A.A., Chistov A.A., Tyurin A.P., Prokhorenko I.A., Korshun V.A., Biryukov M.V., Alferova V.A., Zakalyukina Y.V.* // *Microorganisms.* 2020. V. 8. P. 1948.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8121948>
86. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, 11th Ed. // *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Wayne, USA, 2015.*
<https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m07/>
87. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 25th Informational Supplement* // *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Wayne, USA, 2015.*
https://clsi.org/media/1631/m02a12_sample.pdf
88. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*, 3rd Ed. // *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Wayne, USA, 2008.*
https://clsi.org/media/1461/m27a3_sample.pdf
89. *Smith A.C., Hussey M.A.* // *Gram Stain Protocols.* American Society for Microbiology, 2005.
<https://asm.org/getattachment/5c95a063-326b-4b2f-98ce-001de9a5ece3/gram-stain-protocol-2886.pdf>
90. *Glass N.L., Donaldson G.C.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. V. 61. P. 1323–1330.
<https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995>
91. *White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.* // In: *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications.* Academic Press, Cambridge, Massachusetts, U.S., 1990. P. 315–322.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
92. *Lane D.J., Stackebrandt E., Goodfellow M.* // *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic.* Wiley, Hoboken, New Jersey, U.S., 1991.
93. *Glauert A.M.* // *Practical Methods in Electron Microscopy.* North-Holland Publishing Company, Amsterdam, London, 1974.
94. *Wang M., Carver J.J., Phelan V.V., Sanchez L.M., Garg N., Peng Y., Nguyen D.D., Watrous J., Kapono C.A., Luzzatto-Knaan T., Porto C., Bouslimani A., Melnik A.V.,*

Meehan M.J., Liu W.-T., Crüsemann M., Boudreau P.D., Esquenazi E., Sandoval-Calderón M., Kersten R.D., Pace L.A., Quinn R.A., Duncan K.R., Hsu C.-C., Floros D.J., Gavilan R.G., Kleigrewe K., Northen T., Dutton R.J., Parrot D., Carlson E.E., Aigle B., Michelsen C.F., Jelsbak L., Sohlenkamp C., Pevzner P., Edlund A., McLean J., Piel J., Murphy B.T., Gerwick L., Liaw C.-C., Yang Y.-L., Humpf H.-U., Maansson M., Keyzers R.A., Sims A.C., Johnson A.R., Sidebottom A.M., Sedio B.E., Klitgaard A., Larson C.B., Boya P C.A., Torres-Mendoza D., Gonzalez D.J., Silva D.B., Marques L.M., Demarque D.P., Pociute E., O'Neill E.C., Briand E., Helfrich E.J.N., Granatosky E.A., Glukhov E., Ryffel F., Houson H., Mohimani H., Kharbush J.J., Zeng Y., Vorholt J.A., Kurita K.L., Charusanti P., McPhail K.L., Nielsen K.F., Vuong L.,

Elfeki M., Traxler M.F., Engene N., Koyama N., Vining O.B., Baric R., Silva R.R., Mascuch S.J., Tomasi S., Jenkins S., Macherla V., Hoffman T., Agarwal V., Williams P.G., Dai J., Neupane R., Gurr J., Rodriguez A.M.C., Lamsa A., Zhang C., Dorrestein K., Duggan B.M., Almaliti J., Allard P.-M., Phapale P., Nothias L.-F., Alexandrov T., Litaudon M., Wolfender J.-L., Kyle J.E., Metz T.O., Peryea T., Nguyen D.-T., VanLeer D., Shinn P., Jadhav A., Müller R., Waters K.M., Shi W., Liu X., Zhang L., Knight R., Jensen P.R., Palsson B.Ø., Pogliano K., Lington R.G., Gutiérrez M., Lopes N.P., Gerwick W.H., Moore B.S., Dorrestein P.C., Bandeira N. // Nat. Biotechnol. 2016. V.34. P. 828–837.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3597>

Antimicrobial Metabolites from Pig Nasal Microbiota

A. A. Baranova*, Y. V. Zakalyukina**, A. P. Tyurin*, V. A. Korshun*, O. A. Belozerova*, M. V. Biryukov***, A. V. Moiseenko* ***, S. S. Terekhov*, and V. A. Alferova*,#

Phone: +7 (926) 611-36-49; e-mail: alferovava@gmail.com

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

** Department of Soil Science, Lomonosov Moscow State University, ul. Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia

*** Department of Biology, Lomonosov Moscow State University, ul. Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia

The mammal microbiome is considered an attractive source of bioactive compounds, including antibiotics. In this work, we studied cultivable microorganisms from the nasal microbiota of the Hungarian domestic pig (*Sus domesticus*). Taxonomy positions of the 20 isolated strains (18 bacteria, 1 yeast, 1 fungus) were determined by phylogenetic analysis, morphological study and a substrate utilization assay. The strains were subjected to antibiotic susceptibility testing and antimicrobial activity screening. *Pseudomonas aeruginosa* strain SM-11 was found to produce 4 known antibacterial molecules (pyocyanine, pyochelin, pyoluteorin, monorhamnolipid). Production of pyocyanine was induced by cocultivation with test microorganisms *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25922. The results suggest that the mammal microbiota might serve as a valuable source of antimicrobial-producing strains, including those of rare taxa. Cocultivation techniques are promising approach to explore antimicrobials from silent biosynthetic gene clusters.

Keywords: respiratory tract, nasal microbiome, domestic pig, *Sus domesticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotics, ESEM



УДК 547.724.1:547.727:547.824:547.825

СИНТЕЗ И ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ НОВЫХ НИКОТИНОНИТРИЛ-ФУРАНОВЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ГИБРИДОВ

© 2024 г. Д. А. Тильченко*, **, Е. Ю. Бибик*, **, В. В. Доценко***, ****, #,
С. Г. Кривоколыско*, *****, К. А. Фролов*, *****, Н. А. Аксенов****, И. В. Аксенова****

* Луганский государственный медицинский университет имени Святителя Луки,
Россия, 91045 Луганск, кв. 50-летия Обороны Луганска, 1г

** Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
Россия 308015, Белгород, ул. Победы, 85

*** Кубанский государственный университет,
Россия, 350040, Краснодар, ул. Ставропольская, 149

**** Северо-Кавказский федеральный университет,
Россия, 355009, Ставрополь, ул. Пушкина 1

***** Луганский государственный университет имени Владимира Даля,
Россия, 91034 Луганск, кв. Молодежный, 20А

Поступила в редакцию 28.08.2023 г.

После доработки 10.09.2023 г.

Принята к публикации 11.09.2023 г.

На основе цианотиоацетамида и фурфурола получены новые гибридные соединения, содержащие фрагменты 4-(2-фурил)-1,4-дигидроникотинитрила и 4-(2-фурил)-1,4,5,6-тетрагидроникотинитрила. Исследованы особенности гипогликемической активности полученных соединений *in vivo* при дексаметазоновом сахарном диабете у крыс в период выраженных старческих изменений. Обнаружены соединения, показавшие гипогликемическое действие, превосходящее таковое для препарата сравнения метформина.

Ключевые слова: цианотиоацетамид, фурфурол, частично гидрированные никотинитрилы, гипогликемическое действие, стероидный сахарный диабет

DOI: 10.31857/S0132342324020068, EDN: ONDZDA

ВВЕДЕНИЕ

Для разработки фармакологических препаратов повышенной эффективности в последние годы используется концепция молекулярной гибридизации – объединение двух или более фармакофорных скаффолдов в одной молекуле [1–3]. Концепция основана на предположении, что одна молекула проявляет структурные особенности двух (или более) “родительских” фармакофорных молекул, которые независимо действуют на две различные фармакологи-

ческие мишени. Наличие двух или более фармакофорных субъединиц в одной молекуле часто приводит к синергическому действию, превышающему сумму эффектов отдельных соединений [3]. Молекулярные гибриды активно используются в комбинированной терапии болезни Альцгеймера [4–7], паразитарных заболеваний [4, 5], онкологических заболеваний [5, 8], туберкулеза и грибковых заболеваний [9–11], нейродегенеративных процессов [12], малярии [13, 14], а также для лечения коинфекций ВИЧ + туберкулез [15] и др.

Сокращения: Мf – морфолин; NMM – N-метилморфолин; АЛТ – аланинаминотрансфераза; АСТ – аспаратаминотрансфераза; ГКС – глюкокортикостероид; ДМСО – диметилсульфоксид; ДМФА – диметилформамид; СД – сахарный диабет; ЩЖ – щитовидная железа.

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

Известно, что производные 1,4-дигидро- и тетрагидроникотинонитрила обладают разнообразным биологическим действием. Так, 1,4-дигидропиридин-3-карбонитрилы (**I**, **II**) проявляют антиоксидантные и гепатопротекторные свойства [16, 17], соединения (**III**, **IV**) обладают противовирусной активностью [18] (рис. 1). Кроме того, у родственных пиридо-1,3,5-тиадиазинов (**4**) выявлен аналептический эффект [19], показано противовоспалительное [20], адаптогенное [21] и анальгетическое действие [22]. Сообщается [23], что соединение (**V**) обладает противовирусным действием, соединения (**VI**, **VII**) – сильные анальгетики [22], а соединение (**VIII**) ингибирует аутоаксин [24]. 1,4-Дигидропиридин-3-карбонитрилы, конъюгированные с остатками α -D-глюко- или галактопиранозы (структура (**IX**)), рис. 1), оказывают выраженное противоопухолевое действие [25]. Ряд селенсодержащих частично насыщенных никотинонитрилов активен в отношении вируса клещевого энцефалита в микромолярных концентрациях *in vitro* [26]. В целом следует отметить высокий потенциал производных никотинонитрила для поиска новых биологически активных субстанций (обзорные работы [27–35]).

В современной медицинской практике уже используется ряд молекулярных гибридов на основе

производных фурана. Среди них стоит отметить анальгетик мирфентанил, противомикробные препараты фуразолин, фурадонин, диуретик фуросемид, гипотензивный агент празозин и ряд других. Для многих производных фурана задокументирована биологическая активность [36, 37], а 2-фурильный фрагмент – известный фармакофорный остаток.

Из литературных данных известно, что гибридные молекулы общей структуры (**X**) (рис. 2), сочетающие 2-фурильный и 1,4-дигидроникотинонитрильный фрагменты, обладают активностью в отношении вируса омской геморрагической лихорадки [18], оказывают анальгетическое [38–43] и противовоспалительное [44] действие. Соединение (**XI**) [26, 45] проявляет умеренно выраженное противовирусное действие. По данным виртуального скрининга, соединение (**XII**) обладает сродством к аденозиновому рецептору A_{2A} [46]. Дигидропиридин (**XIII**) – селективный модулятор глюкокортикоидных рецепторов с потенциальной противовоспалительной эффективностью [47]. Согласно патентным данным [48], соединения (**XIV**) ингибируют тирозинкиназу с-Met. Соединение (**XV**) – сильный ингибитор ацетилхолинэстеразы, перспективный для терапии болезни Альцгеймера [49]. 1,4-Дигидроникотинонитрил (**XVI**) методом высокопроизводительного скрининга

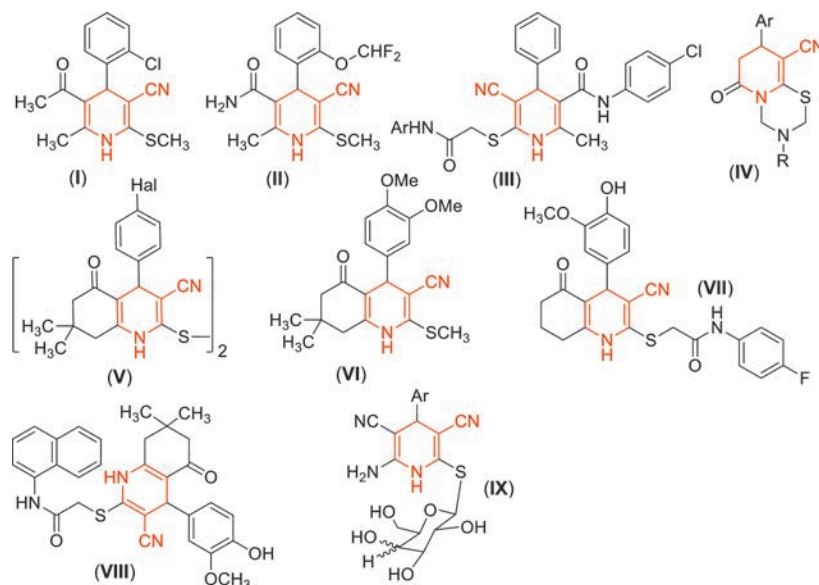


Рис. 1. Биологически активные 1,4-дигидроникотинонитрилы.

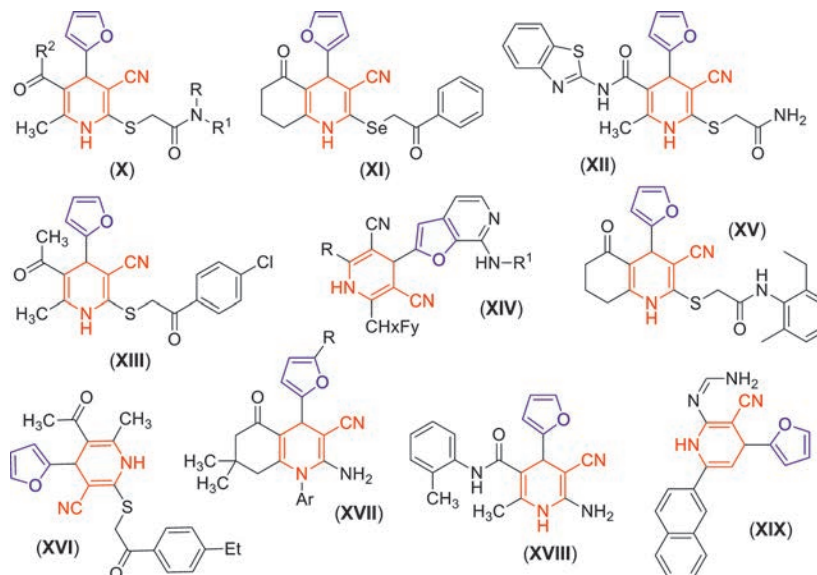


Рис. 2. Биологически активные гибридные молекулы с 2-фурильным и 1,4-дигидроникотинитрильным фрагментами.

идентифицирован как ингибитор AmpC β -лактамазы [50]. 4-(2-Фурил)хинолины (XVII) в опытах *in vitro* показали незначительную противоопухолевую активность [51, 52], тогда как 4-(2-фурил)-1,4-дигидроникотинитрилы (XVIII) [53] и (XIX) [54] проявили высокую цитотоксичность в отношении ряда линий раковых клеток. Данные о молекулярных гибридах, содержащих 2-фурильный и 1,4,5,6-тетрагидроникотинитрильный фрагменты, менее многочисленны. Так, в литературе упоминается противовирусное [26] и анальгетическое [38, 41] действие таких соединений.

Таким образом, создание гибридных молекул, сочетающих в себе остатки фуранового цикла и 1,4-дигидро- или 1,4,5,6-тетрагидроникотинитрила, представляется перспективным направлением поиска новых биологически активных соединений.

Цель настоящего исследования – синтез новых никотинитрил-фурановых гибридных молекул на основе цианотиоацетамида и изучение их гипогликемической активности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез никотинитрил-фурановых гибридных молекул. Для исследования гипогликемического действия из синтезированной библиотеки

4-(2-фурил)никотинитрилов (>100 соединений) были отобраны четыре соединения (XX–XXIII) (схемы 1, 2). Для соединений (XX–XXIII) поиск протеиновых мишеней с использованием протокола протеин-лигандного докинга GalaxySagittarius [55] на базе веб-сервера GalaxyWeb [56, 57], а также сервиса SwissTarget Prediction [58] показал сродство к следующим мишеням: 1) связанному с G-белком рецептором GPR119, отвечающим за регуляцию глюкозозависимой секреции инкретинов и инсулина [59]; 2) родопсиноподобному рецептору GPR142, стимулирующему секрецию инсулина [60, 61]; 3) ферменту киназа-3-гликогенсинтазе (GSK3B), ингибиторы которой снижают уровень глюкозы в крови [62]; 4) глюкокиназе (гексокиназе VI, GCK) [63–65]; 5) рецепторам, активируемым пероксисомными пролифераторами PPAR α , PPAR γ – связывание с этими рецепторами способствует снижению инсулинорезистентности, уменьшению уровня глюкозы в крови и нормализации липидного обмена [66, 67]; 6) рецепторам свободных жирных кислот FFAR1 (GPR40), регуляторам секреции инсулина [68, 69]. В целом для соединений (XX–XXIII), обладающих сродством к указанным мишеням, можно предполагать гипогликемический эффект *in vivo*.

Синтез соединений (XX) и (XXI) осуществляли по схеме 1. Цианотиоацетамид (XXIV) реагировал

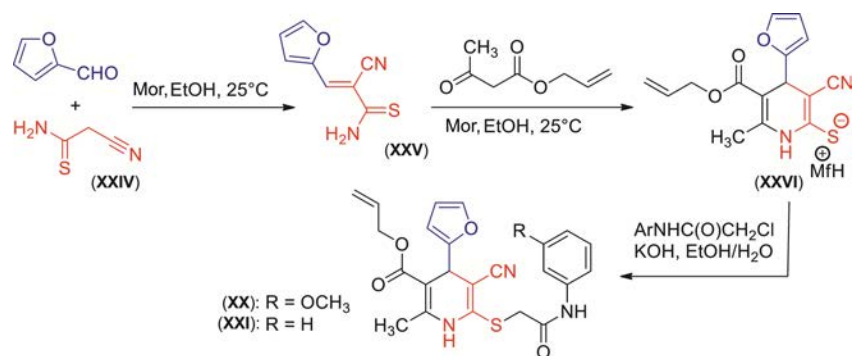


Схема 1. Синтез соединений (XX) и (XXI).

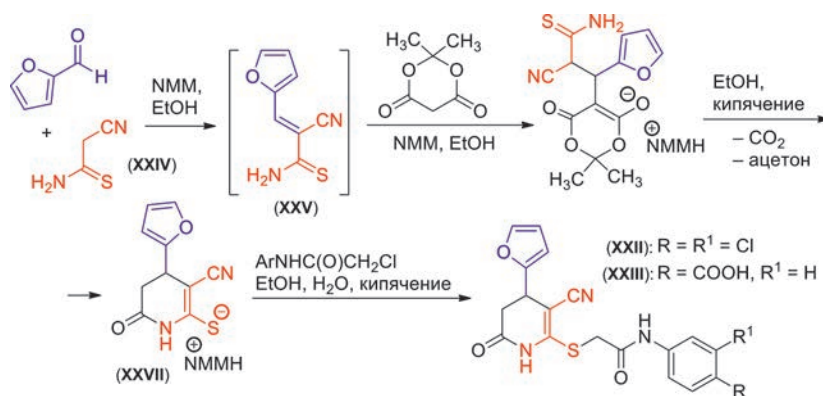


Схема 2. Синтез соединений (XXII) и (XXIII).

с фурфуролом в присутствии каталитического количества морфолина (Mor); продукт конденсации Кнёвенагеля (XXV) вводили далее в реакцию *in situ* с аллилацетоацетатом и избытком морфолина. Полученный пиридин-2-тиолат (XXVI) подвергали *S*-алкилированию в присутствии щелочи соответствующими α -хлорацетанилидами.

Соединения (XXII) и (XXIII) также были синтезированы из цианотиоацетамида (XXIV). Так, реакцией тиоамида (XXIV) с фурфуролом и кислотой Мельдрума в присутствии избытка *N*-метилморфолина (NMM) известным [38, 70–72] способом был получен 6-оксо-4-(2-фурил)-3-цианотетрагидропиридин-2-тиолат *N*-метилморфолия (XXVII). Алкилированием тиолата (XXVII) замещенными α -хлорацетанилидами в водно-спиртовом растворе были получены целевые никотинитрилы (XXII) и (XXIII) (схема 2).

Соединения (XX–XXIII) представляют собой мелкокристаллические вещества белого или беже-

вого цвета, плохо растворимые в этаноле, умеренно растворимые в ацетоне, хорошо растворимые в ДМФА и ДМСО. Их строение подтверждено комплексом спектральных данных ^1H -, ^{13}C -ЯМР и Фурье-ИК-спектрофотометрии.

Гипогликемическое действие соединений (XX–XXIII) *in vivo*. Синтезированные гибридные соединения (XX–XXIII) исследовали на наличие гипогликемической активности (способности снижать уровень глюкозы в крови) в эксперименте по изучению течения дексаметазонового сахарного диабета (СД) у крыс в период выраженных старческих изменений.

Дексаметазон – фторированный глюкокортико-стероид (ГКС). Известно, что длительный прием ГКС за счет прямой стимуляции глюконеогенеза вызывает гипергликемию. Отмечено также прямое повреждающее действие на β -клетки поджелудочной железы. Высокие дозы ГКС нарушают секреторную функцию β -клеток и приводят к развитию

инсулинорезистентности. Механизм нарушения регуляции обмена углеводов и липидов связывают в основном с прямым влиянием ГКС на экспрессию транспортеров глюкозы GLUT1 и GLUT4, а также инактивацией митохондриальной FAD-глицерофосфатдегидрогеназы, что приводит к инсулинорезистентности, снижению утилизации глюкозы адипоцитами и нарушению индуцированной глюкозой секреции инсулина.

Эксперимент проводили на белых беспородных крысах, которых разделили на семь групп: интактную, контрольную, референтную и четыре опытные группы (для каждого из исследуемых соединений (XX–XXIII)). Всем крысам, кроме животных интактной группы, для развития СД вводили дексаметазон (в дозировке 125 мкг/кг ежедневно в течение 13 сут) [73]. Далее проводили фармакокоррекцию СД в течение трех недель. В качестве препарата сравнения, которым проводили фармакокоррекцию СД в референтной группе, использовали гипогликемический агент метформин (1,1-диметилбигуанида гидрохлорид). Интервал применяемых доз, согласно утвержденной инструкции по применению препарата метформин, составляет 1000–3000 мг в сутки. Принимая во внимание среднюю массу тела человека для Евразийского континента – 70 кг, можно вычислить дозу в пересчете мг/кг массы тела для человека, она составляет 14.29–42.86 мг/кг. Используя предложенный в работе [74] метод экстраполяции доз, принимая во внимание коэффициент для лабораторной крысы (3.62) и коэффициент для человека (0.57) и, соответственно, перемножив эти коэффициенты, получаем общий коэффициент, на который следует умножить дозу метформина. Таким образом, доза метформина для использования его как референтного препарата (препарата сравнения) находится в диапазоне 90.74–272.16 мг/кг. Принимая во внимание относительную безопасность данного лекарственного средства и то, что в литературе встречаются данные об использовании дозы метформина в экспериментах на крысах до 400 мг/кг, нами было принято решение применять данное лекарственное средство в дозе, близкой к верхней границе нормы – 200 мг/кг. Исследуемые

новые гетероциклические соединения (XX–XXIII) вводили животным из расчета 1 мг/кг массы тела. Опытные соединения и препарат сравнения вводили *per os* в виде свежеприготовленной суспензии через атравматический зонд ежедневно в течение трех недель. Животным контрольной группы вводили плацебо (физиологический раствор). Динамика изменения массы тела во всех экспериментальных группах крыс представлена на рис. 3.

Рис. 3 отражает весь период эксперимента. Первый столбец – средняя начальная масса крыс (принята за 100%). Второй и третий столбцы – двухнедельный этап моделирования СД на первом этапе эксперимента. Два последних столбца – вес животных на этапе фармакокоррекции. Все время эксперимента животные интактной группы продолжали набирать массу тела согласно средним темпам, характерным для данной возрастной категории. Масса тела животных остальных групп на этапе моделирования СД стабильно снижалась. Однако начиная с третьей недели, когда животным было прекращено введение дексаметазона и начата фармакокоррекция соединениями (XX–XXIII) и метформинном, масса крыс стала постепенно увеличиваться. Поскольку этот феномен наблюдался и в контрольной группе, вероятно, это связано с отменой дексаметазона. Набор веса наблюдался у животных всех групп, кроме интактной, но только в трех группах масса тела животных не достигла первоначальных значений – это группы, которые получали метформин (97.83%) и соединения (XX) и (XXII) (95.51 и 97.03% соответственно). Этот факт заставляет предположить способность метформина и соединений (XX) и (XXII) уменьшать интенсивность синдрома отмены ГКС. Следует отметить, что согласно данным виртуального скрининга *in silico*, среди потенциальных мишеней соединений (XX) и (XXII) отмечены рецепторы кортикотропин-рилизинг-гормона 1-го типа (CRHR1). Известно, что ген рецептора CRHR1 вовлечен в регуляцию эндогенного уровня кортикостероидов и может оказывать влияние на ответ на глюкокортикостероиды, назначаемые экзогенно [75, 76].

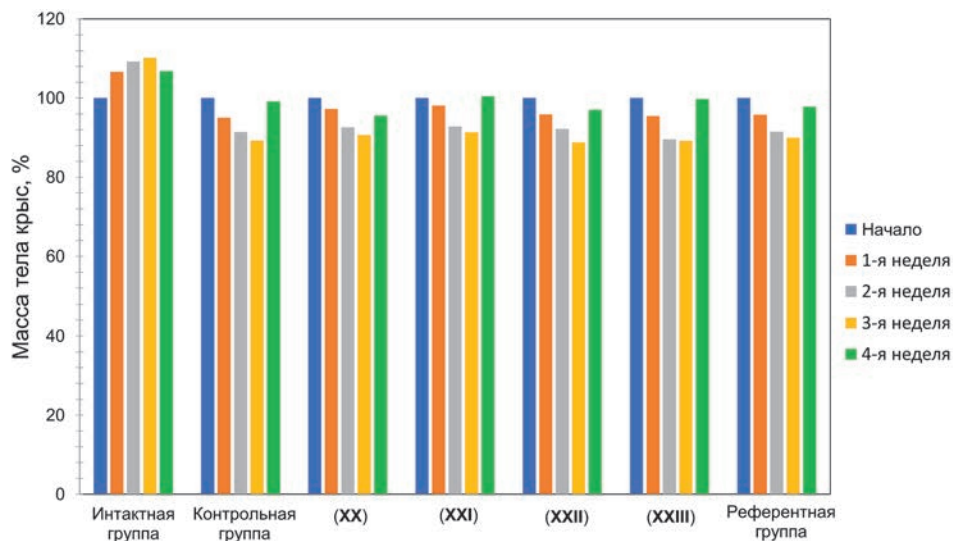


Рис. 3. Динамика изменения массы тела крыс на фоне моделирования дексаметазонового сахарного диабета с последующей фармакокоррекцией соединениями (XX–XXIII) и референтным препаратом метформином. Отличия значений в опытных, контрольной и референтной группах достоверны в сравнении с интактной группой ($p \leq 0.05$).

Согласно визуальным наблюдениям, у животных, получавших дексаметазон, отмечались изменения внешнего вида и поведенческих реакций, в соответствии с развитием ожидаемого СД. На протяжении эксперимента зафиксирована гибель 10 животных. Смерть наступила от осложнения СД, поскольку у погибших крыс были все признаки макроангиопатий (гангренозные изменения мордочки, хвоста и конечностей). Погибшие животные были в контрольной группе и опытных группах соединений (XXII) и (XXIII). В интактной и референтной группах, а также в опытных группах соединений (XX) и (XXI) погибших не было.

Данные замеров органомерических показателей щитовидной железы представлены в табл. 1. Как видно из табл. 1, высота и ширина щитовидной железы крыс в интактной и контрольной группах находятся в пределах статистической погрешности. Кроме того, у всех животных, получавших одно из соединений (XX–XXIII), высота щитовидной железы была больше, чем у животных интактной и контрольной групп. Относительно ширины органа отмечено, что у крыс интактной, контрольной групп и крыс опытной группы (XX) этот показатель был примерно одинаков (достоверность отличий

в пределах статистической ошибки). Показатель ширины щитовидной железы остальных опытных групп существенных изменений не претерпевал, но средняя величина этого показателя была ниже, чем в предыдущих трех группах.

Также после забоя крыс для измерения органомерических показателей из брюшной полости извлекали печень. Для дальнейшего сравнительного анализа производили замеры всех долей печени. Полученные данные представлены в табл. 2 и 3. Наиболее выраженные изменения на органомерическом уровне обнаружены у крыс контрольной группы. Как видно из табл. 2 и 3, измеренные линейные размеры долей печени крыс отличаются в разных группах. Так, в контрольной группе животных выявлены достоверные отличия в длине всех долей печени, кроме пятой. Анализируя полученные данные в опытных группах, следует отметить отсутствие достоверных отличий при сравнении с показателями в интактной группе по значениям длины долей печени у крыс, получавших соединение (XX). У крыс опытных групп, получавших фармакокоррекцию дексаметазонового СД соединениями (XXII) и (XXIII), зафиксированы достоверные увеличения длины первой, второй, пятой и шестой долей печени.

Таблица 1. Результаты замеров щитовидной железы крыс в модели дексаметазонового сахарного диабета после фармакокоррекции соединениями (XX–XXIII)

Показатель	Статистические параметры*	Группа животных						референтная
		интактная	контрольная	(XX)	(XXI)	(XXII)	(XXIII)	
Высота, см	M	1.63	1.61	2.00	1.84	1.88	1.96	1.93
	m	0.1	0.1	0.09	0.12	0.12	0.12	0.04
	σ^2	0.1242	0.0936	0.15	0.2386	0.1814	0.2176	0.0309
	σ	0.3525	0.3060	0.3872	0.4885	0.4259	0.4664	0.1759
	V	7.62	5.82	7.5	12.97	9.65	11.1	100.01
	n	12	9	17	17	14	13	17
Ширина, см	M	2.61	2.57	2.56	2.38	2.33	2.34	2.47
	m	0.28	0.22	0.17	0.13	0.19	0.24	0.06
	σ^2	0.9717	0.4400	0.4650	0.2994	0.4490	0.7709	0.0560
	σ	0.9858	0.6633	0.6819	0.5471	0.6701	0.8780	0.2366
	V	37.23	17.12	23.25	5.46	8.15	32.9	22.7
	n	12	9**	17	17	14**	13**	17

* Для каждого массива данных были вычислены среднее значение (M), стандартная ошибка (m), стандартное среднеквадратичное отклонение (σ), дисперсия значений (σ^2) и коэффициент вариации (V).

** В этих группах была зарегистрирована гибель крыс от осложнений СД.

Таблица 2. Длина долей печени крыс экспериментальных групп ($M \pm m$, $n = 9-17$)

Группа животных	Длина долей, см					
	первой	второй	третьей	четвертой	пятой	шестой
Интактная	4.09 ± 0.25	2.78 ± 0.18	2.55 ± 0.24	2.08 ± 0.19	1.92 ± 0.23	2.30 ± 0.13
Контрольная	5.50 ± 0.46*	3.12 ± 0.22*	2.97 ± 0.30*	2.58 ± 0.18*	1.93 ± 0.25	2.71 ± 0.20*
(XX)	4.68 ± 0.16	3.09 ± 0.16	2.52 ± 0.20	2.24 ± 0.19	2.14 ± 0.18	2.49 ± 0.16
(XXI)	4.40 ± 0.10	3.35 ± 0.13*	2.68 ± 0.16	2.36 ± 0.13	2.44 ± 0.13*	2.42 ± 0.15
(XXII)	4.86 ± 0.12*	3.64 ± 0.19*	2.24 ± 0.13	2.16 ± 0.12	3.03 ± 0.12*	3.03 ± 0.17*
(XXIII)	4.74 ± 0.19*	3.37 ± 0.24*	2.55 ± 0.16	2.28 ± 0.13	2.43 ± 0.24*	2.89 ± 0.12*
Референтная	4.71 ± 0.09*	3.28 ± 0.1*	2.50 ± 0.04	2.35 ± 0.06	2.44 ± 0.09*	2.51 ± 0.07

* Достоверные отличия по отношению к интактной группе ($p \leq 0.05$).

Таблица 3. Высота долей печени крыс экспериментальных групп ($M \pm m$, $n = 9-12$)

Группа животных	Высота долей, см					
	первой	второй	третьей	четвертой	пятой	шестой
Интактная	2.27 ± 0.06	1.75 ± 0.11	1.58 ± 0.19	1.20 ± 0.15	0.75 ± 0.07	1.74 ± 0.17
Контрольная	2.53 ± 0.18*	1.83 ± 0.17	1.82 ± 0.17*	1.61 ± 0.18*	0.89 ± 0.04	2.31 ± 0.09*
(XX)	2.39 ± 0.10	1.49 ± 0.16	1.04 ± 0.07	0.94 ± 0.06	0.97 ± 0.09	2.46 ± 0.18*
(XXI)	2.52 ± 0.10*	1.65 ± 0.13	1.65 ± 0.12	1.12 ± 0.07	1.00 ± 0.06	2.02 ± 0.13
(XXII)	2.59 ± 0.12*	2.89 ± 0.17*	1.26 ± 0.14	1.07 ± 0.06	0.95 ± 0.05	2.65 ± 0.16*
(XXIII)	2.62 ± 0.17*	2.28 ± 0.20*	1.75 ± 0.14	1.18 ± 0.08	1.04 ± 0.08	2.229 ± 0.09*
Референтная	2.49 ± 0.08	1.64 ± 0.06	1.39 ± 0.04	1.05 ± 0.06	0.92 ± 0.06	2.28 ± 0.08*

* Достоверные отличия по отношению к интактной группе ($p \leq 0.05$).

Наиболее выраженные изменения на органомерическом уровне по показателю высоты долей печени обнаружены в контрольной группе животных, получавших дексаметазон без фармакокоррекции. Как видно из табл. 3, высота первой, третьей,

четвертой и шестой долей печени в контрольной группе достоверно ($p \leq 0.05$) увеличилась по сравнению со значениями в интактной группе. Изменения высоты долей печени крыс опытных групп свидетельствуют об увеличении первой, второй

и шестой долей печени крыс, получавших соединения (XXII) и (XXIII) для фармакокоррекции дексаметазонового СД.

По результатам исследований морфологических показателей печени (изменения относительной и абсолютной массы, объема и плотности) наиболее выраженная гепатомегалия установлена у животных контрольной группы, у которых абсолютная масса печени составляла в среднем 16.43 г (3.4% от массы тела) при средних показателях у животных интактной группы 14.44 г (2.8% от массы тела) [77]. При этом средняя масса печени крыс, получавших соединение (XX), отличалась от показателей интактной группы лишь незначительно и составляла 12.90 г (2.74% от массы тела). Максимальное количество патологических изменений было зарегистрировано у животных контрольной группы, получавших дексаметазон без коррекции – 88.9%, причем в 77.8% случаев печень у крыс из контрольной группы имела белесо-серую окраску, что характерно для холестатического гепатита, вызываемого ГКС. Для оценки степени тяжести стероидного СД и эффективности фармакокоррекции соединениями (XX–XXIII) также проводили визуальный осмотр и наблюдение за

динамикой изменений состояния кожных покровов. Принимали во внимание наличие незаживающих ран и язв (а также динамика восстановления) и степень выраженности алопеции. Результаты представлены в табл. 4, 5.

Как видно из представленных в табл. 4 данных, животные опытных групп, получавшие соединения (XX–XXIII) для фармакокоррекции смоделированного СД, имели изменения кожных покровов. У крыс контрольной группы выявлено низкое число ран в стадии заживления. Обращает на себя внимание тот факт, что после применения в качестве корректора метаболических нарушений при сахарном диабете соединения (XXI) у 11 из 17 животных раны вообще отсутствовали.

В целом моделирование дексаметазонового СД привело к изменению внешнего вида шерстяного покрова. Как видно из представленных в табл. 5 данных, введение крысам на протяжении трех недель соединения (XXI) в 35% случаев предотвращало возникновение дексаметазоновой алопеции (облысения), а в остальных случаях существенно влияло на степень ее выраженности. В конт-

Таблица 4. Количественная характеристика крыс экспериментальных групп, имеющих раневые дефекты

Группа животных	Раны				Всего
	отсутствуют	гнойно-некротические	негнойные	в стадии заживления	
Интактная	11	0	0	1	12
Контрольная	4	0	3	2	9
(XX)	3	1	4	9	17
(XXI)	11	1	1	4	17
(XXII)	4	1	4	5	14
(XXIII)	4	1	3	5	13
Референтная	4	2	4	7	17

Таблица 5. Степень выраженности алопеции у крыс в экспериментальных группах

Группа животных	Степень выраженности алопеции				Всего
	отсутствует	слабо выраженная	средней выраженности	сильно выраженная	
Интактная	12	0	0	0	12
Контрольная	2	1	2	4	9
(XX)	3	1	12	1	17
(XXI)	6	4	5	2	17
(XXII)	1	4	5	4	14
(XXIII)	1	4	4	4	13
Референтная	5	4	6	2	17

Таблица 6. Результаты биохимического анализа крови крыс в эксперименте моделирования стероидного сахарного диабета с последующей фармакокоррекцией соединениями **(XX–XXIII)**

Группа		Глюкоза, мМ	Билирубин, мкМ	АЛТ, мМ	АСТ, мМ	Тимол, ед.	Холестерин, мМ	ТГР, мМ
Интактная	М	5.53	10.98	1.45	1.62	1.28	2.48	2.05
	м	0.21	2.74	0.15	0.24	0.10	0.09	0.22
Контрольная	М	11.73	15.83	2.75	2.04	2.31	4.11	4.38
	м	0.27	2.48	0.29	0.21	0.64	0.60	1.42
(XX)	М	6.47	10.95	1.31	1.51	0.88	2.22	1.44
	м	0.48	1.58	0.16	0.15	0.10	0.08	0.10
(XXI)	М	5.59	16.32	1.46	1.95	1.11	2.49	2.10
	м	0.21	2.98	0.15	0.14	0.08	0.09	0.20
(XXII)	М	5.42	13.21	0.98	1.68	0.83	2.36	1.58
	м	0.20	1.91	0.11	0.16	0.08	0.07	0.11
(XXIII)	М	5.18	11.85	1.66	1.42	1.21	2.28	1.37
	м	0.32	2.62	0.17	0.19	0.11	0.14	0.08
Референтная	М	7.12	12.63	2.62	2.02	2.15	2.88	2.5
	м	0.26	0.93	0.12	0.12	0.18	0.14	0.25

М – среднее значение, м – стандартная ошибка, АЛТ – аланинаминотрансфераза, АСТ – аспаргатаминотрансфераза, ТГР – триглицериды.

рольной группе у семи крыс развивалась алоpecia преимущественно сильной степени выраженности.

По окончании эксперимента был произведен отбор крови животных для определения биохимических показателей и печеночных маркеров. Результаты представлены в табл. 6. Как видно из табл. 6, максимальный уровень гликемии наблюдается у крыс контрольной группы (у животных, которые не получали фармакокоррекцию после воздействия дексаметазона). Хотя этот показатель был значительно ниже, чем после первого этапа моделирования СД, он все же был достаточно высок, чтобы диагностировать стероидный СД. Установлено, что все четыре соединения **(XX–XXIII)** обладают выраженной гипогликемической активностью. Значения показателей уровня глюкозы близки к значениям у интактных животных. Референтный препарат метформин оказался менее эффективным в сравнении с действием исследуемых соединений **(XX–XXIII)**. Помимо гипергликемии у животных контрольной группы следует отметить и максимально высокие показатели других биохимических маркеров, за исключением показателя уровня билирубина.

В целом биохимические показатели крови крыс свидетельствуют о том, что все исследуемые соединения **(XX–XXIII)** проявили гипогликемическую активность. Концентрация глюкозы составила 6.47,

5.59, 5.42 и 5.18 мМ для соединений **(XX)**, **(XXI)**, **(XXII)** и **(XXIII)** соответственно, что значительно ниже значений в контрольной и даже референтной группах (11.73 и 7.12 мМ соответственно). Основные показатели печеночного метаболизма (уровень билирубина, активности ферментов АЛТ и АСТ), а также липидного обмена (уровень холестерина и ТГР) были максимальны у крыс контрольной группы. Исключением был показатель уровня билирубина в опытной группе после применения 1,4-дигидропиридина **(XXI)**. Уровень билирубина был минимален в опытной группе на фоне введения дигидропиридина **(XX)** и был сопоставим с аналогичным показателем интактной группы (10.95 и 10.98 мкМ соответственно) против 15.83 мкМ в контрольной группе. Не выявлено достоверных отличий активности обеих изучаемых в эксперименте трансаминаз в крови крыс опытных групп, получавших соединения **(XX–XXIII)**, и крыс интактной группы. Концентрация холестерина и триглицеридов в опытной группе крыс, получавших соединение **(XX)**, также была ниже соответствующих показателей в группе интактных животных. Уровень холестерина и триглицеридов в крови крыс опытной группы на фоне применения 1,4-дигидропиридина **(XXI)** был на уровне аналогичных показателей животных интактной группы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ИК-спектры получали на спектрофотометре Vertex 70 (Bruker, Германия) с приставкой НПВО на кристалле алмаза, погрешность $\pm 4 \text{ см}^{-1}$. Спектры ЯМР регистрировали на приборе Avance III HD 400MHz (400.17 МГц на ядрах ^1H , 100.63 МГц – ^{13}C ; Bruker, Германия) в растворе DMSO- d_6 , в качестве стандарта использовали остаточные сигналы DMSO (δ_{H} 2.49, δ_{C} 39.50 м.д.). Индивидуальность полученных образцов контролировали методом ТСХ на пластинах Сорбфил-А (ООО “Имид”, Краснодар, Россия), элюент – ацетон–петролейный эфир (1 : 1) или этилацетат–гексан (1 : 1), проявитель – пары иода, УФ-детектор.

Синтез аллиловых эфиров 6-[(2-(ариламино-2-оксоэтил)тио)-2-метил-4-(2-фурил)-5-циано-1,4-дигидропиридин-3-карбоновой кислоты (XX, XXI) (общая методика). 5-((Аллилокси)карбонил)-6-метил-4-(2-фурил)-3-циано-1,4-дигидропиридин-2-тиолат морфолина (XXVI). К смеси свежеперегнанного фурфурола (3.0 мл, 36.2 ммоль) и цианотиоацетамида (XXIV) [78] (3.63 г, 36.2 ммоль) в EtOH (15 мл) при интенсивном перемешивании добавляли следовые количества морфолина (10 мкл) и перемешивали при 25°C до полной конверсии по ТСХ (при этом выпадал темно-желтый осадок продукта конденсации по Кнёвенагелю, 3-(2-фурил)-2-цианотиоакриламид (XXV)). Далее к суспензии тиоакриламида (XXV) при интенсивном перемешивании добавляли по каплям 5.1 мл (37 ммоль) аллилового эфира ацетоуксусной кислоты и 4.3 мл (50 ммоль) морфолина. Полученную смесь перемешивали при 25°C в течение 3 ч, смесь выдерживали 24 ч, осадок отфильтровывали, промывали ацетоном, высушивали при 60°C. Получили 12.1 г (83%) тиолата (26) в виде бежевого порошка с розовым оттенком.

Алкилирование тиолата (XXVI). Тиолат (XXVI) (1.5 г, 3.85 ммоль) суспендировали в 15 мл EtOH, добавляли при перемешивании 2.0 мл (3.86 ммоль) 10%-ного водного KOH и перемешивали до растворения. Полученный раствор через бумажный фильтр прикапывали к раствору 3.85 ммоль α -хлор-

ацетанилида либо *N*-(3-метоксифенил)- α -хлор-ацетамида в 10 мл EtOH. Смесь перемешивали 3 ч, осадок отфильтровывали, промывали водным EtOH и высушивали при 60°C.

Аллиловый эфир 6-[[2-(3-метоксифенил)амино-2-оксоэтил]тио]-2-метил-4-(2-фурил)-5-циано-1,4-дигидропиридин-3-карбоновой кислоты (XX). Белый порошок, выход 82%. ИК-спектр, ν , см^{-1} : 3300 ш, ср, 3180 ш, сл (N–H), 2204 с (C \equiv N), 1675 ш, с (COOR, CONH). Спектр ^1H -ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6), δ , м.д.: 2.31 с (3H, Py-CH $_3$), 3.74 с (3H, OCH $_3$), 3.92 AB-паттерн (SCH $_2$, 2J 15.0), 4.48–4.56 м (2H, OCH $_2$ CH=), 4.68 с (1H, C 4 H Py), 5.13–5.19 м (2H, наложение сигналов =CH $_2$), 5.83–5.92 м (1H, OCH $_2$ CH=CH $_2$), 6.05 д (1H, H 3 фурил, 3J 3.1), 6.31–6.33 м (1H, H 4 фурил), 6.70 дд (1H, H 4 3-MeOC $_6$ H $_4$ NH, 3J 8.2, 4J 2.1), 7.11 д (1H, H 6 3-MeOC $_6$ H $_4$ NH, 3J 8.5), 7.22–7.25 м (2H, H 2 , H 5 3-MeOC $_6$ H $_4$ NH), 7.50–7.51 м (1H, H 5 фурил), 9.96 с (1H, NH Py), 10.00 с (1H, C(O)NH). Спектр ^{13}C -ЯМР DEPTQ (101 МГц, DMSO- d_6), δ_{C} , м.д.: 18.5* (CH $_3$ -Py), 35.6* (C 4 H Py), 36.9 (SCH $_2$), 55.0* (MeO), 64.0 (CH $_2$ O), 85.5 (C 5 Py), 97.3 (C 3 Py), 105.4* (C 2 H 3-MeOC $_6$ H $_4$ NH), 105.5* (C 3 H фурил), 109.3* (C 4 H 3-MeOC $_6$ H $_4$ NH), 110.5* (C 4 H фурил), 111.9* (C 6 H 3-MeOC $_6$ H $_4$ NH), 117.1 (=CH $_2$), 118.7 (C \equiv N), 129.7* (C 5 H 3-MeOC $_6$ H $_4$ NH), 132.9* (CH=CH $_2$), 139.5 (C 1 3-MeOC $_6$ H $_4$ NH), 142.4* (C 5 H фурил), 144.0 (C 6 Py), 146.9 (C 2 Py), 155.9 (C 1 фурил), 159.5 (C 3 3-MeOC $_6$ H $_4$ NH), 165.6 (COOR), 167.1 (C(O)NH). * Сигнал в противофазе. Найдено, %: C, 61.88; H, 5.08; N, 8.96. C $_{24}$ H $_{23}$ N $_3$ O $_5$ S (M 465.52). Вычислено, %: C, 61.92; H, 4.98; N, 9.03.

Аллиловый эфир 2-метил-6-[[2-(фениламино)-2-оксоэтил]тио]-4-(2-фурил)-5-циано-1,4-дигидропиридин-3-карбоновой кислоты (XXI). Белый порошок, выход 84%. ИК-спектр, ν , см^{-1} : 3302 ш, ср, 3146 ш, сл (N–H), 2201 с (C \equiv N), 1699 с, 1653 ср (2 C=O). Спектр ^1H -ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6), δ , м.д.: 2.31 с (3H, Py-CH $_3$), 3.94 AB-кв (SCH $_2$, 2J 14.9), 4.48–4.56 м (2H, OCH $_2$ CH=), 4.67 с (1H, C 4 H Py), 5.12–5.20 м (2H, наложение сигналов =CH $_2$), 5.83–5.92 м (1H, OCH $_2$ CH=CH $_2$), 6.05 д (1H, H 3 фурил, 3J 3.2), 6.32–6.33 м (1H, H 4 фурил), 7.07–7.10 м (1H, H 4 PhNH), 7.31–7.35 м (2H, H 3 H 5 PhNH),

7.51–7.52 м (1H, H⁵ фурил), 7.55 д (2H, H² H⁶ PhNH, ³J 7.6), 10.08 уш.с (1H, NH), 10.39 уш.с (1H, CONH). Спектр ¹³C-ЯМР DEPTQ (101 МГц, DMSO-*d*₆), δ_C, м.д.: 18.5* (CH₃-Py), 35.5* (C⁴H Py), 36.7 (SCH₂), 64.1 (C₂H₂O), 85.2 (C⁵ Py), 97.4 (C³ Py), 105.5* (C³H фурил), 110.6* (C⁴H фурил), 117.1 (=CH₂), 118.9 (C≡N), 119.6* (2C, C²H C⁶H NHPH), 124.1* (C⁴H NHPH), 128.9* (2C, C³H C⁵H CH NHPH), 132.9* (CH=CH₂), 138.3 (C¹ NHPH), 142.5* (C⁵H фурил), 144.3 (C⁶ Py), 147.2 (C² Py), 156.0 (C¹ фурил), 165.6 (COOR), 167.0 (C(O)NHPH). * Сигнал в противофазе. Найдено, %: C, 63.40; H, 4.95; N, 9.60. C₂₃H₂₁N₃O₄S (M 435.50). Вычислено, %: C, 63.43; H, 4.86; N, 9.65.

Синтез 2-[[6-оксо-4-(2-фурил)-3-циано-1,4,5,6-тетрагидропиридин-2-ил]тио]-N-(3,4-дихлорфенил)ацетамида (XXII). Навеску (1.00 г, 3.1 ммоль) 6-оксо-4-(2-фурил)-3-цианотетрагидропиридин-2-тиолата *N*-метилморфолина (XXVII) [70, 71] растворяли при нагревании в 12 мл 60%-ного EtOH. Полученный раствор через бумажный фильтр добавляли к горячему (50–60°C) раствору 2-хлор-*N*-(3,4-дихлорфенил)ацетамида (0.74 г, 3.1 ммоль) в 15 мл EtOH. Смесь при перемешивании доводили до кипения и отстаивали на 24 ч. Выпавший осадок через 24 ч отфильтровывали, промывали 60%-ным EtOH и петролейным эфиром, высушивали при 60°C. Бежевый порошок, выход 76%. ИК-спектр, ν, см⁻¹: 3302, 3113 ш, ср (N–H), 2212 с (C≡N), 1703 с, 1666 с (2 C=O). Спектр ¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆), δ, м.д.: 2.65 дд (1H, *цис*-C⁵H, ²J 16.5, ³J 4.4), 2.91 дд (1H, *транс*-C⁵H, ²J 16.4, ³J 7.1), 3.97 уш.с (2H, SCH₂), 4.12 дд (1H, H⁴, ³J 4.4, ³J 7.1), 6.21 д (1H, H³ фурил, ³J 3.3), 6.39 дд (1H, H⁴ фурил, ³J 3.3, ³J 1.8), 7.45 дд (1H, C⁶H NHA_r, ³J 8.8, ⁴J 2.4), 7.59 д (1H, C⁵H NHA_r, ³J 8.8), 7.61 дд (1H, H⁵ фурил, ³J 1.8, ⁴J 0.7), 7.94 д (1H, C²H NHA_r, ⁴J 2.4), 10.64 с (1H, NH), 10.68 с (1H, NH). Спектр ¹³C-ЯМР DEPTQ (101 МГц, DMSO-*d*₆), δ_C, м.д.: 33.3* (C⁴H), 34.6 (C⁵H₂), 36.0 (SCH₂), 89.8 (C³), 106.4* (C³ фурил), 110.5* (C⁴ фурил), 117.8 (C≡N), 119.5* (CH Ar), 120.6* (CH Ar), 125.4 (C–Cl), 130.9* (CH Ar), 131.1 (C–Cl), 138.6 (C¹ ArNH), 143.2* (C⁵ фурил), 147.4 (C²), 152.3 (C¹ фурил), 167.0 (C(O)NHA_r), 168.4 (CONH Py). * Сигнал в противофазе. Найдено, %: C, 51.16; H, 3.15;

N, 9.93. C₁₈H₁₃Cl₂N₃O₃S (M 422.29). Вычислено, %: C, 51.20; H, 3.10; N, 9.95.

Синтез 4-(2-[[6-оксо-4-(2-фурил)-3-циано-1,4,5,6-тетрагидропиридин-2-ил]тио]ацетамидо)бензойной кислоты (XXIII). Навеску (1.00 г, 3.1 ммоль) 6-оксо-4-(2-фурил)-3-цианотетрагидропиридин-2-тиолата *N*-метилморфолина (XXVII) [70, 71] растворяли при нагревании в 15 мл 60%-ного EtOH. Полученный раствор через бумажный фильтр добавляли к теплomu (40–50°C) раствору 0.72 г (3.1 ммоль) 4-(2-хлорацетамидо)бензойной кислоты, предварительно нейтрализованной добавлением эквивалентного количества соды, в 60%-ном этаноле (15 мл). Смесь перемешивали 6 ч, оставляли на 24 ч. К образовавшейся суспензии при перемешивании по каплям добавляли 10%-ную HCl до достижения pH 3–4. Осадок через 6 ч отфильтровывали, промывали 60%-ным EtOH и петролейным эфиром, высушивали при 60°C. Бежевый порошок, выход 74%. ИК-спектр, ν, см⁻¹: 3306, 3269, 3200, 3126 ш, ср (N–H, O–H), 2210 с (C≡N), 1688 ш, с, 1668 ш, с (3 C=O). Спектр ¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆), δ, м.д.: 2.65 дд (1H, *цис*-C⁵H, ²J 16.3, ³J 3.7), 2.91 дд (1H, *транс*-C⁵H, ²J 16.3, ³J 6.9), 4.01 уш.с (2H, SCH₂), 4.11–4.14 м (1H, H⁴), 6.21–6.22 м (1H, H³ фурил), 6.38–6.39 м (1H, H⁴ фурил), 7.61–7.62 м (1H, H⁵ фурил), 7.68 д (2H, CH NHA_r, ³J 8.2), 7.91 д (2H, CH NHA_r, ³J 8.2), 10.66 с (1H, NH), 10.71 уш.с (1H, NH), 12.78 уш.с (1H, COOH). Спектр ¹³C-ЯМР DEPTQ (101 МГц, DMSO-*d*₆), δ_C, м.д.: 33.3* (C⁴H), 34.7 (C⁵H₂), 36.1 (SCH₂), 89.5 (C³), 106.4* (C³ фурил), 110.6* (C⁴ фурил), 117.9 (C≡N), 118.8* (2 CH Ar), 125.8 (C⁴ Ar), 130.6* (2 CH Ar), 142.5 (C¹ ArNH), 143.2* (C⁵ фурил), 147.6 (C²), 152.3 (C¹ фурил), 166.9 (C(O)NHA_r), 167.1 (COOH), 168.4 (CONH Py). * Сигнал в противофазе. Найдено, %: C, 57.36; H, 3.88; N, 10.55. C₁₉H₁₅N₃O₅S (M 397.40). Вычислено, %: C, 57.42; H, 3.80; N, 10.57.

Гипогликемическое действие соединений (XX–XXIII). Эксперимент проводили на базе кафедры фундаментальной и клинической фармакологии Луганского государственного медицинского университета имени Святителя Луки в осенне-зимний период, чтобы исключить влияние сезон-

ных ритмов. Полученные из вивария белые беспородные крысы случайно (методом “конвертов”) были распределены на группы, состоящие из 10 крыс. До начала эксперимента все лабораторные животные проходили двухнедельный карантин. На протяжении эксперимента всех животных содержали в виварии при одинаковых условиях: при естественном освещении, температуре воздуха 22–24°C, относительной влажности воздуха 40–50%, в пластиковых клетках до шести особей. Ограничения по количеству стандартного корма и воды не применялись. На протяжении всего эксперимента проводили еженедельное взвешивание животных с целью изучения динамики изменения массы тела крыс. Также ежедневно наблюдали за внешним видом и поведенческими реакциями животных.

Согласно дизайну исследования, эксперимент проводили на 114 крысах-самцах (возраст 18 месяцев), которых разделили на семь групп: интактную (12 особей), контрольную (17 крыс), опытные (четыре группы по 17 крыс) и референтную (17 крыс).

У всех крыс, кроме интактной группы, моделировали стероидный СД введением глюкокортикоидного препарата дексаметазона (АО “КРКА, д.д., Ново место”, Словения) ежедневно в утренние часы посредством внутримышечной инъекции в течение 13 сут из расчета 125 мкг/кг массы тела [73]. Еженедельно проводили контрольное взвешивание животных с целью наблюдения за динамикой массы тела.

По истечении 13 сут крысам с экспериментальным диабетом проводили фармакокоррекцию: в опытных группах животным вводили соединения (XX–XXIII), в референтной группе – препарат сравнения метформин в объеме 2 мл. Крысам контрольной группы вводили плацебо (физиологический раствор) в объеме 2 мл. Исследуемые соединения (XX–XXIII), препарат сравнения и физиологический раствор вводили *per os* через атравматический зонд ежедневно на протяжении трех недель. Животные опытных групп получали одно из соединений (XX–XXIII) из расчета 1 мг/кг веса, поскольку в ранее проведенных на кафедре многочисленных исследованиях другие производные

цианотиоацетамида на разнообразных моделях проявили биологическую активность. Животные референтной группы получали метформин из расчета 200 мг/кг. Доза препарата была выбрана согласно расчетному методу экстраполяции доз [74].

Раневые эффекты, алопеции наблюдали визуально и регистрировали в конце эксперимента.

По окончании эксперимента для оценки тяжести течения СД, а также результатов фармакокоррекции после применения соединений (XX–XXIII) и препарата сравнения метформина анализировали кровь, взятую во время забоя из бедренной вены крыс всех экспериментальных групп. Также после забоя крыс для измерения органомерических показателей из брюшной полости извлекали печень и щитовидную железу. Вскрытие проводили сразу же после забоя, чтобы исключить возможный автолиз тканей и клеток внутриклеточными ферментами.

На спектрофотометре SOLAR PM 2111 (ЗАО “СОЛАР”, Республика Беларусь) при применении стандартных методик определяли уровень глюкозы, общего билирубина, триглицеридов, холестерина, активность аминотрансфераз АЛТ и АСТ. Также проводили тимоловую пробу (пробу тимолового помутнения). Биохимические исследования осуществляли в лаборатории Луганской республиканской клинической психоневрологической больницы.

Статистическую обработку полученных результатов производили стандартными методами математической статистики, характеризующими количественную изменчивость. Для полученных данных вычисляли среднее значение (M), стандартную ошибку (m), стандартное среднеквадратичное отклонение σ , дисперсию значений σ^2 и коэффициент вариации V . Расчеты проводили с помощью программы Microsoft Excel 6.0. Для оценки статистической значимости использовали критерий Стьюдента ($p < 0.05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описан синтез четырех новых гибридных молекул, содержащих фрагменты 4-(2-фурил)-1,4-дигидроникотинонитрила и 4-(2-фурил)-1,4,5,6-тетрагидроникотинонитрила. Строение полученных сое-

динений подтверждено спектральными методами. На модели дексаметазонового сахарного диабета у крыс в период выраженных старческих изменений показано наличие заметного гипогликемического действия у всех четырех исследуемых соединений. По результатам визуального осмотра и анализа органомерических показателей щитовидной железы и печени, а также биохимических показателей крови и печеночных маркеров установлено, что фармакокоррекция 1,4-дигидропиридином (**XX**) показывает наилучшие метаболические и соматические изменения у крыс с дексаметазоновым сахарным диабетом. Гипогликемическое действие соединения (**XX**) превышает таковое у референтного препарата метформина. В то же время гибридные соединения с фрагментом 4-(2-фурил)-1,4,5,6-тетрагидроникотинонитрила (структуры (**XXII**) и (**XXIII**)) обладают заметным гипогликемическим действием, но при этом не оказывают гепатопротекторного действия.

Проведенные исследования показывают перспективность дальнейшего изучения гибридных молекул – производных никотинонитрила. Соединение (**XX**) показало наилучший гипогликемический эффект при отсутствии выраженной гепатотоксичности.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования проведены с использованием оборудования научно-образовательного центра “Диагностика структуры и свойств наноматериалов” и оборудования центра коллективного пользования “Эколого-аналитический центр” Кубанского государственного университета.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках научного проекта № МФИ-20.1-26/20 (заявка № МФИ-20.1/45).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными осуществляли в соответствии с принципами биоэтики, правилами лабораторной практики (GLP), требованиями ФЗ РФ от 14.05.1993 № 4979-1 “О ветеринарии” (с изменениями от 02.07.2021), директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета

Европейского Союза “О защите животных, используемых в научных целях”.

Исследование одобрено комиссией по биоэтике Луганского государственного медицинского университета имени Святителя Луки Министерства здравоохранения Луганской народной республики (протокол № 6 от 01.11.2021 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bérubé G.* // *Expert Opin. Drug Discov.* 2016. V. 11. P. 281–305.
<https://doi.org/10.1517/17460441.2016.1135125>
2. *Soltan O.M., Shoman M.E., Abdel-Aziz S.A., Narumi A., Konno H., Abdel-Aziz M.* // *Eur. J. Med. Chem.* 2021. V. 225. P. 113768.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113768>
3. *Singh A.K., Kumar A., Singh H., Sonawane P., Paliwal H., Thareja S., Pathak P., Grishina M., Jaremko M., Emwas A.H., Yadav J.P., Verma A., Khalilullah H., Kumar P.* // *Pharmaceuticals.* 2022. V. 15. P. 1071.
<https://doi.org/10.3390/ph15091071>
4. *Ivasiv V., Albertini C., Gonçalves A.E., Rossi M., Bolognesi M.L.* // *Curr. Top. Med. Chem.* 2019. V. 19. P. 1694–1711.
<https://doi.org/10.2174/1568026619666190619115735>
5. *Prasher P., Sharma M., Aljabali A.A.A., Gupta G., Negi P., Kapoor D.N., Singh I., Zacconi F.C., de Jesus Andreoli Pinto T., da Silva M.W., Bakshi H.A., Chellappan D.K., Tambuwala M.M., Dua K.* // *Drug Dev. Res.* 2020. V. 81. P. 837–858.
<https://doi.org/10.1002/ddr.21704>
6. *Alarcón-Espósito J., Mallea M., Rodríguez-Lavado J.* // *Curr. Neuropharmacol.* 2021. V. 19. P. 832–867.
<https://doi.org/10.2174/1570159X18666200914155951>
7. *González J.F., Alcántara A.R., Doadrio A.L., Sánchez-Montero J.M.* // *Exp. Opin. Drug Discov.* 2019. V. 14. P. 879–891.
<https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1623201>

8. *Auti P.S., George G., Paul A.T.* // RSC Adv. 2020. V. 10. P. 41353–41392.
<https://doi.org/10.1039/d0ra06642g>
9. *Shaveta, Mishra S., Singh P.* // Eur. J. Med. Chem. 2016. V. 124. P. 500–536.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.039>
10. *Anusionwu C.G., Aderibigbe B.A., Mbianda X.Y.* // Mini Rev. Med. Chem. 2019. V. 19. P. 450–464.
<https://doi.org/10.2174/1389557519666181210162003>
11. *Mehta K., Khambete M., Abhyankar A., Omri A.* // Pharmaceuticals. 2023. V. 16. P. 377.
<https://doi.org/10.3390/ph16030377>
12. Design of hybrid molecules for drug development / Ed. Decker M. Amsterdam: Elsevier, 2017. 338 pp.
13. *Oliveira R., Miranda D., Magalhães J., Capela R., Perry M.J., O'Neill P.M., Moreira R., Lopes F.* // Bioorg. Med. Chem. 2015. V. 23. P. 5120–5130.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.04.017>
14. *Chauhan S.S., Sharma M., Chauhan P.M.S.* // Drug News Perspect. 2010. V. 23. P. 632–646.
<https://doi.org/10.1358/dnp.2010.23.10.1468390>
15. *Leite D.I., de Castro Bazan Moura S., da Conceição Avelino Dias M., Costa C.C.P., Machado G.P., Pimentel L.C.F., Branco F.S.C., Moreira R., Bastos M.M., Boechat N.* // Molecules. 2023. V. 28. P. 3342.
<https://doi.org/10.3390/molecules28083342>
16. *Краузе А.А., Одынец А.Г., Веррева А.А., Германе С.К., Кожухов А.Н., Дубур Г.Я.* // Хим.-фарм. журн. 1991. Т. 25. С. 40–43. [*Krauze A.A., Odynets A.G., Verreva A.A., Germane S.K., Kozhukhov A.N., Dubur G.Ya.* // Pharm. Chem. J. 1991. V. 25. P. 477–481.]
<https://doi.org/10.1007/BF00772003>
17. *Fernandes M.A., Santos M.S., Moreno A.J., Chernova L., Krauze A., Duburs G., Vicente J.A.* // Toxicol. In Vitro. 2009. V. 23. P. 1333–1341.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.07.002>
18. *Osolodkin D.I., Kozlovskaya L.I., Dueva E.V., Dotsenko V.V., Rogova Y.V., Frolov K.A., Krivokolysko S.G., Romanova E.G., Morozov A.S., Karganova G.G., Palyulin V.A., Pentkovski V.M., Zefirov N.S.* // ACS Med. Chem. Lett. 2013. V. 4. P. 869–874.
<https://doi.org/10.1021/ml400226s>
19. *Bibik E.Yu., Saphonova A.A., Yeryomin A.V., Frolov K.A., Dotsenko V.V., Krivokolysko S.G.* // Res. Results Pharmacol. 2017. V. 3. P. 20–25.
<https://doi.org/10.18413/2313-8971-2017-3-4-20-25>
20. *Бибик Е.Ю., Ярошевская О.Г., Девдера А.В., Деменко А.В., Захаров В.В., Фролов К.А., Доценко В.В., Кривоколыско С.Г.* // Хим.-фарм. журн. 2017. Т. 51. С. 16–19. [*Bibik E.Yu., Yaroshevskaya O.G., Devdera A.V., Demenko A.V., Zakharov V.V., Frolov K.A., Dotsenko V.V., Krivokolysko S.G.* // Pharm. Chem. J. 2017. V. 51. P. 648–651.]
<https://doi.org/10.1007/s11094-017-1669-1>
21. *Бибик Е.Ю., Некраса И.А., Деменко А.В., Фролов К.А., Доценко В.В., Кривоколыско С.Г.* // Бюлл. сиб. мед. 2019. Т. 18. С. 21–28. [*Bibik E.Yu., Nekrasa I.A., Demenko A.V., Frolov K.A., Dotsenko V.V., Krivokolysko S.G.* // Bull. Sib. Med. 2019. V. 18. P. 21–28.]
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-3-21-28>
22. *Бибик И.В., Бибик Е.Ю., Доценко В.В., Фролов К.А., Кривоколыско С.Г., Аксенов Н.А., Аксенова И.В., Щербakov С.В., Овчаров С.Н.* // ЖОХ. 2021. Т. 91. С. 190–204. [*Bibik I.V., Bibik E.Yu., Dotsenko V.V., Frolov K.A., Krivokolysko S.G., Aksenov N.A., Aksenova I.V., Shcherbakov S.V., Ovcharov S.N.* // Russ. J. Gen. Chem. 2021. V. 91. P. 154–166.]
<https://doi.org/10.1134/S107036322102002X>
23. *Rice W.G., Turpin J.A., Schaeffer C.A., Graham L., Clanton D., Buckheit R.W., Zaharevitz D., Summers M.F., Wallqvist A., Covell D.G.* // J. Med. Chem. 1996. V. 39. P. 3606–3616.
<https://doi.org/10.1021/jm960375o>
24. *Norman D.D., Ibezim A., Scott W.E., White S., Parrill A.L., Baker D.L.* // Bioorg. Med. Chem. 2013. V. 21. P. 5548–5560.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.05.061>
25. *Abbas H.A., El Sayed W.A., Fathy N.M.* // Eur. J. Med. Chem. 2010. V. 45. P. 973–982.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.11.039>
26. *Orlov A.A., Eletskaia A.A., Frolov K.A., Golinet A.D., Palyulin V.A., Krivokolysko S.G., Kozlovskaya L.I., Dotsenko V.V., Osolodkin D.I.* // Arch. Pharm. 2018. V. 351. P. e1700353.
<https://doi.org/10.1002/ardp.201700353>

27. Литвинов В.П. // Изв. АН. Сер. хим. 1998. № 11. С. 2123–2141. [Litvinov V.P. // Russ. Chem. Bull. 1998. V. 47. P. 2053–2073.]
<https://doi.org/10.1007/BF02494257>
28. Литвинов В.П., Кривоколыско С.Г., Дяченко В.Д. // Химия гетероциклич. соед. 1999. № 5. С. 579–609. [Litvinov V.P., Krivokolysko S.G., Dyachenko V.D. // Chem. Heterocycl. Compd. 1999. V. 35. P. 509–540.]
<https://doi.org/10.1007/BF02324634>
29. Литвинов В.П. // Усп. химии. 2006. Т. 75. № 7. С. 645–668. [Litvinov V.P. // Russ. Chem. Rev. 2006. V. 75. P. 577–599.]
<https://doi.org/10.1070/RC2006v075n07ABEH003619>
30. Gouda M.A., Berghot M.A., Abd El Ghani G.E., Khalil A.E.G.M. // Synth. Commun. 2014. V. 44. P. 297–330.
<https://doi.org/10.1080/00397911.2013.823549>
31. Salem M.A., Helel M.H., Gouda M.A., Ammar Y.A., El-Gaby M.S.A. // Synth. Commun. 2018. V. 48. P. 345–374.
<https://doi.org/10.1080/00397911.2017.1394468>
32. Gouda M.A., Hussein B.H., Helal M.H., Salem M.A. // J. Heterocycl. Chem. 2018. V. 55. P. 1524–1553.
<https://doi.org/10.1002/jhet.3188>
33. Gouda M.A., Attia E., Helal M.H., Salem M.A. // J. Heterocycl. Chem. 2018. V. 55. P. 2224–2250.
<https://doi.org/10.1002/jhet.3298>
34. Shamroukh A.H., Kotb E.R., Anwar M.M., Sharaf M. // Egypt. J. Chem. 2021. V. 64. P. 4509–4529.
<https://doi.org/10.21608/EJCHEM.2021.64971.3392>
35. Hassan H., Hisham M., Osman M., Hayallah A. // J. Adv. Biomed. Pharm. Sci. 2023. V. 6. P. 1–11.
<https://doi.org/10.21608/jabps.2022.162396.1166>
36. Лукевиц Э., Демичева Л. // Химия гетероциклич. соед. 1993. С. 291–321. [Lukevits É, Demicheva L. // Chem. Heterocycl. Compds. 1993. V. 29. P. 243–267.]
<https://doi.org/10.1007/BF00531499>
37. Alizadeh M., Jalal M., Khodaei Hamed A.S., Kheirouri S., Tabrizi F.P.F., Kamari N. // J. Inflamm. Res. 2020. V. 13. P. 451–463.
<https://doi.org/10.2147/JIR.S262132>
38. Кривоколыско Д.С., Доценко В.В., Бибик Е.Ю., Самокиш А.А., Вендиктова Ю.С., Фролов К.А., Кривоколыско С.Г., Василин В.К., Панков А.А., Аксенов Н.А., Аксенова И.В. // ЖОХ. 2021. Т. 91. С. 1359–1374. [Krivokolysko D.S., Dotsenko V.V., Bibik E.Yu., Samokish A.A., Venidiktova Yu.S., Frolov K.A., Krivokolysko S.G., Vasilin V.K., Pankov A.A., Aksenov N.A., Aksenova I.V. // Russ. J. Gen. Chem. 2021. V. 91. P. 1646–1660.]
<https://doi.org/10.1134/S1070363221090073>
39. Бибик И.В., Бибик Е.Ю., Фролов К.А., Доценко В.В., Кривоколыско С.Г. // Бюлл. мед. науки. 2023. № 1 (29). С. 5–15. [Bibik I.V., Bibik E.Yu., Frolov K.A., Dotsenko V.V., Krivokolysko S.G. // Bull. Med. Sci. 2023. № 1 (29). P. 5–15.]
<https://doi.org/10.31684/25418475-2023-1-5>
40. Бибик Е.Ю., Олейник И.С., Панков А.А., Фролов К.А., Доценко В.В., Кривоколыско С.Г. // Кубан. науч. мед. вестн. 2023. Т. 30. С. 64–75.
<https://doi.org/10.25207/1608-6228-2023-30-2-64-75>
41. Кривоколыско Д.С., Доценко В.В., Бибик Е.Ю., Самокиш А.А., Вендиктова Ю.С., Фролов К.А., Кривоколыско С.Г., Панков А.А., Аксенов Н.А., Аксенова И.В. // Биоорг. хим. 2022. Т. 48. С. 486–494. [Krivokolysko D.S., Dotsenko V.V., Bibik E.Yu., Samokish A.A., Venidiktova Yu.S., Frolov K.A., Krivokolysko S.G., Pankov A.A., Aksenov N.A., Aksenova I.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2022. V. 48. P. 628–635.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162022030104>
42. Кривоколыско Д.С., Доценко В.В., Бибик Е.Ю., Мязина А.В., Кривоколыско С.Г., Василин В.К., Панков А.А., Аксенов Н.А., Аксенова И.В. // ЖОХ. 2022. Т. 92. С. 72–91. [Krivokolysko D.S., Dotsenko V.V., Bibik E.Yu., Myazina A.V., Krivokolysko S.G., Vasilin V.K., Pankov A.A., Aksenov N.A., Aksenova I.V. // Russ. J. Gen. Chem. 2021. V. 91. P. 2588–2605.]
<https://doi.org/10.1134/S1070363221120306>
43. Bibik E.Yu., Kurbanov L.I., Grygoryan S.A., Krivokolysko D.S., Kudrina M.A., Pankov A.A., Frolov K.A., Dotsenko V.V., Krivokolysko S.G. // J. Siber. Med. Sci. 2021. № 3. P. 45–55.
<https://doi.org/10.31549/2542-1174-2021-3-45-55>

44. Биби́к Е.Ю., Кривоколы́ско Д.С., Батищева Г.А., Самокиш А.А., Вендиктова Ю.С., Мязина А.В., Панков А.А., Фролов К.А., Доценко В.В., Кривоколы́ско С.Г. // Кубан. науч. мед. вестн. 2022. Т. 29. С. 77–95.
<https://doi.org/10.25207/1608-6228-2022-29-1-77-95>
45. Фролов К.А., Доценко В.В., Кривоколы́ско С.Г. // Химия гетероциклич. соед. 2013. № 8. С. 1232–1236. [Frolov K.A., Dotsenko V.V., Krivokolysko S.G. // Chem. Heterocycl. Compd. 2013. V. 49. P. 1146–1150.]
<https://doi.org/10.1007/s10593-013-1356-4>
46. Sanders M.P., Roumen L., van der Horst E., Lane J.R., Vischer H.F., van Offenbeek J., de Vries H., Verhoeven S., Chow K.Y., Verkaar F., Beukers M.W., McGuire R., Leurs R., IJzerman A.P., de Vlieg J., de Esch I.J.P., Zaman G.J.R., Klomp J.P.G., Bender A., de Graaf C. // J. Med. Chem. 2012. V. 55. P. 5311–5325.
<https://doi.org/10.1021/jm300280e>
47. Pang J.P., Hu X.P., Wang Y.X., Liao J.N., Chai X., Wang X.W., Shen C., Wang J.J., Zhang L.L., Wang X.Y., Zhu F., Weng Q.J., Xu L., Hou T.J., Li D. // Acta Pharmacol. Sin. 2022. V. 43. P. 2429–2438.
<https://doi.org/10.1038/s41401-021-00855-6>
48. Michels M., Briem H., Vakalopoulos A., Zimmermann K., Teusch N. // Patent WO2011061157A1, published 26.05.2011.
<https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/043619076/publication/WO2011061157A1?q=pn%3DWO2011061157>
49. Zhang Y., Zhang S., Xu G., Yan H., Pu Y., Zuo Z. // Mol. Biosyst. 2016. V. 12. P. 3734–3742.
<https://doi.org/10.1039/c6mb00661b>
50. Jadhav A., Ferreira R.S., Klumpp C., Mott B.T., Austin C.P., Inglese J., Thomas C.J., Maloney D.J., Shoichet B.K., Simeonov A. // J. Med. Chem. 2010. V. 53. P. 37–51.
<https://doi.org/10.1021/jm901070c>
51. Alqasoumi S.I., Al-Taweel A.M., Alafeefy A.M., Ghorab M.M., Noaman E. // Eur. J. Med. Chem. 2010. V. 45. P. 1849–1853.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.01.022>
52. Alqasoumi S.I., Al-Taweel A.M., Alafeefy A.M., Hamed M.M., Noaman E., Ghorab M.M. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009. V. 19. P. 6939–6942.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.10.065>
53. Azzam R.A., Mohareb R.M. // Chem. Pharm. Bull. 2015. V. 63. P. 1055–1064.
<https://doi.org/10.1248/cpb.c15-00685>
54. Ahmed M.H., El-Hashash M.A., Marzouk M.I., El-Naggar A.M. // J. Heterocycl. Chem. 2019. V. 56. P. 114–123.
<https://doi.org/10.1002/jhet.3380>
55. Yang J., Kwon S., Bae S.H., Park K.M., Yoon C., Lee J.H., Seok C. // J. Chem. Inf. Model. 2020. V. 60. P. 3246–3254.
<https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c00104>
56. GalaxyWEB. A web server for protein structure prediction, refinement, and related methods // Computational Biology Lab, Department of Chemistry, Seoul National University, S. Korea.
<https://galaxy.seoklab.org/index.html>
57. Ko J., Park H., Heo L., Seok C. // Nucleic Acids Res. 2012. V. 40. Iss. W1. P. W294–W297.
<https://doi.org/10.1093/nar/gks493>
58. Daina A., Michielin O., Zoete V. // Nucleic Acids Res. 2019. V. 47. Iss. W1. P. W357–W364.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz382>
59. Тюренков И.Н., Озеров А.А., Куркин Д.В., Логвинова Е.О., Бакулин Д.А., Волотова Е.В., Бородин Д.Д. // Усп. химии. 2018. Т. 87. С. 151–166. [Tyurenkov I.N., Ozerov A.A., Kurkin D.V., Logvinova E.O., Bakulin D.A., Volotova E.V., Borodin D.D. // Russ. Chem. Rev. 2018. V. 87. P. 151–166.]
<https://doi.org/10.1070/rcr4737>
60. Lin H.V., Efanov A.M., Fang X., Beavers L.S., Wang X., Wang J., Gonzalez Valcarcel I.C., Ma T. // PLoS One. 2016. V. 11. P. e0157298.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157298>
61. Ueda Y., Iwakura H., Bando M., Doi A., Ariyasu H., Inaba H., Morita S., Akamizu T. // PLoS One. 2018. V. 13. P. e0198762.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198762>

62. *Cohen P., Goedert M.* // *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2003. V. 3. P. 479–487.
<https://doi.org/10.1038/nrd1415>
63. *Спасов А.А., Косолапов В.А., Бабков Д.А., Майка О.Ю.* // Пробл. эндокринологии. 2018. Т. 64. С. 180–187.
<https://doi.org/10.14341/probl8747>
64. *Matschinsky F.M., Wilson D.F.* // *Front. Physiol.* 2019. V. 10. P. 148.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00148>
65. *Ashcroft F.M., Lloyd M., Haythorne E.A.* // *Trends Endocrinol. Metab.* 2023. V. 34. P. 119–130.
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2022.12.007>
66. *Jay M.A., Ren J.* // *Curr. Diabetes Rev.* 2007. V. 3. P. 33–39.
<https://doi.org/10.2174/157339907779802067>
67. *Chandra A., Kaur P., Sahu S.K., Mittal A.* // *Chem. Biol. Drug Design.* 2022. V. 100. P. 947–967.
<https://doi.org/10.1111/cbdd.14020>
68. *Sharma N., Bhagat S., Singh Chundawat T.* // *Mini Rev. Med. Chem.* 2017. V. 17. P. 947–958.
<https://doi.org/10.2174/1389557517666170120152917>
69. *Li Z., Xu X., Huang W., Qian H.* // *Med. Res. Rev.* 2018. V. 38. P. 381–425.
<https://doi.org/10.1002/med.21441>
70. *Доценко В.В., Лебедева И.А., Кривоколыско С.Г., Повстяной М.В., Повстяной В.М., Костырко Е.О.* // Химия гетероциклич. соед. 2012. Т. 48. С. 492–499. [*Dotsenko V.V., Lebedeva I.A., Krivokolysko S.G., Povstyanoi M.V., Povstyanoi V.M., Kostyrko E.O.* // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2012. V. 48. P. 462–469.]
71. *Dotsenko V.V., Frolov K.A., Pekhtereva T.M., Papayanina O.S., Suikov S.Yu., Krivokolysko S.G.* // *ACS Comb. Sci.* 2014. V. 16. P. 543–550.
<https://doi.org/10.1021/co5000807>
72. *Dotsenko V.V., Bushmarinov I.S., Goloveshkin A.S., Chigorina E.A., Frolov K.A., Krivokolysko S.G.* // *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* 2017. V. 192. P. 47–52.
<https://doi.org/10.1080/10426507.2016.1224877>
73. *Чуканова Г.Н., Дворацк М., Искаков С.С., Курмамбаев Е.Ж.* // Наука и здравоохранение. 2014. № 4. С. 4–8.
74. *Рыболовлев Ю.Р., Рыболовлев Р.С.* // Докл. АН СССР. 1979. Т. 247. С. 1513–1516.
75. *Song Q.Q., Xie W.Y., Tang Y.J., Zhang J., Liu J.* // *Pharmacogenomics.* 2017. V. 18. P. 293–316.
<https://doi.org/10.2217/pgs-2016-0151>
76. *García-Menaya J.M., Cordobés-Durán C., García-Martín E., Agúndez J.A.* // *Front. Pharmacol.* 2019. V. 10. P. 520.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00520>
77. *Тильченко Д.А., Бибик Е.Ю., Фролов К.А., Доценко В.В., Кривоколыско С.Г., Батищева Г.А., Кетова Е.С.* // *J. Siber. Med. Sci.* 2023. Т. 7. С. 118–131.
<https://doi.org/10.31549/2542-1174-2023-7-1-118-131>
78. *Дяченко В.Д., Дяченко И.В., Ненайденко В.Г.* // Усп. химии. 2018. Т. 87. С. 1–27.
<https://doi.org/10.1070/RCR4760>

Synthesis and Hypoglycemic Activity of New Nicotinonitrile-Furan Molecular Hybrids

D. A. Tilchenko*, **, E. Yu. Bibik*, **, V. V. Dotsenko***, ****, #, S. G. Krivokolysko*, *****,
K. A. Frolov*, *****, N. A. Aksenov****, and I. V. Aksenova****

#E-mail: victor_dotsenko_@mail.ru

*Lugansk State Medical University named after St. Luke,
kv. 50 let Oborony Luganska 1g, Lugansk, 91045 Russia

**Belgorod State National Research University, ul. Pobedy 85, Belgorod, 308015 Russia

***Kuban State University, ul. Stavropolskaya 149, Krasnodar, 350040 Russia

****North Caucasus Federal University, ul. Pushkina 1, Stavropol, 355009 Russia

*****Vladimir Dahl Lugansk State University, kv. Molodezhny 20A, Lugansk, 91034 Russia

New hybrid molecules bearing 4-(2-furyl)-1,4-dihydronicotinonitrile and 4-(2-furyl)-1,4,5,6-tetrahydronicotinonitrile fragments were prepared starting from cyanothioacetamide and furfural. The hypoglycemic activity in dexamethasone-induced diabetes mellitus was investigated *in vivo* in senile rats. Some compounds revealed hypoglycemic effects superior to that of the reference drug (metformin).

Keywords: cyanothioacetamide, furfural, partially saturated nicotinonitriles, hypoglycemic effects, steroid-induced diabetes mellitus



УДК 547.789

АРИЛИДЕН-ИМИДАЗОЛОНЫ И ИХ АЦИКЛИЧЕСКИЙ АНАЛОГ КАК ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СЕНСОРЫ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ¹

© 2024 г. С. А. Краснова*, **, #, Э. Р. Зайцева*, Д. И. Рудик*, ***, Д. С. Иванов*, ****, А. А. Михайлов*, М. С. Баранов*, *****

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

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

*** Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Макля, 6

**** Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия, 119991 Москва, ул. Ленинские горы, 1

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

Поступила в редакцию 29.08.2023 г.

После доработки 10.10.2023 г.

Принята к публикации 11.10.2023 г.

Синтезирована серия арилиден-имидазолонов и их ациклический аналог с комплексообразующими группами, изучены флуоресцентные свойства в различных растворителях, а также при добавлении солей различных металлов. Установлено, что два полученных соединения – гидроксиминолиден-имидазолон и дифторбензимидазолиден-имидазолон – могут выступать в роли селективных флуоресцентных сенсоров для ионов кадмия и цинка и потенциально применяться в качестве маркеров для наблюдения за внутриклеточными процессами.

Ключевые слова: арилиден-имидазолон, флуоресцентные сенсоры, флуоресценция

DOI: 10.31857/S0132342324020077, **EDN:** ONACLO

ВВЕДЕНИЕ

Флуоресцентное мечение – один из ключевых и наиболее удобных методов анализа в биологических исследованиях. Использование такого мечения в микроскопии позволяет не только визуализировать расположение различных структур и органелл клеток, но и наблюдать за их функциональной активностью [1–3]. За последние годы было разработано множество методов маркирования живых объектов с применением флуоресцентных и флуорогенных меток, в том числе меток, основанных на различных арилиден-имидазолонах [4–9]. Некоторые из таких

веществ селективно окрашивают отдельные клеточные органеллы, например, ЭПР или митохондрии. Однако для подробного изучения физиологических процессов нередко требуется анализировать не отдельные компоненты клеток, а состав среды. В частности, важный параметр – концентрация отдельных ионов, которые влияют на функционирование ключевых регуляторных каскадов в организме [10, 11]. Так, были разработаны ионофлуорофоры – флуоресцентные хемосенсоры катионов металлов, активно применяющиеся в биологических исследованиях [12]. Многие из них построены на основе различных

¹ Дополнительные материалы к этой статье доступны по doi 10.31857/S0132342324020077 для авторизованных пользователей.

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

макромолекул: краун- и азакраун-эфиров [13, 14], криптанов [15], тетраалкиламмониевых производных [16] и других структур [17, 18]. Большое внимание также уделяется конструированию сенсоров катионов металлов с использованием гетероциклических систем. Так, российские ученые продемонстрировали, что лиганды на основе производных пиридина могут образовывать стабильные комплексы с ионами цинка [19], кадмия [20] и других тяжелых металлов, что необходимо для их детектирования, контроля содержания в крови и предотвращения интоксикации организма. Кроме того, большое внимание уделяется разработке хемосенсоров катионов кальция, измерение концентрации которых играет важную роль в клинической диагностике многих заболеваний, включая онкологические и эндокринные [21].

Ранее нами было показано, что арилиден-имидазолы также могут выступать в качестве селективных сенсоров, проявляющих заметную флуоресценцию при связывании с ионами цинка [22]. В свободной форме такие соединения характеризуются слабой флуоресценцией, что объясняется возможностью безызлучательного сброса энергии возбуждения за счет подвижности арилиденового фрагмента.

Однако введение в данные структуры различных комплексообразующих заместителей (примеры представлены на схеме 1) позволяет этим веществам формировать комплексы с ионами металлов, в которых такие переходы могут быть блокированы, что, в свою очередь, может приводить к возрастанию интенсивности флуоресценции.

В рамках данного исследования мы предложили новую группу арилиден-имидазолонов, в структуры которых ввели фрагменты, позволяющие использовать эти молекулы в качестве полидентатных лигандов (схема 1). Цель данной работы – изучение оптических свойств синтезированного ряда соединений и проверка возможности их применения в качестве сенсоров ионов различных металлов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Арилиден-имидазолы (**I–VI**) были синтезированы в две стадии по модифицированной литературной методике [23]. Сначала реакцией соответствующих ароматических альдегидов с метиламином были получены различные имины, которые затем вступали в [2+3]-циклоприсоединение с последующей рециклизацией с образованием целевых соединений (схема 1).

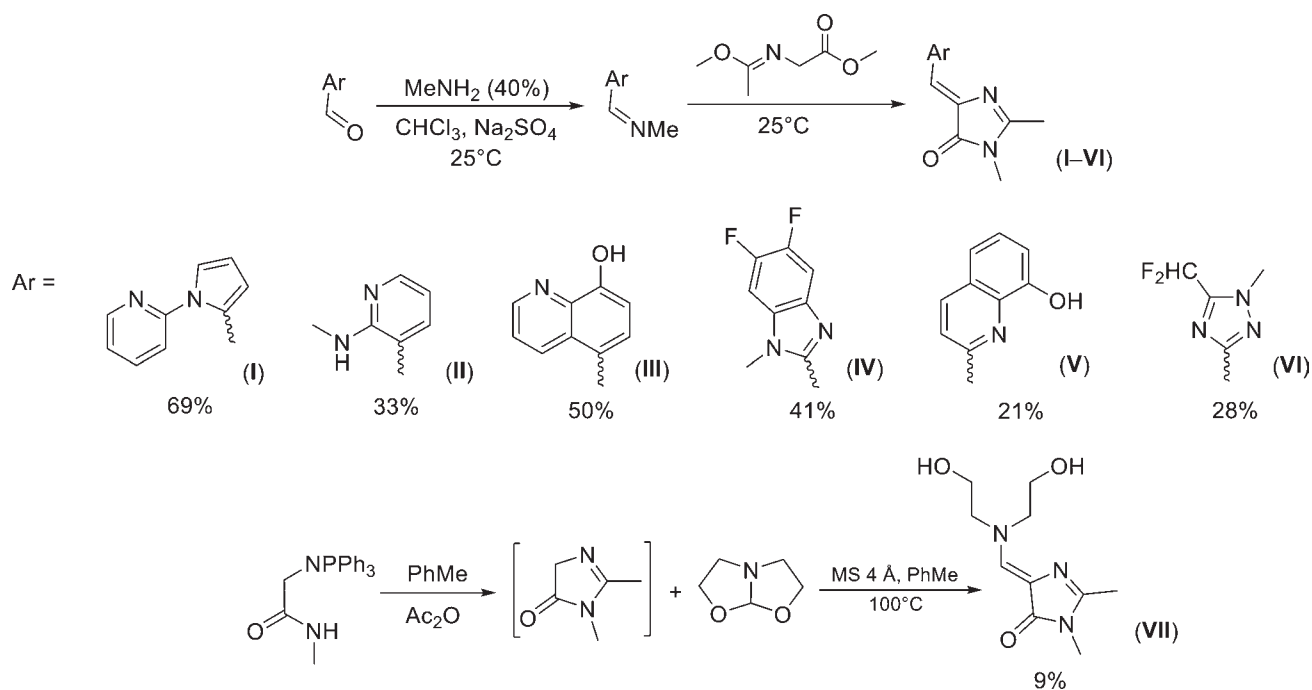


Схема 1. Схема синтеза арилиден-имидазолонов (**I–VI**) и их ациклического аналога (**VII**) с комплексообразующими функциональными группами.

Протекание реакции важно контролировать с помощью тонкослойной хроматографии, т.к. время полной конверсии сильно зависит от структуры использованного альдегида. В результате проведенного синтеза целевые соединения (**I–VI**) были получены с выходами 21–69%. Ациклический аналог (**VII**) мы синтезировали с опорой на литературную методику, основанную на использовании фосфазена, полученного из амида азидоуксусной кислоты [24] (схема 1). В данном случае выход продукта реакции (**VII**) оказался значительно ниже по сравнению с циклическими производными и составил 9%.

Строение синтезированных соединений было подтверждено методами ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения, спектральные данные соответствовали строению полученных соединений. Важно отметить, что во всех случаях (**I–VII**) преимущественно образовывался *Z*-изомер. Это было подтверждено характерным положением сигнала атома водорода кратной *экзо*-связи имидазолон в ¹H-ЯМР-спектрах (7–8 м.д.), показанным ранее для иных арилиден-имидазолонов, имеющих именно *Z*-конфигурацию [25]. Более того, хорошо известно, что данный изомер наиболее термодинамически стабилен. Так, в проведенных ранее исследованиях [25] было отмечено, что при комнатной температуре арилиден-имидазолон в большинстве случаев существуют исключительно в виде *Z*-изомеров и лишь иногда находятся в равновесной смеси с небольшим количеством *E*-изомера. Получение же чистых *E*-изомеров сопряжено с заметными техническими трудностями и может быть достигнуто либо при интенсивном облучении светом [25], либо при воздействии сильных кислот [26].

Далее были исследованы оптические свойства полученного ряда арилиден-имидазолонов и их ациклического аналога (табл. 1, а также табл. S1 и рис. S1.1–S1.7 в дополнительных материалах). Мы установили, что максимумы поглощения находятся в области 330–438 нм, а максимумы испускания – в области 421–555 нм. Заметной флуоресценцией отличались лишь соединения (**II**) и (**VI**), причем наибольшее значение квантового выхода флуоресценции имел арилиден-имидазолон (**VI**) с дифторметильной группой (схема 1).

Для всех полученных соединений мы изучили возможность образования флуоресцентных комплексов с ионами металлов. Для этого к растворам соединений (**I–VII**) в ацетонитриле добавляли растворы различных солей в воде. Изучение оптических свойств полученных смесей показало, что добавление ионов во многих случаях приводит к небольшому изменению формы и положения спектров (рис. 1, а также табл. S2 и рис. S2.1–S2.7 в дополнительных материалах). Тем не менее интенсивность флуоресценции данных растворов практически во всех случаях оказалась незначительной (табл. 2, а также табл. S2 в дополнительных материалах). Более того, для соединений (**II**) и (**VI**) при добавлении ионов металлов, напротив, наблюдалось выраженное гашение флуоресценции. Однако для соединений (**III**) и (**IV**), практически не проявлявших флуоресценцию в свободной форме, при связывании с катионами Cd²⁺ и Zn²⁺ наблюдалось заметное усиление флуоресценции (рис. 1, а также табл. S2 в дополнительных материалах). При этом такой же реакции на ионы других металлов не наблюдалось.

Таблица 1. Оптические свойства полученных соединений (**I–VII**) в ацетонитриле

Соединение	Максимум поглощения, нм	Коэффициент поглощения, M ⁻¹ см ⁻¹	Максимум испускания, нм	Квантовый выход флуоресценции, %
(I)	386	32 000	445	<0.05
(II)	435	17 500	520	0.63
(III)	390	20 000	497	<0.05
(IV)	352	31 500	456	<0.05
(V)	370	7500	518	<0.05
(VI)	345	9000	436	3.03
(VII)	335	13 000	~433	<0.05

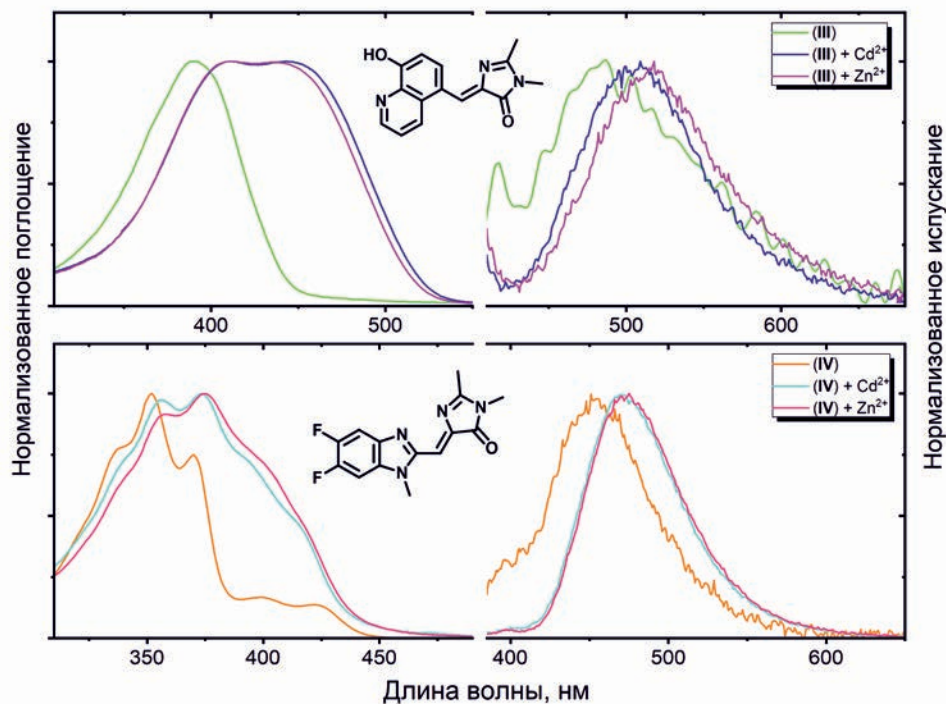


Рис. 1. Спектры поглощения и испускания соединений (III) и (IV) в смеси MeCN–H₂O в свободной форме и при добавлении ионов Cd²⁺ и Zn²⁺.

Таблица 2. Оптические свойства комплексов соединений (III) и (IV) с ионами Cd²⁺ и Zn²⁺

Комплекс	Максимум поглощения, нм	Коэффициент поглощения, М ⁻¹ см ⁻¹	Максимум испускания, нм	Квантовый выход флуоресценции, %	K _D , мкМ
(III) + Cd ²⁺	410	17 500	509	5.5	5.8 ± 0.6
(III) + Zn ²⁺	412	17 500	518	4.2	6.9 ± 1.7
(IV) + Cd ²⁺	374	15 000	470	7.5	15.2 ± 5.8
(IV) + Zn ²⁺	375	15 000	475	6.3	27.7 ± 7.5

Титрование соединений (III) и (IV) солями Cd(OAc)₂ и Zn(NO₃)₂ позволило рассчитать константы связывания арилиден-имидазолонов как полидентатных лигандов с соответствующими ионами (табл. 2, а также рис. S3.1–S3.4 в дополнительных материалах). Полученные значения позволяют предположить, что при добавлении растворов солей к синтезированным соединениям произошло образование комплексов, которое повлекло за собой усиление интенсивности флуоресценции.

Таким образом, мы обнаружили, что арилиден-имидазолы (III) и (IV) могут выступать в качестве сенсоров ионов кадмия и цинка и, как следствие,

применяться во флуоресцентной микроскопии для их детектирования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы. Коммерчески доступные реагенты использовали без дополнительной очистки. Для колоночной хроматографии применяли силикагель Kieselgel 60 (Merck, Германия). Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на силикагеле 60 F254 на стеклянных пластинах (Merck, Германия). Визуализацию осуществляли УФ-светом (254 или 312 нм) и проявляли KMnO₄. Все операции с чувствительными к влаге и кислороду воздуха веществами

проводили в атмосфере сухого аргона с использованием стандартной техники Шлэнка.

Спектры ЯМР (δ , м.д.; J , Гц) регистрировали на спектрометре Avance III NMR (700 МГц; Bruker, США) при 303 К. Химические сдвиги приведены относительно остаточных пиков CDCl_3 (7.27 м.д. для ^1H и 77.0 м.д. для ^{13}C) или $\text{DMSO}-d_6$ (2.51 м.д. для ^1H и 39.5 м.д. для ^{13}C), внутренний стандарт – Me_4Si . Температуры плавления определяли на приборе SMP 30 (Stuart Scientific, Великобритания) и дополнительно не корректировали. Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) регистрировали на приборе AB Sciex TripleTOF 5600+ (Sciex, Сингапур) с ионизацией методом электроспрея (ESI). Измерения проводили в режиме положительных или отрицательных ионов, диапазон m/z 50–3000. Напряжение на капилляре составляло 5.5 кВ в режиме регистрации положительных ионов и 4.5 кВ в режиме регистрации отрицательных ионов. Внешнюю или внутреннюю калибровку проводили с помощью раствора ESI Tuning Mix (Agilent, США). Шприц использовали для растворов в ацетонитриле, метаноле или воде (скорость подачи 30 мкл/мин). В качестве газа-носителя применяли сухой азот, его выходную температуру устанавливали на 180°C.

Общая методика синтеза (Z)-5-(арилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-онов (I–VI). К раствору соответствующего ароматического альдегида (5 ммоль) в CHCl_3 (25 мл) добавляли 40%-ный раствор метиламина в изопропанол (0.87 мл, 10 ммоль) и Na_2SO_4 (5 г). Смесь перемешивали в течение 48 ч при 25°C, фильтровали от Na_2SO_4 , растворитель упаривали. К полученному продукту добавляли метил-(Z)-2-((1-метоксиэтилиден)амино)ацетат (1.13 г, 7 ммоль). Смесь перемешивали в течение 24–72 ч при 25°C. Протекание реакции контролировали с помощью тонкослойной хроматографии в смеси растворителей CH_2Cl_2 –EtOH (100 : 5), наблюдали исчезновение бесцветного пятна с меньшим R_f и образование цветного пятна продукта с большим R_f . По достижении полной конверсии проводили выделение продукта. При получении соединений (I–IV) образовывался осадок, его отфильтровывали, промывали Et_2O (3 × 5 мл), сушили при пониженном давлении. В случае соединений (V) и (VI) осадок не образовывался, поэтому раствор упаривали, а получившийся продукт очищали

колоночной хроматографией на силикагеле (CH_2Cl_2 –EtOH, 100 : 5).

Синтез (Z)-5-((бис(2-гидроксиэтил)амино)метил)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-она (VII). К раствору *N*-метил-2-((трифенил- λ^5 -фосфанилиден)амино)ацетамида (1 г, 2.87 ммоль, 1 экв.) в безводном толуоле (20 мл) в атмосфере аргона добавляли As_2O (271 мкл, 2.87 ммоль, 1 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 ч до полного растворения. Далее добавляли молекулярные сита 4 Å (2 г) и тетрагидро-7aH-оксазол[2,3-*b*]оксазол (231 мг, 2 ммоль, 0.7 экв.). Смесь грели в масляной бане при 100°C в течение 3 ч, фильтровали от молекулярных сит, растворитель упаривали. Полученный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (CH_2Cl_2 –EtOH, 100 : 5), после чего дополнительно перекристаллизовывали (гексан– CH_2Cl_2 , 1 : 10).

Спектральные характеристики синтезированных соединений (I–VII). **(Z)-2,3-диметил-5-((1-пиридин-2-ил)-1H-пиррол-2-ил)метил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (I).** Оранжевый порошок (918 мг, 69%), т. пл. 185–187°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 2.33 (с, 3H), 3.06 (с, 3H), 6.48 (м, 1H), 7.19 (с, 1H), 7.49 (дд, J 7.5, 4.9, 1.0, 1H), 7.51 (дд, J 2.7, 1.7, 1H), 7.58 (д, J 8.0, 1H), 7.63 (дд, J 3.8, 1.3, 1H), 8.06 (тд, J 7.7, 1.9, 1H), 8.63 (ддд, J 4.8, 1.9, 0.8, 1H). ^{13}C -ЯМР (176 МГц, CDCl_3-d_6): 15.5, 26.5, 112.3, 116.4, 118.9, 120.9, 122.2, 126.2, 128.5, 135.0, 138.6, 149.5, 151.3, 160.0, 170.2. HR-MS (ESI) m/z : найдено 267.1240 (рассчитано для $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}^+$, $[M + \text{H}]^+$ 267.1240).

(Z)-2,3-Диметил-5-((2-(метиламино)пиридин-3-ил)метил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (II). Темно-оранжевый порошок (378 мг, 33%), т. пл. 178–180°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 2.35 (с, 3H), 2.88 (д, J 4.4, 3H), 3.11 (с, 3H), 6.59 (дд, J 7.5, 4.7, 1H), 7.04 (с, 1H), 8.09 (дд, J 4.7, 1.8, 1H), 8.30 (уш. д, J 4.2, 1H), 8.40 (дд, J 7.6, 1.7, 1H). ^{13}C -ЯМР (75 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 15.3, 26.3, 28.1, 111.7, 113.3, 121.4, 136.8, 141.6, 150.4, 157.3, 162.1, 169.0. HR-MS (ESI) m/z : найдено 231.1240 (рассчитано для $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}^+$, $[M + \text{H}]^+$ 231.1240).

(Z)-5-((8-Гидроксихинолин-5-ил)метил)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (III). Коричнево-зеленый порошок (668 мг, 50%), т. пл. 247–249°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 2.38 (с, 3H), 3.13 (с, 3H), 7.24 (д, J 8.3, 1H), 7.60 (с, 1H), 7.67 (дд, J 8.6, 3.9, 1H), 8.79 (дд, J 8.8, 1.1, 1H), 8.92

(дд, J 3.9, 1.3, 1H), 9.05 (д, J 8.3, 1H), 10.49 (уш. с, 1H). ^{13}C -ЯМР (176 МГц, DMSO- d_6): 15.3, 26.2, 111.8, 118.6, 120.4, 122.7, 128.2, 131.8, 133.4, 137.7, 138.3, 148.2, 155.7, 163.6, 169.7. HR-MS (ESI) m/z : найдено 268.1061 (рассчитано для $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_2^+$, $[M + \text{H}]^+$ 268.1081).

(Z)-5-((5,6-Дифтор-1-метил-1H-бензо[d]-имидазол-2-ил)метил)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (IV). Светло-желтый порошок (595 мг, 41%), т. пл. 192–194°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): 1.70 (с, 3H), 2.83 (с, 3H), 2.88 (с, 3H), 3.78 (с, 3H), 5.89 (с, 1H), 7.60 (дд, J 11.2, 7.5, 1H), 7.69 (дд, J 10.9, 7.2, 1H), 8.65 (с, 1H). ^{13}C -ЯМР (151 МГц, DMSO- d_6): 23.8, 24.2, 29.7, 47.4, 79.1, 98.0 (д, J 23.1), 98.3, 104.8 (д, J 20.2), 130.6 (д, J 11.5), 137.9 (д, J 10.6), 140.1, 146.5 (дд, J 238.5, 17.31), 146.5 (дд, J 236.6, 15.39), 154.0 (д, J 1.9) 162.0. HR-MS (ESI) m/z : найдено 291.1053 (рассчитано для $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}^+$, $[M + \text{H}]^+$ 291.1052).

(Z)-5-((8-Гидроксихиолин-2-ил)метил)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (V). Коричневый порошок (280 мг, 21%), т. пл. 198–200°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): 2.43 (с, 3 H), 3.14 (с, 3 H), 7.11 (дд, J 7.6, 1.1, 1H), 7.16 (с, 1H), 7.39 (дд, J 8.2, 1.0, 1H), 7.48 (т, J 7.8, 1 H), 8.37 (д, J 8.6, 1H), 8.89 (д, J 8.8, 1H), 9.76 (с, 1H). ^{13}C -ЯМР (176 МГц, DMSO- d_6): 15.5, 26.4, 111.5, 117.4, 123.6, 124.2, 127.8, 128.8, 136.0, 138.5, 141.9, 151.4, 153.5, 166.9, 170.0. HR-MS (ESI) m/z : найдено 268.1083 (рассчитано для $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_2^+$, $[M + \text{H}]^+$ 268.1081).

(Z)-5-((5-(Дифторметил)-1-метил-1H-1,2,4-триазол-3-ил)метил)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (VI). Коричневый порошок (357 мг, 28%), т. пл. 140–142°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): 2.35 (с, 3H), 3.09 (с, 3H), 4.04 (с, 3H), 6.70 (с, 1H), 7.44 (т, J 51.8, 1H). ^{13}C -ЯМР (176 МГц, DMSO- d_6): 15.3, 26.3, 36.6, 107.9 (т, J 236.6), 112.3, 141.5, 148.4 (т, J 28.1), 156.7, 167.0, 169.9. HR-MS (ESI) m/z : найдено 256.1011 (рассчитано для $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{N}_5\text{O}^+$, $[M + \text{H}]^+$ 256.1004).

(Z)-5-((бис(2-Гидроксиэтил)амино)метил)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (VII). Бежевый порошок (100 мг, 9%), т. пл. 135–137°C. ^1H -ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): 2.13 (с, 3H), 3.01 (с, 3H), 3.44 (т, J 4.8, 2H), 3.57 (кв, J 5.0, 2H), 3.64 (кв, J 3.8, 2H), 3.94 (т, J 5.5, 2H), 4.81 (т, J 5.2, 2H), 6.95 (с, 1H). ^{13}C -ЯМР (176 МГц, DMSO- d_6): 14.6, 25.8, 51.4, 59.0,

59.1, 59.2, 113.1, 139.5, 147.8, 168.7. HR-MS (ESI) m/z : найдено 228.1343 (рассчитано для $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_3^+$, $[M + \text{H}]^+$ 228.1343).

Оптические свойства арилиден-имидазолонов (I–VI) и их ациклического аналога (VII). Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Cary 100 Bio (Varian, США), спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США). Для эксперимента с ионами металлов использовали следующие соли: FeCl_2 , FeCl_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, AcOLi , $\text{Cd}(\text{AcO})_2$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Cu}(\text{AcO})_2$, NiSO_4 , MgCl_2 , BaCl_2 , $\text{Co}(\text{AcO})_2$. Для изучения связывания стоковые растворы соединений (I–VII) в DMSO (10 мМ) разбавляли смесью ацетонитрил–вода (1 : 1, концентрации 20–50 мкМ), после чего регистрировали спектры поглощения и испускания без добавления ионов металлов. Далее готовили новые растворы соединений (I–VII) в ацетонитриле с концентрациями 40–100 мкМ соответственно. Водные растворы различных солей разбавляли до тех же концентраций, после чего смешивали их с растворами соединений (I–VII) в ацетонитриле в соотношении 1 : 1 и регистрировали спектры поглощения и флуоресценции.

Титрование соединений (III) и (IV) солями кадмия и цинка. Константы связывания определяли спектрофлуориметрическим титрованием соединений (III) и (IV) растворами солей $\text{Cd}(\text{AcO})_2$ и $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ различной начальной концентрации (0.1, 1, 10 и 80 мкМ) на приборе Tecan Infinite 200 Pro M Nano (Tecan, США). Концентрация хромофоров составляла 0.1 мкМ. Анализ проводили с использованием программного обеспечения Origin 8.6 (<https://www.originlab.com/>). Константы диссоциации (K_D), приведенные в табл. 2, рассчитывали методом наименьших квадратов. Данные представляли собой среднее значение \pm стандартная ошибка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезирована серия арилиден-имидазолонов и их ациклический аналог с комплексобразующими группами, а также исследованы оптические свойства полученных соединений. Установлено, что выраженным разгоранием флуоресценции при смешивании с солями FeCl_2 , FeCl_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, AcOLi , $\text{Cd}(\text{AcO})_2$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Cu}(\text{AcO})_2$, NiSO_4 , MgCl_2 , BaCl_2 и $\text{Co}(\text{AcO})_2$ отличались практически не флуоресцирующие в свободном виде соединения (III) и (IV). При этом единственными катионами с таким эффектом оказались

Cd^{2+} и Zn^{2+} . Соединение (IV) обладает большей интенсивностью флуоресценции в составе комплексов, тогда как соединение (III), напротив, лучше связывается с ионами металлов.

Таким образом, полученные арилиден-имидазолон (III) и (IV) – перспективные флуоресцентные сенсоры ионов кадмия и цинка, которые потенциально могут быть использованы в качестве селективных красителей для наблюдения за функциональной активностью живых клеток в ходе биологических исследований.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-73-10004).

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. *Klementieva N.V., Snopova L.B., Prodanets N.N., Furman O.E., Dudenkova V.V., Zagaynova E.V., Lukyanov K.A., Mishin A.S. // Anticancer Res. 2016. V. 36. P. 5287–5294. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.11100>*
2. *Povarova N.V., Petri N.D., Blokhina A.E., Bogdanov A.M., Gurskaya N.G., Lukyanov K.A. // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18. P. 1503. <https://doi.org/10.3390/ijms18071503>*
3. *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>*
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.jpcclett.8b00512>*
6. *Baleeva N.S., Myannik K.A., Yampolsky I.V., Baranov M.S. // Eur. J. Org. Chem. 2015. V. 26. P. 5716–5721. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201500721>*
7. *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>*
8. *Perfilov M.M., Zaitseva E.R., Smirnov A.Yu., 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>*
9. *Olsen S., Baranov M.S., Baleeva N.S., Antonova M.M., Johnson K.A., Solntsev K.M. // Phys. Chem. Chem. Phys. 2016. V. 18. P. 26703–26711. <https://doi.org/10.1039/C6CP02423H>*
10. *Davie E.W., Fujikawa K., Kisiel W. // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 10363–10370. <https://doi.org/10.1021/bi00107a001>*
11. *Dascal N. // Trends Endocrinol. Metab. 2001. V. 12. P. 391–398. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(01\)00475-1](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(01)00475-1)*
12. *Bren V.A. // Russ. Chem. Rev. 2001. V. 70. P. 1017–1036. <https://doi.org/10.1070/RC2001v070n12ABEH000667>*
13. *Kubo K., Sakurai T. // Heterocycles. 2000. V. 52. P. 945. <https://doi.org/10.3987/REV-99-SR3>*
14. *Valeur B. // Coord. Chem. Rev. 2000. V. 205. P. 3–40. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(00\)00246-0](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(00)00246-0)*
15. *Ghosh P., Bharadwaj P.K., Roy J., Ghosh S. // J. Am. Chem. Soc. 1997. V. 119. P. 11903–11909. <https://doi.org/10.1021/ja9713441>*
16. *Hirano T., Kikuchi K., Urano Y., Higuchi T., Nagano T. // J. Am. Chem. Soc. 2000. V. 122. P. 12399–12400. <https://doi.org/10.1021/ja002467f>*
17. *Iwamoto K., Araki K., Fujishima H., Shinkai S. // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1. 1992. V. 1992. P. 1885. <https://doi.org/10.1039/P19920001885>*
18. *Kubo Y., Obara S., Tokita S. // Chem. Commun. 1999. V. 1999. P. 2399–2400. <https://doi.org/10.1039/A908001E>*

19. *Shabunina O.V., Starnovskaya E.S., Shaitz Ya.K., Kopchuk D.S., Sadieva L.K., Kim G.A., Taniya O.S., Nikonov I.L., Santra S., Zyryanov G.V., Charushin V.N.* // *J. Photochem. Photobiol. A.* 2021. V. 408. P. 113101.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2020.113101>
20. *Kopchuk D.S., Slepukhin P.A., Kovalev I.S., Khasanov A.F., Taniya O.S., Shabunina O.V., Zyryanov G.V., Rusinov V.L., Chupakhin O.N.* // *Polyhedron.* 2016. V. 110. P. 235–240.
<https://doi.org/10.1016/j.poly.2016.02.047>
21. *He H., Jenkins K., Lin C.* // *Anal. Chim. Acta.* 2008. V. 611. P. 197–204.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.01.059>
22. *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>
23. *Baleeva N.S., Baranov M.S.* // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2016. V. 52. P. 444–446.
<https://doi.org/10.1007/s10593-016-1909-4>
24. *Zaitseva S.O., Golodukhina S.V., Baleeva N.S., Levina E.A., Smirnov A.Y., Zagudaylova M.B., Baranov M.S.* // *ChemistrySelect.* 2018. V. 3. P. 8593–8596.
<https://doi.org/10.1002/slct.201801349>
25. *Voliani V., Bizzarri R., Nifosi R., Abbruzzetti S., Grandi E., Viappiani C., Beltram F.* // *J. Phys. Chem. B.* 2008. V. 112. P. 10714–10722.
<https://doi.org/10.1021/jp802419h>
26. *Bozhanova N.G., Baranov M.S., Sarkisyan K.S., Gritcenko R., Mineev K.S., Golodukhina S.V., Baleeva N.S., Lukyanov K.A., Mishin A.S.* // *ACS Chem. Biol.* 2017. V. 12. P. 1867–1873.
<https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00337>

Arylidene-Imidazolones and Their Acyclic Analogue as Fluorescent Sensors of Metal Ions

S. A. Krasnova*^{*,,#}, E. R. Zaitseva*, D. I. Rudik*^{*,***}, D. S. Ivanov*^{*,****},
A. A. Mikhaylov*, 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*

^{***} *Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba,
ul. Miklukho-Maklaya 6, Moscow, 117198 Russia*

^{****} *M. Lomonosov Moscow State University,
ul. Leninskiye Gory 1, Moscow, 119991 Russia*

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

We report about a series of methylene-imidazolones with complexing groups. The fluorescent properties of these compounds were studied in various solvents as well as in the presence of different salts. We discovered that two of the synthesized substances – hydroxyquinolidene-imidazolone and difluorobenzimidazolidene-imidazolone – can be used as selective fluorescent sensors for cadmium and zinc ions and potentially as markers for monitoring intracellular processes.

Keywords: arylidene-imidazolones, fluorescent sensors, fluorescence