

первой и третьей опытных групп по отношению к контролю (на 32%) и в сравнении с животными 2 опытной группы (у которых его уровень был повышен).

Выводы. Совместное поступление ацетата свинца и этанола усугубляет аминокислотный дисбаланс в микробно-тканевом комплексе толстого кишечника. Впервые показано, что острая алкогольная интоксикация на фоне субхронической свинцовой повышает уровни лизина, аспартата, глицина, цитруллина - которые являющиеся продуктами бактериального синтеза. Напротив уменьшаются концентрации аминокислот, которые активно включающихся в образование белкового компонента муцина (треонин) а также которые являющихся предпочтительными субстратами для кишечной микробиоты (глутамат, изолейцин, триптофан).

ЛИТЕРАТУРА

1. Amino acid metabolism / N. S. Chandel [et al.] // Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2021. – Vol. 13, N 4.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33795250/> a040584

2. Gut Microbiota Targeted Approach in the Management of Chronic Liver Diseases / J. Liu [et al.] // Front Cell Infect Microbiol. – 2022. – 12. Vol. – P. 1-30 <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.774335>.

3. Николаева, И. В. / Уровень свободных аминокислот и их метаболитов в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника и печени в условиях введения ацетата свинца / И.В. Николаева, В. М. Шейбак, Е. М. Дорошенко // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 2. – С. 000–000. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-000-000>

4. The role of probiotic intervention in regulating gut microbiota, short-chain fatty acids and depression-like behavior in lead-exposed rats / X.Chen[et al.] // Int J. Occup Med Environ Health. – 2022. – 35. №1. P. 95–106. <https://doi.org/10.13075/ijom.1896.01795>.

ОЦЕНКА 1,3-ДИКАРБОНИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 2-ОКСИНДОЛА В КАЧЕСТВЕ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ

Панада Я.В., Фролова Н.С., Фалетров Я.В.

*Учреждение БГУ "Научно-исследовательский институт
физико-химических проблем", Минск, Республика Беларусь*

Актуальность. Конъюгация низкомолекулярных соединений со специфичными сайтами белков представляет собой важный инструмент для получения антител, действующих как носители лекарств, и меченых зондов для исследовательских, аналитических и клинических целей [1-3]. Кроме того, намеренное повреждение белков с помощью реакционноспособных электрофильных агентов (например, сесквитерпена зерумбона) может быть использовано для индуцирования апоптотических и аутофагических

механизмов запрограммированной клеточной гибели и осуществления потенциального хемопротекторного эффекта [4-6]. Наиболее распространенной целью для химической модификации являются остатки цистеина, характеризующиеся сочетанием высокой нуклеофильности, сравнительно низкой природной долей и удобством введения путем сайт-специфичного мутагенеза [3]. Классический метод модификации состоит в реакции тиольных групп остатков цистеина с α -галогенкарбонильными либо α,β -ненасыщенными карбонильными соединениями (например, малеимидами). В то же время, данный метод может приводить к образованию побочных продуктов и снижению белковой активности ввиду формирования внутримолекулярных дисульфидных связей. В качестве альтернативой мишени может выступать N-концевая α -аминогруппа, являющаяся ключевым сайтом для посттрансляционных модификаций, регулирующих процессы активации, превращения и деградации белков [1]. Таким образом, дизайн реагентов для контролируемой химической N-концевой модификации белков с целью модулирования аутофагии и прочих процессов представляет интерес для клинической терапии.

Цель. Целью данной работы было получение двух α,β -ненасыщенных дикарбонильных производных 2-оксиндола и оценка их взаимодействия с модельным белком альбумином.

Материалы и методы исследования. В работе были использованы следующие реагенты: изатин (Реахим, ч.д.а.), ацетилацетон (Реахим, ч.д.а.), диэтилоксалоацетат натрия (Acros Organics, 95%), 1,4-дизабицикло[2.2.2]октан (DABCO; Merck, >98%), альбумин из сыворотки быка (BSA; Sigma-Aldrich), додецилсульфат натрия (SDS; Wako Pure Chemical Industries, 95%); 2-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$). Все растворители были перегнаны перед использованием. Конъюгаты **1** и **2** были получены путем конденсации изатина и соответствующего дикарбонильного соединения в присутствии 20 мол. % DABCO с выходом 46% и 52%, соответственно (рисунок) [7].

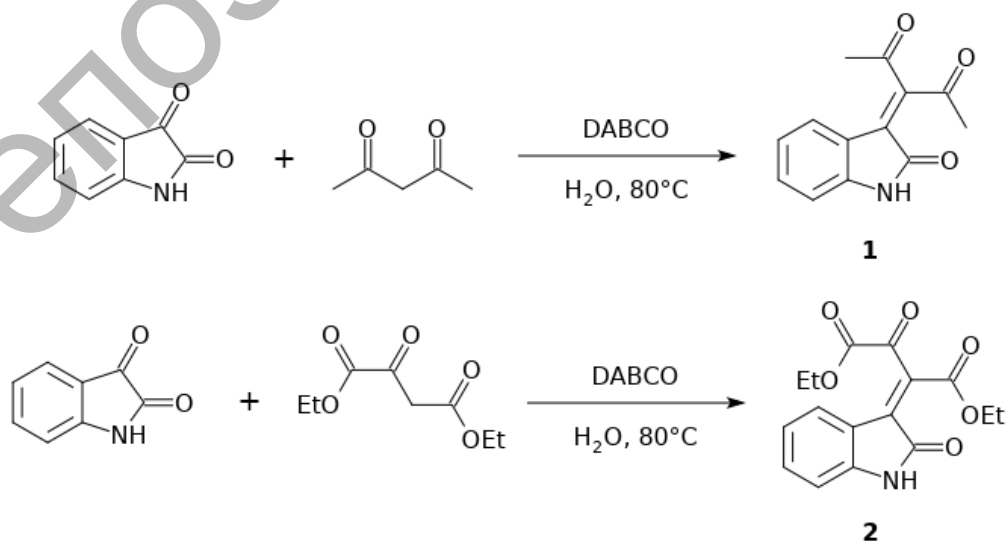


Рисунок – Схема синтеза оксиндольных конъюгатов по реакции Кнёвенагеля

Для оценки взаимодействия с BSA аликвоту соответствующего оксиндола в этаноле добавляли к 2,5 мл р-ра BSA в натрий-фосфатном буфере (pH = 7,0; 1,32 мг/мл BSA, 20 мкМ) и инкубировали при 37°C на протяжении 6 ч [1, 8]. В качестве контроля был использован натрий-фосфатный буфер, не содержащий белка. Конечная концентрация оксиндола составляла от 3 до 4 мМ. Конечная доля этанола не превышала 1%. По окончании опыта свободный лиганд экстрагировали 0,5 мл CHCl_3 . Для оценки неспецифического связывания раствор белка подвергали денатурации в присутствии 1% SDS и 0,01 М 2-меркаптоэтанола на протяжении 1 ч при 25°C и повторно экстрагировали 0,5 мл CHCl_3 . Остаток после упаривания экстрактов перерастворяли в 1,5 мл этанола, фильтровали и фотометрировали на приборе Solar PB2201 (Беларусь).

Результаты и обсуждение.

Как можно видеть из таблицы, в присутствии альбумина количество экстрагированного лиганда **1** сокращается до 26% от контроля, что указывает на значительное связывание с белком. При денатурации и повторной экстракции высвобожденного лиганда не было обнаружено статистически значимых различий между контрольным и опытными образцами, что позволяет предположить ковалентную природу взаимодействия между **1** и альбумином.

Таблица – Сравнительная концентрация несвязанного лиганда

Образец	OD ⁴²⁰	Отн. доля, %	Образец	OD ²⁸⁵	Отн. доля, %
1 (конт.)	2,00±0,04	100±2	2 (конт.)	0,65±0,05	100±8
1 (BSA)	0,52±0,06	26±3	2 (BSA)	0,61±0,05	94±8
1 (конт., SDS)	0,17±0,04	8,5±2	2 (конт., SDS)	0,42±0,04	65±6
1 (BSA, SDS)	0,20±0,05	10±2,5	2 (BSA, SDS)	0,51±0,03	78±5

В противоположность тому, первичная экстракция лиганда **2** показывает сопоставимые количества несвязанного лиганда в контрольном и опытном образцах, что свидетельствует о более слабом белок-лигандном взаимодействии по сравнению с конъюгатом **1**. Денатурация и повторная экстракция приводят к увеличению количества экстрагированного конъюгата на 21% относительно контрольного образца, не содержащего альбумин, что подтверждает неспецифичное нековалентное связывание **2**. Наблюдаемое различие в реакционной способности **1** и **2** может быть объяснено стерическими факторами и отталкиванием между электронными парами кето- и карбоксильных групп в боковой цепи **2**, что приводит к отклонению от планарной сопряженной структуры и снижению активирующего эффекта двойной углерод-углеродной связи на кетогруппу.

Выводы. В ходе данной работы были получены два α,β -ненасыщенные дикарбонильные конъюгата 2-оксиндола и проведена оценка их способности ковалентного взаимодействия с аминок группами белков на примере модели альбумина. Для конъюгата **1** выявлено существенное связывание с альбумином с признаками ковалентного взаимодействия, тогда как для конъюгата **2** наблюдалось более слабое неспецифическое связывание. Предложено объяснение наблюдаемых различий в реакционной способности, связанное с

влиянием строения на электронную структуру молекул и, как следствие, сравнительную активность кетогруппы. Полученные результаты представляют интерес для дальнейшей оптимизации и дизайна реагентов для модификации белков на основе кетопроизводных 2-оксиндола.

Данная работы была выполнена в рамках задания ГПНИ 2.2.04.01 (программа "Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биооргхимия", подпрограмма "Биорегуляторы", № гос. регистрации 20210560).

ЛИТЕРАТУРА

1. N-terminal α -amino group modification of antibodies using a site-selective click chemistry method / D. Li [et al.] // mAbs. – 2018. – Vol. 10. – P. 712-719.

2. Chung, W.-J. Chemical modulation of M13 bacteriophage and its functional opportunities for nanomedicine / W.-J. Chung, D.-Y. Lee, S. Y. Yoo // Int. J. Nanomed. – 2014. – Vol. 9. – P. 5825-5836.

3. Yu, J. Highly reactive and tracelessly cleavable cysteine-specific modification of proteins via 4-substituted cyclopentenone / J. Yu, X. Yang, Z. Yin // Angew. Chem. – 2018. – Vol. 130. – P. 11772-11776.

4. Zerumbone, an electrophilic sesquiterpene, induces cellular proteo-stress leading to activation of ubiquitin–proteasome system and autophagy / K. Ohnishi [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Comm. – 2013. – Vol. 430. – P. 616-622.

5. To eat, or NOt to eat: S-nitrosylation signaling in autophagy / C. Montagna [et al.] // FEBS J. – 2016. – Vol. 283. – P. 3857-3869.

6. Dopamine-derived biological reactive intermediates and protein modifications: implications for Parkinson's disease / Y. Jinsmaa [et al.] // Chem. Biol. Interact. – 2011. – Vol. 192. – P. 118-121.

7. Approaches towards 3-substituted-3-hydroxyoxindole and spirooxindole-pyran derivatives in a reaction of isatin with acetylacetone in aqueous media / R. Chandran [et al.] // ChemistrySelect. – 2019. – Vol. 4. – P. 12757-12761.

8. Получение флуоресцентно-меченых препаратов бычьего сывороточного альбумина и определение их спектральных характеристик / О. А. Завадская [и др.] // Вестник БГУ. Серия 2. – 2016. – № 2. – С. 12-17.

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ В ЦИТОПЛАЗМЕ ПЕРВИЧНЫХ СПЕРМАТОЦИТОВ СЕМЕННИКОВ КРЫС В РАННЕМ ПЕРИОДЕ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *E. COLI*

Поплавская Е.А.

*УО «Гродненский государственный медицинский университет»,
Гродно, Республика Беларусь*

Эффективная борьба с инфекциями, сопровождающимися развитием воспалительного процесса в органах мочеполовой системы человека и животных, а также приводящих в последующем к развитию бесплодия, является одной из наиболее актуальных проблем. Сперматогенез является