

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Краснов Владимир Сергеевич

**Синтез, структурно-функциональные свойства и тканеспецифичная
инактивация митохондриальных разобщителей на основе умбеллиферона и
анилинотиофена**

1.4.9. Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва 2025

Работа выполнена на кафедре химии природных соединений химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Научные руководители

Антоненко Юрий Николаевич

доктор биологических наук, профессор

Кирсанов Роман Сергеевич

кандидат химических наук

Официальные оппоненты

Мелик-Нубаров Николай Сергеевич

доктор химических наук, ведущий научный сотрудник кафедры высокомолекулярных соединений химического факультета, МГУ имени М.В. Ломоносова

Дубинин Михаил Васильевич

доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры биохимии, клеточной биологии и микробиологии, Институт естественных наук и фармации, Марийский государственный университет

Круглов Алексей Георгиевич

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории тканевой инженерии, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

Защита диссертации состоится «17» февраля 2026 г. в 16 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.014.2 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, НИИ ФХБ, аудитория 501.

E-mail: agapkina@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <http://dissovet.msu.ru/dissertation/3727/>

Автореферат разослан _____ 20 ____ г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук

Ю.Ю. Агапкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Хемиосмотическая теория, предложенная британским биохимиком Питером Митчеллом в 1961 году, произвела революцию в понимании синтеза аденоциантифосфата (АТФ) в процессе окислительного фосфорилирования и фотосинтеза. Согласно Митчеллу, энергия, получаемая из цепи переноса электронов (ЭТЦ), используется для синтеза АТФ не напрямую, а посредством создания электрохимического протонного градиента, называемого протондвижущей силой, на энергопреобразующих биологических мембранах – внутренней митохондриальной мемbrane или тилакоидной мембране хлоропластов. Этот градиент, называемый протондвижущей силой, состоит как из химической составляющей (разница в концентрации протонов, или ΔpH), так и разности электрических потенциалов на мембране (мембранный потенциал, $\Delta \psi$). Комплексы ЭТЦ действуют как протонные насосы, перемещая протоны из митохондриального матрикса (или стромы хлоропласта) в межмембранные пространство (или люмен тилакоида) за счёт энергии, выделяемой при окислении органических субстратов (в случае митохондрий) или энергии света (в случае хлоропластов).

Разобщителями называют соединения (как низко-, так и высокомолекулярные), которые нарушают связь (сопряжение) между переносом электронов по ЭТЦ и синтезом АТФ, позволяя протонам «обходить» АТФ-синтазу. Этот процесс преобразует энергию, запасенную в виде протондвижущей силы, в тепло, а не в энергию фосфодиэфирной связи АТФ, рассеивая протонный градиент через внутреннюю мембрану митохондрий. Концепция разобщения возникла уже на ранних этапах развития митохондриальной биоэнергетики, в частности при изучении термогенеза в бурой жировой ткани. В 1970-х годах исследователи показали высокую скорость дыхания митохондрий бурой жировой ткани, не зависящую от скорости синтеза АТФ, что привело к открытию разобщающего белка 1 (UCP1) – протонного канала, имеющего решающее значение для термогенеза у млекопитающих. Это открытие подтвердило хемиосмотическую теорию Питера Митчелла.

Первые синтетические разобщители, такие как 2,4-динитрофенол (DNP), были идентифицированы в 1930-х годах. DNP приобрел известность как лекарство от ожирения как животных, так и человека. Выявленные побочные эффекты DNP быстро ограничили терапевтическое применение этого препарата, хотя его до сих пор продолжают применять в сфере фитнеса. Классическими разобщителями, широко используемыми в научных экспериментах, являются также карбонилцианид м-хлорфенилгидразон (СССР) и карбонилцианид п-трифторметоксифенилгидразон (FCCP). Разобщители имеют общие

структурные мотивы: диссоциирующую группу (например, фенольную -ОН или аминогруппу - NH), объемную гидрофобную часть (например, ароматические кольца) и сильные акцепторные заместители (например, нитро- или трифторметоксигруппы), что обеспечивает высокую протонофорную активность, т.е. способность соединений переносить протоны через липидные мембранны, чередуя протонированные и депротонированные состояния. Большинство известных разобщителей являются анионными: их протонированная форма электронейтральна, а депротонированная – заряжена отрицательно. Для повышения эффективности разобщения анионная форма разобщителя должна быть максимально стабильной в гидрофобной липидной мембране, что и достигается электроноакцепторными заместителями, ароматической системой или гидрофобными остатками – они делокализуют или экранируют заряд для облегчения проникновения в биологические мембранны.

Разобщители представляют собой класс соединений со значительным терапевтическим потенциалом, благодаря способности нарушать запасание энергии на митохондриальной мембране. Хотя рассеивание протондвижущей силы снижает эффективность синтеза АТФ, физиологические последствия умеренного снижения мембранныго потенциала обуславливают терапевтическую применимость таких соединений. В частности, уменьшение протонного градиента минимизирует побочные реакции в цепи переноса электронов, тем самым существенно снижая образование активных форм кислорода (АФК). Дополнительно, разобщители стимулируют механизмы контроля качества митохондрий – митофагию, а также приводят к увеличению массы митохондриального ретикулума в качестве компенсаторного адаптивного ответа. Конечным эффектом является омоложение митохондриальной сети, что делает разобщители перспективными кандидатами для лечения митохондриальной дисфункции при различных метаболических и возрастных заболеваниях. Способность разобщителей, наряду с нарушением запасания энергии на мембране, снижать уровень АФК лежит в основе их пристального изучения с целью лечения не только ожирения, но также и широкого круга заболеваний, связанных с окислительным стрессом, включая нейродегенеративные и сердечно-сосудистые патологии. Рассматривается также перспектива использования разобщителей для избирательного воздействия на раковые клетки путём индукции метаболического стресса. Отдельно следует отметить антибактериальные и противовирусные свойства протонофоров, используемые для лечения инфекционных болезней.

Терапевтический потенциал митохондриальных разобщителей не следует недооценивать, основываясь на общих заявлениях о токсичности, которая на самом деле специфична для каждого соединения. Ярким примером является 2,4-динитрофенол (DNP), который демонстрирует низкую клеточную токсичность, а его клиническая неудача была обусловлена, главным образом, специфическим дозозависимым побочным эффектом — катарктогенезом, наблюдавшимся у

некоторых пациентов. Это подчёркивает, что проблема применения разобщителей часто заключается не в системной токсичности, а в достижении тканеспецифического действия. Следовательно, в настоящее время исследования сосредоточены на таких стратегиях, как создание направленных «мягких» разобщителей, разработка тканеспецифических про-лекарств и модификация существующих препаратов, таких как разрешенный FDA нитазоксанид или простые эфиры DNP, для использования преимуществ митохондриального разобщения и одновременного смягчения его опасных последствий.

На основе результатов исследования синтезированных ранее в нашей лаборатории липофильных производных таких известных флуоресцентных индикаторов как флуоресцеин, нитробензоксиазол (NBD) и родамин, была обоснована стратегия создания разобщителей-флуорофоров, заключающаяся в присоединении липофильного алкильного заместителя оптимальной длины к соединению с подходящим значением pK_a протон-донорной группы. В настоящей работе в качестве перспективной основы для создания новых разобщителей было выбрано семейство кумаринов – природных ароматических производных 5,6-бензо- α -пирона. Выбор такой структуры был обусловлен её подтвержденной низкой токсичностью для млекопитающих, высокой терапевтической активностью и подходящим pK_a , в частности, 7-гидроксикумарина (умбеллиферона). Более того, структура 7-гидроксикумаринового остова легко поддается синтетической модификации с целью повышения разобщающей эффективности. Так, в литературе представлено множество способов как модификации кумаринового остова (например, прямое алкилирование кумаринов по 3-положению или синтез 3-замещённых 7-гидроксикумаринов в одну стадию), так и синтеза различных производных 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты (взятой за основу в нашей работе). Кроме того, применение конденсаций Кневенагеля и Пехмана позволяет получать замещенные по 3-му, 4-му и 6-му положениям производные умбеллиферона из более простых, коммерчески или синтетически доступных соединений.

Цели и задачи исследования

Основной целью исследования на первом этапе были химический синтез и определение протонофорной активности нового типа потенциальных разобщителей окислительного фосфорилирования – производных 7-гидроксикумарина (умбеллиферона). В связи с этим основными задачами были:

- Химическая модификация умбеллиферона для получения более гидрофобных производных.

- Оценка разобщающего действия сложных эфиров 7-гидроксикумарин-содержащих кислот на выделенные митохондрии печени крысы и доказательство протонофорного механизма их активности в экспериментах на модельных липидных мембранах.
- Определение зависимости разобщающей активности сложных эфиров 7-гидроксикумарин-содержащих кислот от длины алкильной цепи.

После обнаружения спонтанной инактивации новых разобщителей в митохондриях дополнительной целью стало определение её механизма, для чего были поставлены дополнительные задачи:

- Доказательство ферментативного гидролиза как причины исчезновения биологической активности, а также поиск ответственного за эту реакцию белка.
- Синтез и исследование негидролизуемых аналогов, а также кумаринов другого строения для изучения взаимосвязи структуры и активности производных умбеллиферона.
- Выяснение механизмов исчезновения активности разобщителей другой химической структуры – флуазинама и фенилтиофенамина.

Объект и предмет исследования

Объектом исследования в настоящей работе являются производные умбеллиферона, замещенные по 3-му, 4-му и 6-му положениям, а также производные фенилтиофенамина. Предметом исследования в настоящей работе являются разобщающие свойства производных умбеллиферона и фенилтиофенамина и механизмы их спонтанной инактивации.

Научная новизна исследования

Впервые синтезирована серия сложных эфиров умбеллиферона, обладающих разобщающей активностью, а также показана зависимость их протонофорных свойств от химической структуры. Кроме того, выяснен гидролитический механизм ферментативной инактивации, катализируемой белками митохондрий печени, но не сердца крыс, который лежит в основе тканеспецифиности их действия.

Обнаружена тканеспецифичность разобщающего действия фенилтиофенаминов разнообразного строения и показан механизм его исчезновения путём ферментативного глутатионилирования, катализируемого глутатион-S-трансферазой (GST) в митохондриях печени, но не сердца крыс.

Научная и практическая значимость исследования

С научной точки зрения данная работа значительно обогащает химическое разнообразие известных разобщителей окислительного фосфорилирования, определяя кумариновый каркас как новую структурную основу для создания эффективных разобщителей. Кроме того, исследование дало важные механистические знания, выявив два различных пути метаболизма разобщителей окислительного фосфорилирования путём ферментативной инактивации. Этот методологический прогресс предоставляет научному сообществу ценный инструмент, позволяющий определять метаболическую стабильность имеющихся и будущих кандидатов на роль разобщителей.

С точки зрения практической значимости, данное исследование показывает и обосновывает путь решения важной проблемы применения разобщителей: преодоления их узкого терапевтического окна и системной токсичности. Структурно-функциональные свойства производных 7-гидроксикумарины, выявленные в данном исследовании, открывают многообещающие возможности для рационального дизайна лекарственных препаратов: модульность кумаринового каркаса позволяет проводить химические модификации, направленные на создание более мягких, тканеспецифичных аналогов или пролекарств. Установленные пути метаболической инактивации помогут при разработке соединений, активных только в целевых тканях или обладающих предсказуемой и короткой продолжительностью действия, тем самым минимизируя нецелевые эффекты. Важно отметить, что концепция использования метаболически настраиваемого соединения, может быть расширена для совершенствования других, более известных типов разобщителей, потенциально возрождая целые классы соединений для безопасного и эффективного их терапевтического применения при метаболических расстройствах.

Методология диссертационного исследования

При проведении экспериментов использовали современные методы органической химии, биофизики и биохимии. Методами органического синтеза получено 28 соединений (из которых 23 описаны впервые). Для изучения протонофорной активности проведены исследования на модельных системах (по измерению электрического тока на искусственной плоской липидной мембране и выравниванию градиента pH на липосомах) и изолированных митохондриях печени, сердца и почек крыс *Rattus norvegicus* (линии Wistar) – по измерению мембранныго потенциала,

скорости дыхания и набухания митохондрий. Изучение механизмов инактивации разобщителей проводилось при помощи методов капиллярного электрофореза, ТСХ и LC-MS. Сорбентом для аффинной хроматографии была модифицированная сефароза, а для гель-фильтрации – Sephadex-G-100. Белковый состав фракций анализировали методами SDS-электрофореза в полиакриламидном геле и масс-спектрометрии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Сложноэфирные производные умбеллиферона, замещенные по 3-му и 4-му, но не 6-му положениям, проявляют разобщающие свойства. Самыми активным в серии являются октиловый и дециловый эфиры 7-гидроксиумарин-3-карбоновой кислоты.

2. Активность полученных соединений исчезает вследствие тканеспецифичного ферментативного гидролиза, катализируемого карбоксилэстеразой 1 в матриксе митохондрий печени, но не сердца или почек крыс. На основе сложных эфиров умбеллиферон-4-глиоксалевой кислоты синтезированы новые ингибиторы карбоксилэстераз из ряда α -кетоэфиров.

3. Разобщающая активность флуазинама и фенилтиофенаминов также тканеспецифична, однако, характеризуется другим, зависимым от глутатион-S-трансфераз механизмом исчезновения.

Степень достоверности результатов

Достоверность экспериментальных результатов диссертационной работы подтверждается воспроизводимостью с применением комплекса биофизических и химических методов анализа на современном научном оборудовании с использованием реактивов, произведенных ведущими российскими и мировыми компаниями. Положения и выводы, сформулированные в диссертации, подтверждаются публикациями результатов исследования в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus.

Апробация работы

Работа была доложена на заседании кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова. Результаты исследований были представлены на 4 различных международных и всероссийских конференциях в виде устных и стендовых докладов. Также получен 1 патент на изобретение¹.

¹ Номер патента: RU 2819611 C1. EDN: RVWCDF.

Публикации

Основные результаты диссертационной работы представлены в 5 публикациях в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных к защите в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук.

Личный вклад автора

Личный вклад автора в представленное исследование заключается в сборе и анализе литературных данных, разработке поставленных задач, планировании и проведении экспериментальных процедур, анализе и оформлении полученных результатов, подготовке научных статей и представлении результатов на научных конференциях.

Автор лично синтезировал и очистил большинство исследованных соединений. Биофизические эксперименты в рамках диссертационного исследования (работы [1-5]) проведены лично автором или при его непосредственном участии. Все биохимические эксперименты, включая аффинную хроматографию и гель-фильтрацию, проведены лично автором (в том числе постановка экспериментов по химическому определению механизма инактивации в работах [1-5]). Теоретические исследования методом молекулярного докинга выполнены лично автором. Измерения мембранныго потенциала и скорости дыхания выделенных митохондрий проведены д.б.н. Хайловой Л.С.; электрофоретическое исследование – к.б.н. Ковалевой И.Е.; масс-спектрометрия белковой фракции – к.х.н. Ковальчуком С.И.; LC-MS данные синтезированных соединений получены к.х.н. Ташлицким В.Н.; спектры ЯМР – д.х.н. Годовиковым И.А.

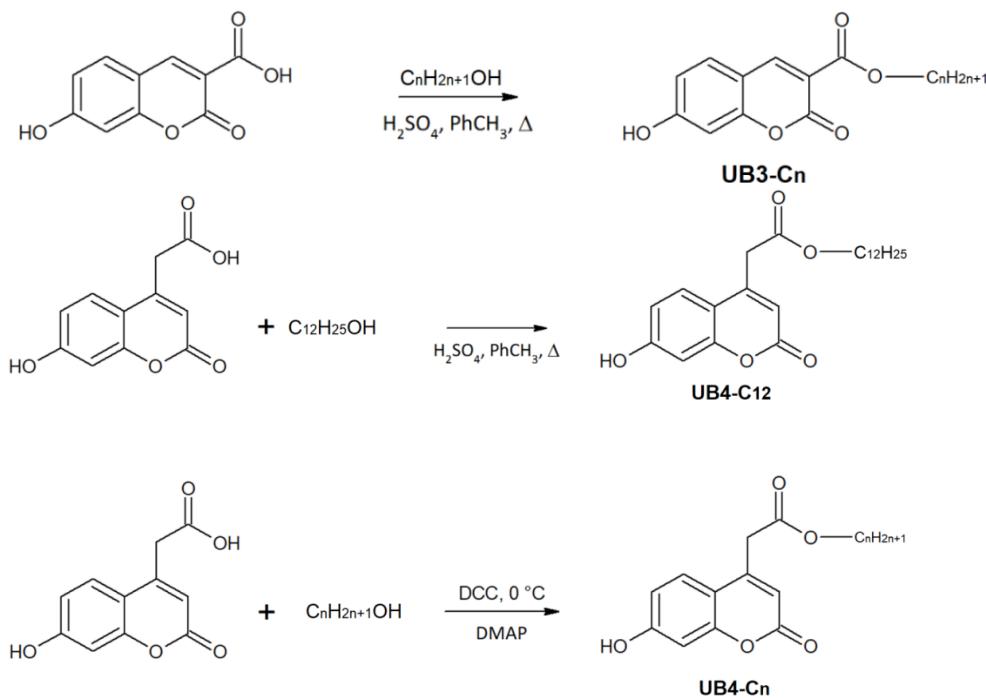
Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 175 страницах и состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Список литературы» и «Приложение». Работа содержит 4 таблицы и 71 рисунок. Библиография включает 156 источников литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Биофизическое исследование сложных эфиров 7-гидроксикумарин-3-карбоновой и 7-гидроксикумарин-4-уксусной кислот

Умбеллиферон имеет гидроксильную группу в 7-ом положении с pK_a , близким к физиологическим значениям, однако его разобщающая активность очень слаба в силу низкой гидрофобности. Следуя результатам работ нашей лаборатории по разобщающей активности производных флуоресцина, для повышения липофильности умбеллиферона было решено присоединить алкильный хвост через сложноэфирную связь к 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоте (UB-3-COOH) и 7-гидроксикумарин-4-уксусной кислоте (UB-4-COOH) методом прямой этерификации с пара-толуолсульфоновой кислотой (UB3-производные и UB4-C12) или с применением дициклогексилкарбодиимида (остальные UB4-производные).



Начиная с самых первых опытов по измерению мембранных потенциалов в присутствии исследуемых соединений на митохондриях печени крысы (RLM) было обнаружено исчезновение разобщающей активности сложноэфирных производных умбеллиферона в минутной шкале (рисунок 1) [1-2] – подобный эффект характерен для флуазинама и анилинотиофенов. В серии эфиров 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты самым сильным разобщителем являются октиловый и дециловый эфиры (UB3-C8 и UB3-C10), а в серии эфиров 7-гидроксикумарин-4-уксусной кислоты – октиловый эфир UB4-C8. Интересен эффект додециловых эфиров: их разобщающая активность развивается постепенно и гораздо медленнее исчезает, по сравнению со всеми другими соединениями.

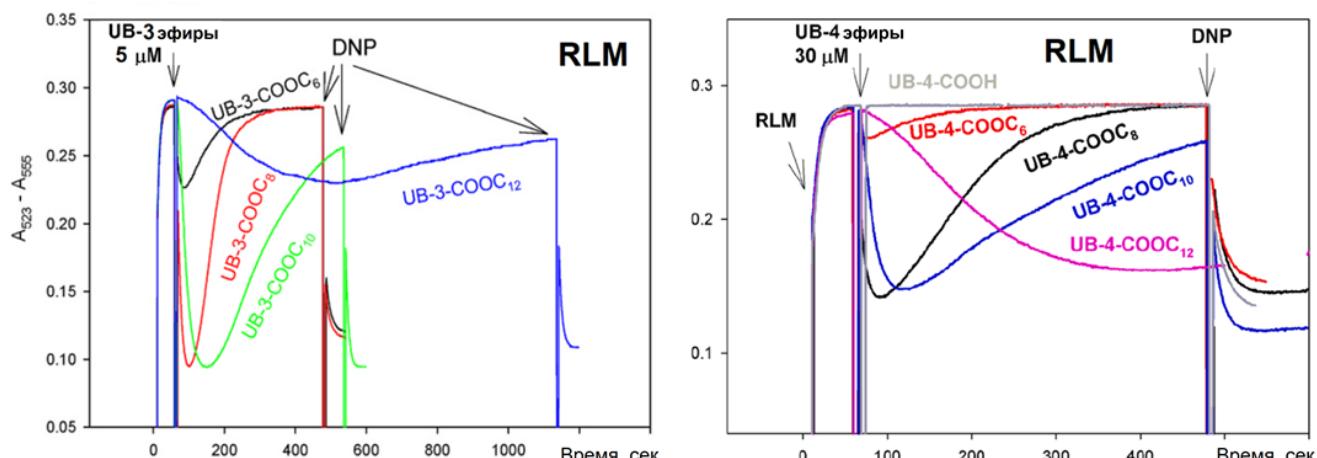


Рисунок 1. Действие сложных эфиров умбеллиферон-3-карбоновой кислоты (UB3-Cp, 5 мкМ) и умбеллиферон-4-уксусной кислоты (UB4-Cp, 30 мкМ) на мембранный потенциал изолированных митохондрий печени крысы (RLM), измеренный с помощью потенциал-чувствительного красителя сафранина O. По оси ординат – разность величин оптического поглощения ($A_{523} - A_{555}$), которая пропорциональна величине мембранного потенциала. Стрелками показаны моменты добавки.

Наблюдаемый сброс мембранныго потенциала при добавлении испытуемых веществ может происходить по двум причинам: протонофорной активности соединений или ингибирования дыхания. В первом случае (при истинном разобщении) происходит ускорение дыхания, так как снимается торможение процесса переноса электрона по дыхательной цепи мембранным потенциалом. Отметим, что у всех известных разобщителей обнаруживается колоколообразная (как узкая, так и достаточно широкая) зависимость скорости дыхания митохондрий от концентрации, т.е. вслед за стимуляцией дыхания при низких концентрациях наблюдается его ингибирование при больших концентрациях разобщителей. Опыты по измерению дыхания на RLM показали его ускорение под действием UB4-C12 – наиболее медленно гидролизуемого сложного эфира.

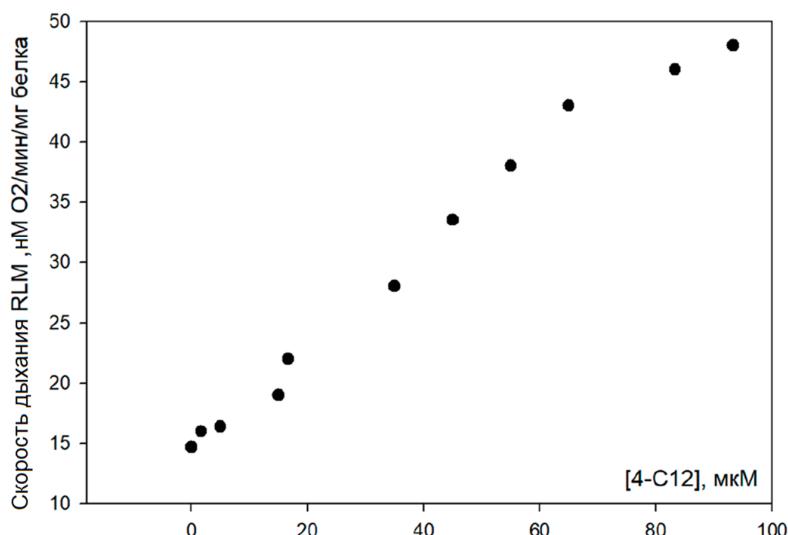


Рисунок 2. Стимулирование дыхания додециловым эфиром умбеллиферон-3-карбоновой кислоты UB4-C12. Зависимость скорости поглощения кислорода (в мкМ О₂/мин/мг белка) от концентрации разобщителя.

В экспериментах по инкубации митохондрий со сложными эфирами умбеллиферона методами тонкослойной хроматографии (ТСХ) и ВЭЖХ-масс-спектрометрии (LC-MS) было

установлено, что происходит ферментативный гидролиз обеих серий соединений до исходной карбоновой кислоты и спирта. Как и ожидалось, эксперименты на митохондриях показали, что все умбеллиферон-карбоновые кислоты не обладают разобщающей активностью.

Прямые измерения протонофорной активности соединений, в частности их вольтамперных характеристик, были выполнены на искусственной плоской бислойной липидной мембране (БЛМ). Величина сдвига потенциала нулевого тока для UB4-C10 при pH₁=8,11 и pH₂=9,36 составила 50 мВ (рисунок 3, А), что ниже теоретического значения (71 мВ), рассчитанного по уравнению Нернста, и свидетельствует о неидеальной протонной селективности такого ионофора. Для подтверждения анионной природы разобщителя был изучен эффект флоретина (вещества, снижающего положительный дипольный потенциал мембранны, тем самым затрудняя транспорт анионов) – ток через плоскую липидную мембрану при его добавлении уменьшался, как и ожидалось для лиофильных анионов (рисунок 3, В).

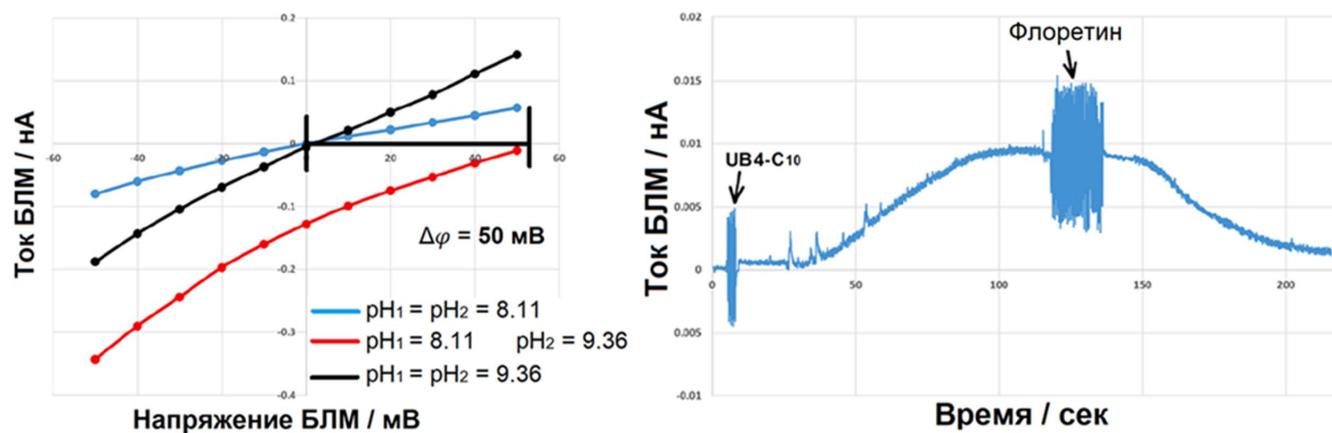


Рисунок 3. А. Вольтамперная характеристика 15 мкМ UB4-C10 в отсутствие (чёрная и синяя линии) и при наличии градиента pH (красная линия) в двух отсеках измерительной ячейки. В. Электрический ток через искусственную плоскую липидную мембрану из дифитаноилфосфатидилхолина, индуцированный 50 мкМ UB4-C10, и эффект добавления 50 мкМ флоретина.

Предположительное участие ALDH2 в тканеспецифичном гидролизе производных 7-гидроксикумарина

После проведённого литературного и ингибиторного анализов мы предположили, что эстераза, гидролизующая производные умбеллиферона – это митохондриальная альдегидгидрогеназа ALDH2 [1-2]. В частности, мы наблюдали замедление исчезновения разобщающей активности при прединкубации митохондрий с дисульфирамом (DSF) – классическим ингибитором ALDH2, а также поставили опыты на изолированных митохондриях сердца (RHM) и почек (RKM) крысы, где содержание этого фермента значительно меньше (рисунок 4 А-Д). Действительно оказалось, что на RHM и RKM сложные эфиры умбеллиферона не гидролизуются (по результатам измерения мембранныго потенциала, а также LC-MS и ТСХ

анализов) – следовательно, можно говорить о тканеспецифичности их активности. Кроме того, на RHM наблюдалось ускорение дыхания под действием всех синтезированных эфиров 7-гидроксикумарин-3-карбоновой и 4-уксусной кислот (рисунок 4 E, F).

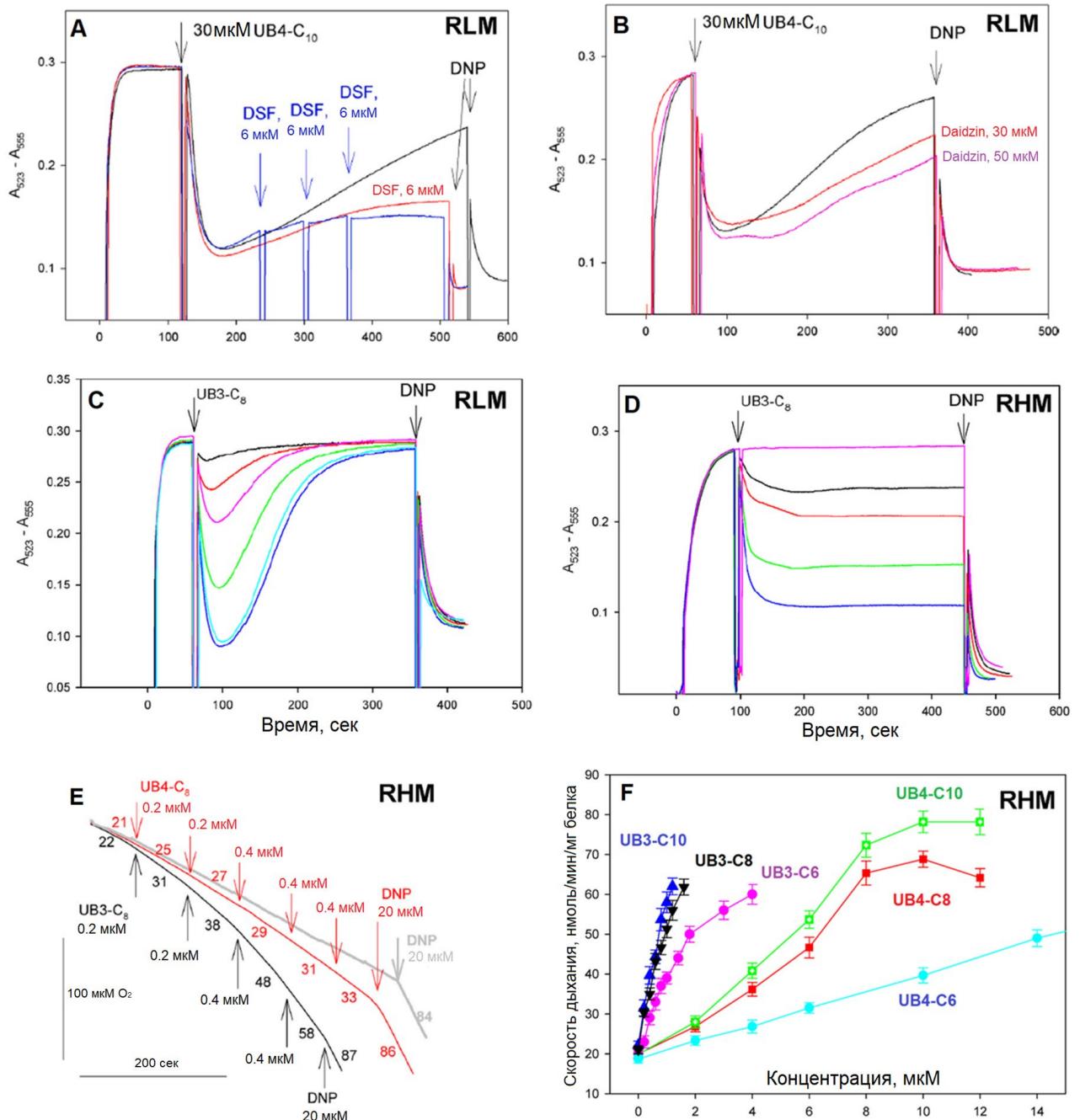


Рисунок 4. А. Эффект добавления ингибиторов ALDH2 дисульфирама (А; DSF) и дайдзина (Б) на сброс мембранныго потенциала RLM сложным эфиром умбеллиферона UB4-C₁₀. С и Д. Сравнение действия октилового эфира умбеллиферон-3-карбоновой кислоты на мембранный потенциал изолированных митохондрий печени (С; RLM; 1 μM, 2 μM, 3 μM, 3.5 μM, 4 μM, 5 μM) и сердца (Д; RHM; 0 μM, 2 μM, 3 μM, 4 μM, 5 μM) крысы. Е-Ф. Ускорение дыхания митохондрий сердца (RHM) октиловыми эфирами умбеллиферон-карбоновых кислот (Е) и всей серией синтезированных кумаринов (Ф).

Опровержение гипотезы участия ALDH2

Для проверки участия ALDH2 в гидролизе сложных эфиров умбеллиферона мы выделили этот белок из матрикса RLM (супернатанта при получении субмитохондриальных частиц, СМЧ) методом аффинной хроматографии. Для этого был синтезирован сорбент на основе Sepharose-4B, содержащий ковалентно пришитую через диглицидиловый эфир бутандиола 4-гидрокси-α-цианокоричную кислоту. Однако, при инкубации выделенного белка с UB3-C10 образования кислоты не происходило (по ТСХ), тогда как гидролиз p-нитрофенилацетата (pNPA) наблюдался и ингибировался добавлением DSF.

Подтверждением неверности гипотезы об участии ALDH2 дополнительно могут служить результаты докинга. Расчёты были проведены на кристаллической структуре человеческой ALDH2 (PDB 3INJ) с дециловым эфиром умбеллиферон-3-карбоновой кислоты UB3-C10 (рисунок 5). Как описывалось выше, каталитическая триада Cys302, Glu268 и Asn169 находится глубоко внутри белка (стандартные субстраты – ацетальдегид и формальдегид – очень маленькие соединения) и содержит связанную с Thr244 и Glu476 молекулу воды. По результатам докинга, взаимодействие UB3-C10 характеризуется $dG \approx -9$ ккал/моль с водородной связью между гидроксильным кислородом умбеллиферона и азотом Cys302. Однако, такое расположение не позволяет ALDH2 выполнять эстеразную функцию из-за значительного удаления потенциально гидролизуемой сложноэфирной связи от активного центра и связанной молекулы воды.

Следовательно, по результатам аффинной хроматографии и докинга можно сделать вывод о невозможности для ALDH2 гидролизовать сложные эфиры умбеллиферона по 3-му и 4-му положениям.

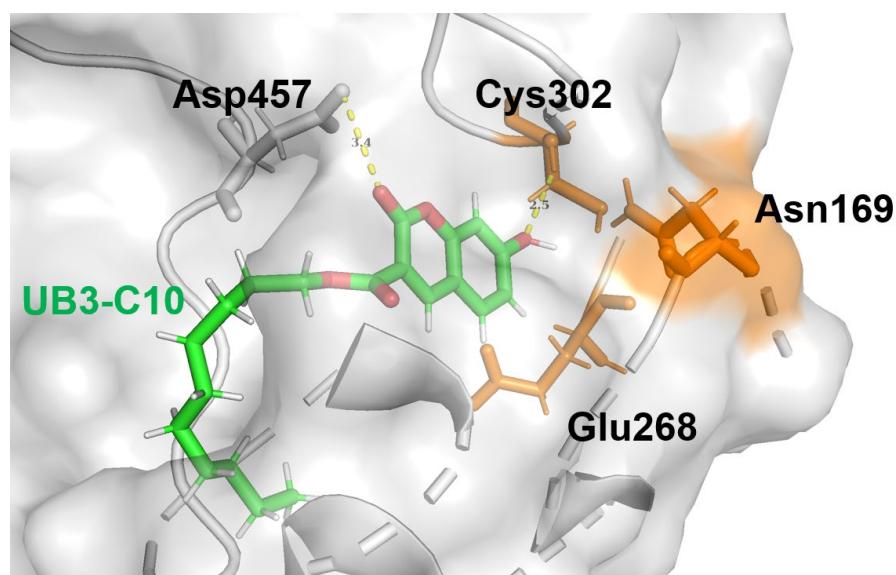


Рисунок 5. Результат молекулярного докинга децилового эфира умбеллиферон-3-карбоновой кислоты в человеческую альдегиддегидрогеназу ALDH2 (PDB 3inj). Из структуры удалены аминокислотные остатки, не формирующие субстрат-связывающий карман и находящиеся в отдалении от лиганда.

Карбоксилэстераза 1 инактивирует сложные эфиры умбеллиферона

В поисках кандидата на роль фермента, гидролизующего сложные эфиры умбеллиферона, мы обратили внимание на семейство карбоксилэстераз (CES), так как из литературы известно, что DSF может ингибировать не только ALDH2, но и CES. Поскольку тканевое распределение CES1 соответствует полученным нами результатам, этот фермент может вызывать спонтанную инактивацию сложных эфиров умбеллиферона.

Сначала был проведен компьютерный анализ теоретической возможности гидролиза – в качестве модели белка была использована структура человеческой CES1 (PDB 1ya4). Карбоксилэстеразы – это сериновые гидролазы с каталитической триадой Ser221, Glu345 и His468. В отличие от ALDH2, в этом случае не имеется стерических затруднений для гидролиза UB3-C8: расстояние от карбонильного углерода до серина невелико – около 3 Å, а dG составляет около -10 ккал/моль, в том числе за счёт водородной связи 7-гидроксильной группы с кислородом Ala93.

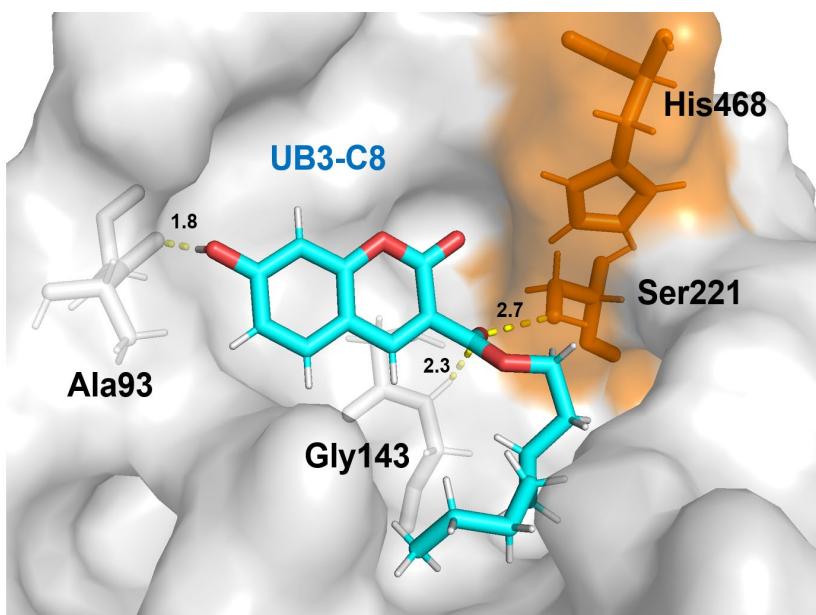


Рисунок 6. Результат молекулярного докинга октилового эфира умбеллиферон-3-карбоновой кислоты в человеческую карбоксилэстеразу CES1 (PDB 1ya4). Из структуры удалены аминокислотные остатки, перекрывающие обзор.

Эксперименты по сбросу мембранныго потенциала на RLM также показали замедление исчезновения разобщающей активности UB3-C8 при прединкубации с известными ингибиторами CES1 – PMSF, TTFA и Loperamide (рисунок 7).

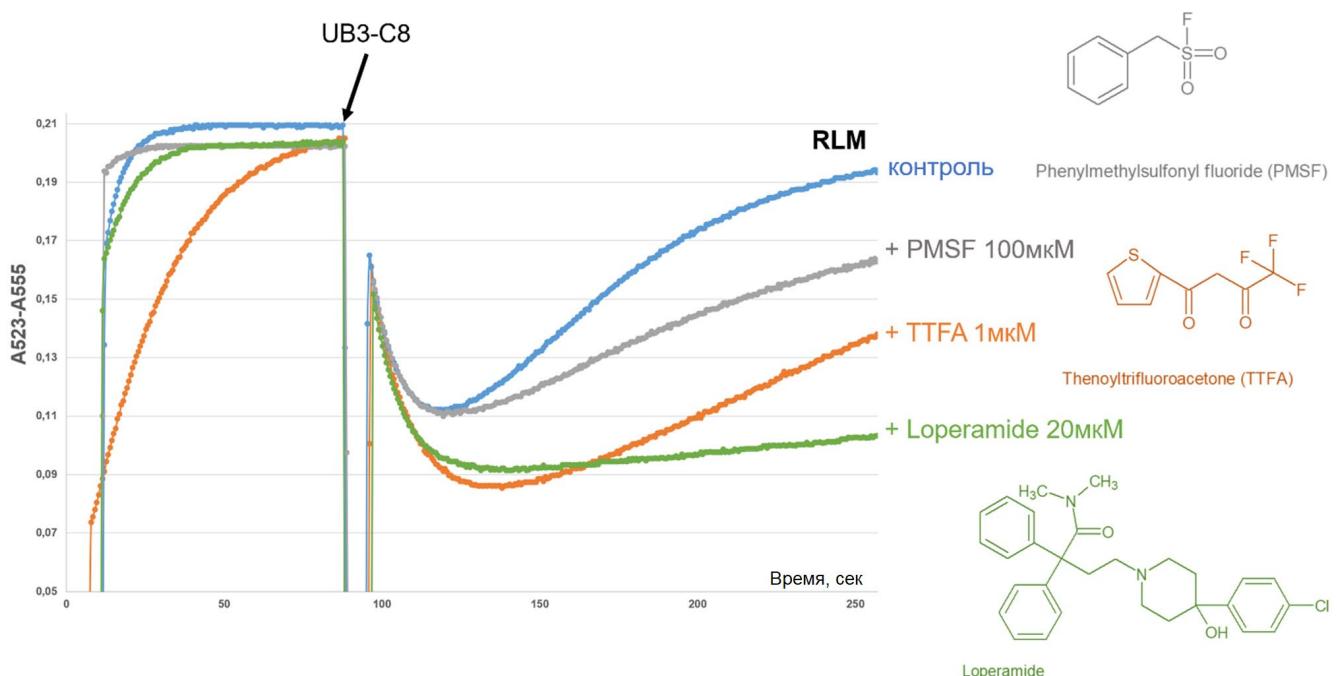


Рисунок 7. Добавление PMSF, TTFA и Loperamide – ингибиторов CES1 – замедляет эффект ресопряжения октилового эфира умбеллиферон-3-карбоновой кислоты на RLM, что косвенно доказывает участие этого белка в гидролизе UB3-C8.

Для дополнительного подтверждения наличия карбоксилэстераз, был сделан протеомный анализ матриков митохондрий печени (RLM) и сердца (RHM) крысы. Оказалось, что в печеночной фракции представлено большинство изоформ ces1 (ces1b, ces1c, ces1d, ces1e, ces1f), а в сердечной – только ces1d (причем гидролитической активности всё равно не наблюдается). Отсюда можно сделать вывод, что изоформы ces (но не ces1d) могут быть ответственны за гидролиз синтезированных сложных эфиров умбеллиферона.

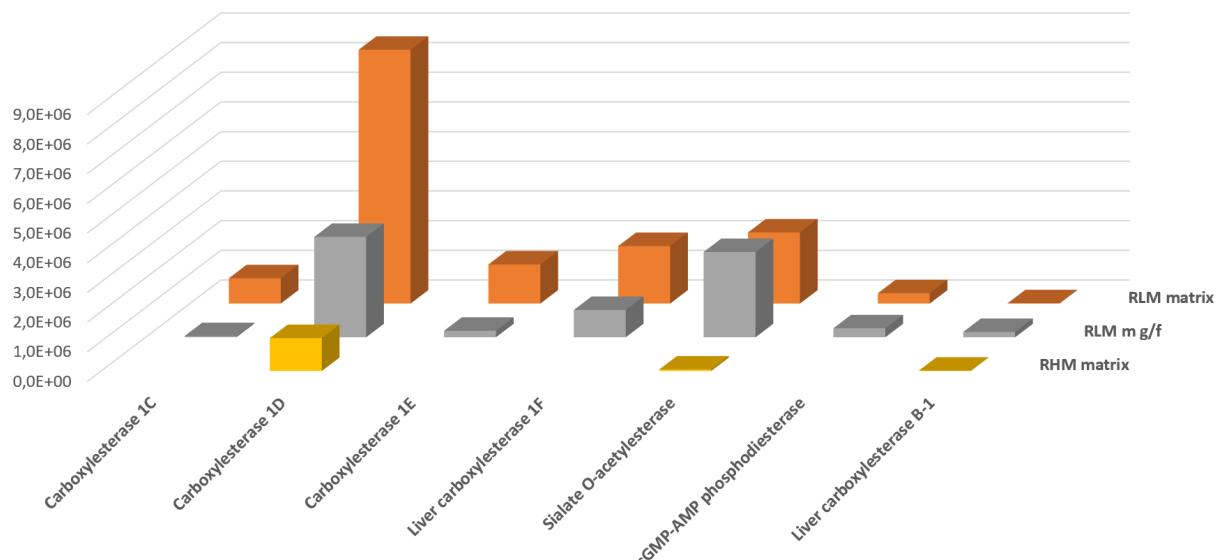


Рисунок 8. Гистограмма результатов протеомного анализа матриков митохондрий печени (RLMt, оранжевый ряд) и сердца (RHMr, желтый ряд). По оси X гистограммы расположены белки-эстеразы, которые программа обнаружила в образцах. RLMt g/f – 14 фракция после гель-фильтрации с максимумом гидролитической активности.

Поэтому было решено провести выделение белка CES по методике гель-фильтрации на Sephadex G-100. Для исследования активности каждая фракция инкубировалась с UB3-C10 в течение ночи. Там, где присутствовали белки, которые могут гидролизовать дециловый эфир в исходную кислоту UB3-Acid, флуоресценция раствора существенно увеличивалась. На рисунке 9А представлен полученный пик гидролитической активности на профиле элюции (сигнал пропорционален скорости гидролиза) – наиболее быстро сложный эфир инактивировался во фракции №14. Далее провели масс-спектрометрический анализ нескольких фракций, охватывающий пик активности (№№8, 11, 13, 14, 15, 17, 20), который показал очень разное распределение эстераз по фракциям. Так, количество ces1b и ces1d резко уменьшалось, причем ces1d была представлена и в сердце; а из остальных – распределение ces1f соответствует пику активности (рисунок 9В).

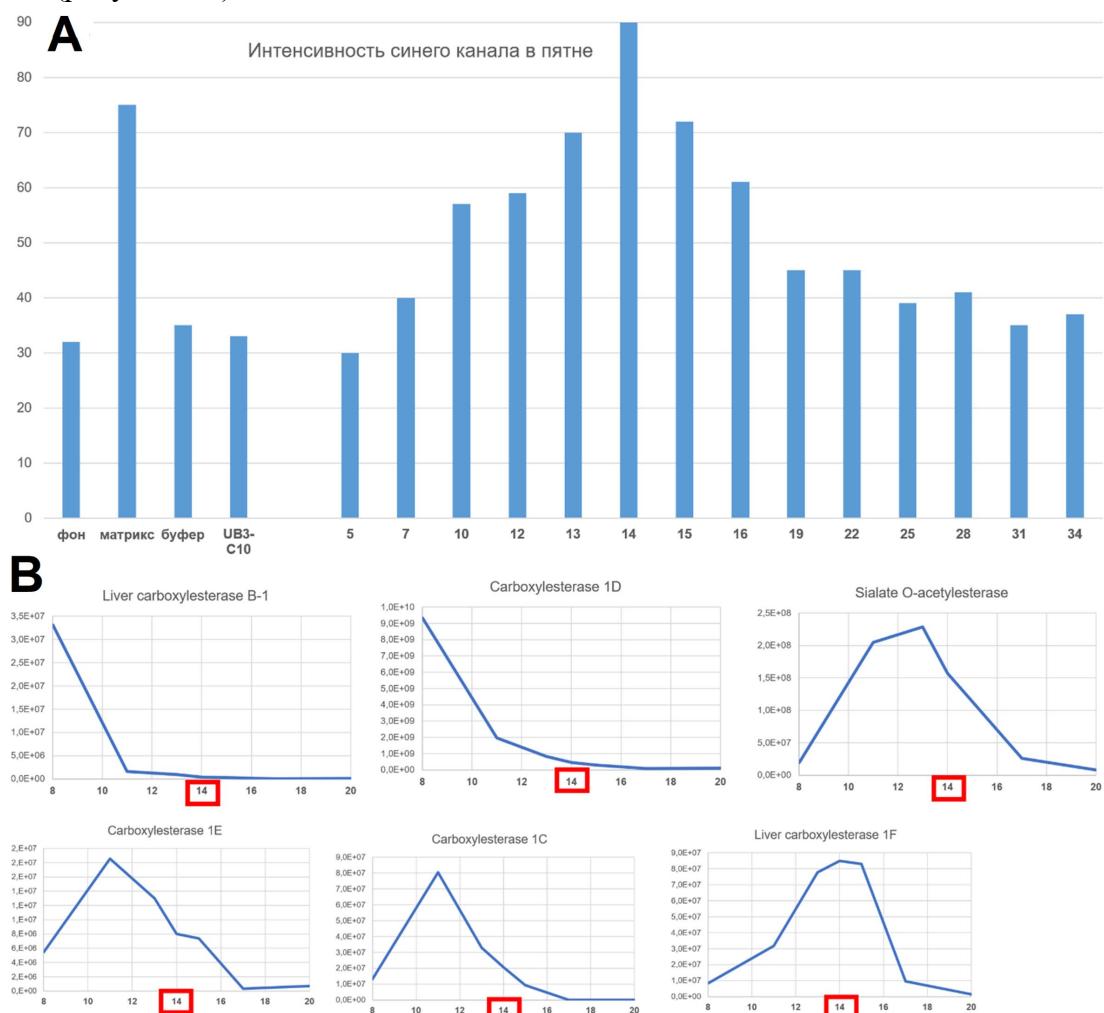


Рисунок 9. А. Пик активности на профиле элюции после гель-фильтрации на Sephadex G-100 матрикса митохондрий печени крысы (RLM_М g/f). На оси ординат – интенсивность синего канала в каждой фракции, которая пропорциональна скорости гидролиза сложного эфира до кислоты. В левой части – отрицательные (фоновая интенсивность-background, без добавления митохондрий-buffer, и только UB3-C10) и положительный (matrix – результат инкубации исходного матрикса RLM с UB3-C10, с приблизительно равной концентрацией суммарного белка) контроли. *В.* Протеомный анализ фракций (№№8, 11, 13, 14, 15, 17, 20), охватывающих пик активности на рисунке.

Для дополнительного подтверждения участия CES была куплена карбоксилэстераза из печени свиньи (e2884; CAS 9016-18-6, Sigma) и методом ТСХ показано, что она действительно гидролизует синтезированные сложные эфиры умбеллиферона.

В таблице 1 представлены результаты качественного ингибиторного анализа на чистом белке e2884 и выделенных митохондриях печени крысы методом ТСХ. Было показано, что все ингибиторы, которые были эффективны в экспериментах по сбросу мембранныго потенциала на изолированных митохондриях (PMSF, TTFA, DSF, дайдзин, 2-HQ), проявляли активность в обоих случаях. Кроме того, на RLM замедляли гидролиз некоторые метаболиты (малат, оксалоацетат, альфа-кетоглутарат, оксалат, но не сукцинат и глутамат), в то время как на чистом белке заметен эффект только альфа-кетоглутарата.

Дополнительно было показано, что ни разрушение митохондриальной мембраны тритоном X-100, ни разобщение с помощью СССР, ни добавление NAD⁺, CATR (карбоксиатрактилозид, ингибитор АТФ/АДФ антипортера), CDNB (субстрат глутатионилирования) или ацетазоламида (ингибитора карбоангидразы) не снижали гидролиз децилового эфира умбеллиферон-3-карбоновой кислоты митохондриями печени крысы. Отдельно можно отметить, что в этих экспериментах использовались как замороженные в течение нескольких месяцев митохондрии (которые могли «дышать», но из-за нарушения целостности мембраны уже не поддерживали разность потенциала), так и свежевыделенные – качественно результаты не отличались.

Соединение	На RLM	На белке e2884	Соединение	На RLM
PMSF	+	+	UB3-N-C10	+
TTFA	+	+	UB4-N-C10	+
UB4-COC10	+	+	Ме-UB3-C10	+
UB4-COC8	+	+	UB3-Acid	+
α-кетоглутарат	+	+	UB4-Acid	+
малат	+	-	UB6-Acid	+
оксалоацетат	+	-	4-Me-UB	+
сукцинат	-	-		
глутамат	-	-		
оксалат	+	+		
лоперамид	+	-	ацетазоламид	-
2-гидроксихинолин	+	+	Triton X-100	-
дисульфирам	+	+	CATR	-
дайдзин	+	+	СССР	-
CDNB	-	-	NAD ⁺	-

Таблица 1. Качественный ингибиторный анализ гидролиза UB3-C10 на выделенных митохондриях печени крысы и коммерческой карбоксилэстеразе печени свиньи (CAS 9016-18-6, Sigma) методом ТСХ. Выявленные ингибиторы на RLM проявляли активность и по отношению к исчезнению сброса мембранныго потенциала и, в большинстве случаев, на CES печени свиньи. Отдельно следует отметить несколько вновь синтезированных ингибиторов на основе умбеллиферона. Все они не обладают разобщающей способностью, однако замедляют гидролиз других сложных эфиров умбеллиферона (особенно UB4-COC8 и UB4-COC10 – в наномолярных концентрациях). Более подробно их синтез и свойства будут описаны далее.

Модификация структуры сложных эфиров 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты

Была проведена работа по модификации структуры эфиров умбеллиферона для изменения их тканевой специфичности или активности. Так, был синтезирован аналог октилового эфира умбеллиферон-3-карбоновой кислоты с нитрогруппой в шестом положении, обозначенный как **NO₂-UB3-C8**.

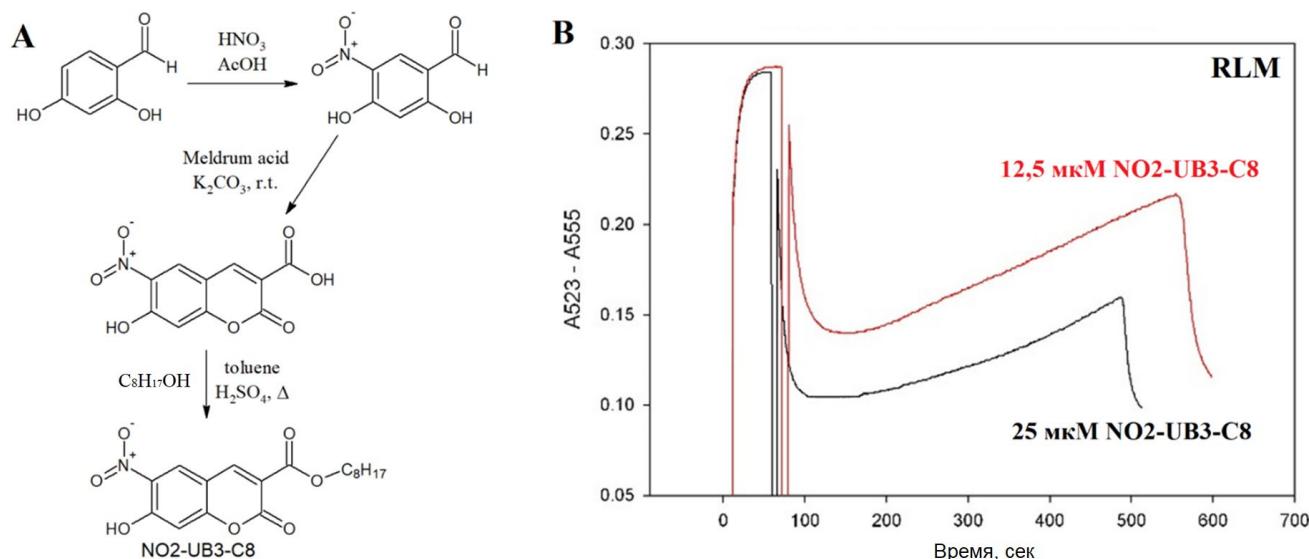


Рисунок 10. Схема синтеза (A) и сброс мембранных потенциалов митохондриями печени (B) 12,5 мкM (красная линия) и 25 мкM (черная линия) нитро-аналога **UB3-C8**.

Негидролизуемый аналог **UB3-C8**, названный **UB3-C-C7**, содержит карбонильную группу вместо эфирной. Его синтез включал сначала модификацию кислоты Мельдрума октановой кислотой, кипячение в метиловом спирте с образованием метилового эфира 3-оксадекановой кислоты и последующую конденсацию с дигидроксибензальдегидом. Далее кетогруппа **UB3-C-C7** была легко модифицирована малононитрилом с получением дицианопроизводного **UB3-CN-C7**. Такие производные сохраняют протононфорную активность, хотя замена карбоксильной на кето-группу сильно её снижает по сравнению с **UB3-C8** [4]. Соединение **UB3-CN-C7**, в свою очередь, оказалось значительно более активным, чем **UB3-C-C7** и **UB3-C8**, с точки зрения сброса мембранных потенциалов.

Кроме того, этерификацией по Стеглиху был синтезирован амидный аналог: N-дециламид 7-гидроксикумарин-4-уксусной кислоты (**UB4-N-C10**). Однако, он не только не гидролизовался (по данным ТСХ), но и не проявлял разобщающей активности: ускорение дыхания и сброс мембранных потенциалов не были обнаружены даже при гораздо большей концентрации.

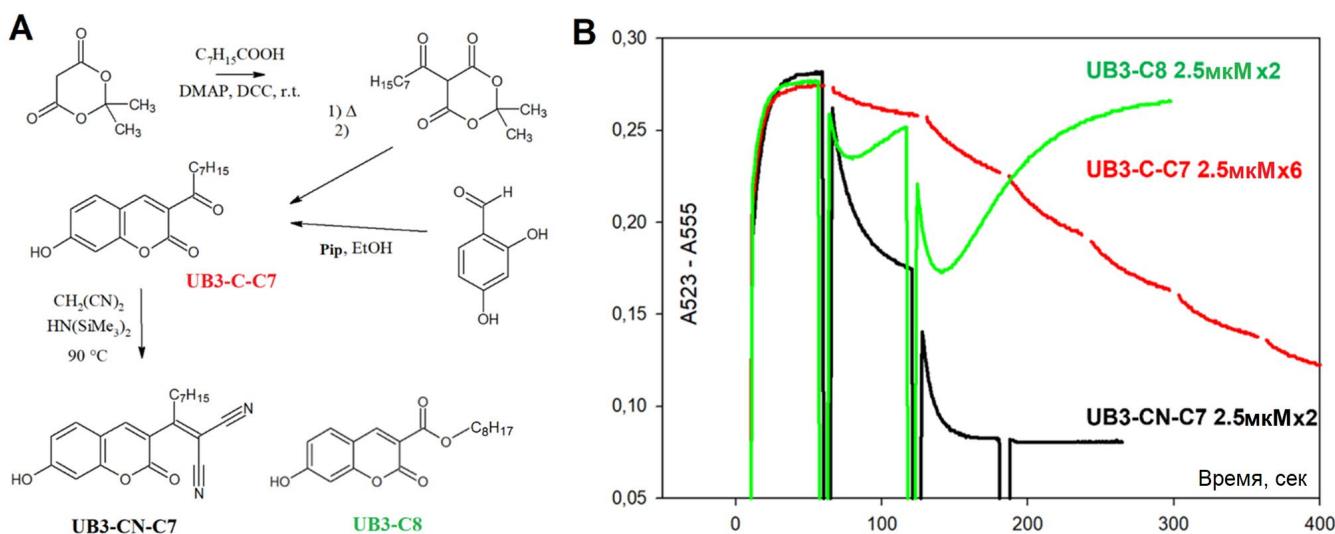


Рисунок 11. (A) Схема синтеза негидролизуемых аналогов октилового эфира 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты: UB3-C-C7 и UB3-CN-C7. (B) По сбросу мембранныго потенциала митохондрий печени (RLM) кето-аналог (красная линия; 6 добавок UB3-C-C7 по 2,5 мкМ в моменты, обозначенные пропуском) заметно слабее UB3-C8 (зелёная линия; 2 добавки по 2,5 мкМ), однако добавление динитрильной группы (чёрная линия) почти на порядок повышает разобщающую активность.

Дополнительные химические модификации кумаринового остова включали «закрытие» гидроксильной группы умбеллиферона. Так, метилированный диметилсульфатом Me-UB3-C10 был лишен разобщающего действия на изолированных митохондриях крыс, что доказывает решающее значение этой диссоциирующей группы для протонофорной активности. Кроме того, было показано замедление исчезновения активности UB3-C8 в присутствии метилированного аналога (рисунок 12) – можно говорить о конкурентном ингибиовании гидролиза.

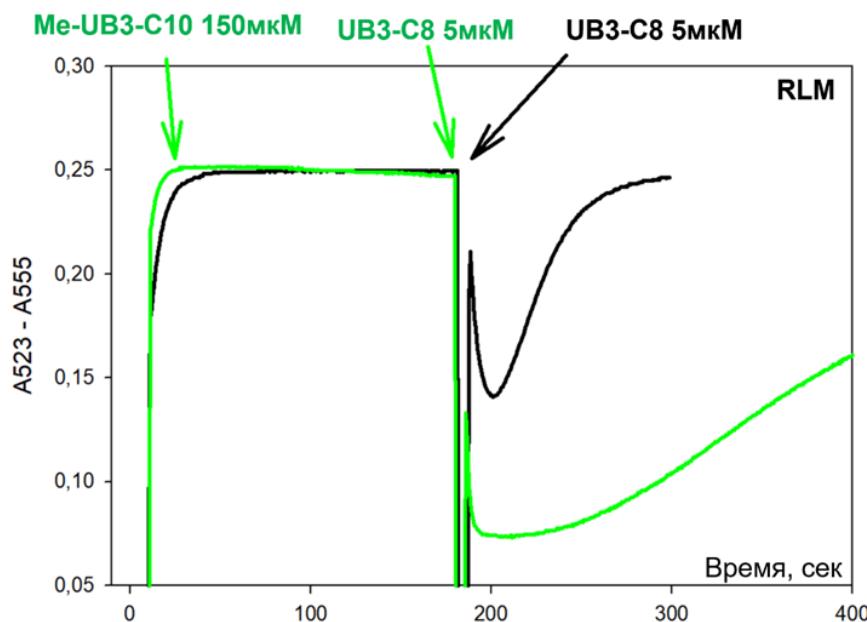
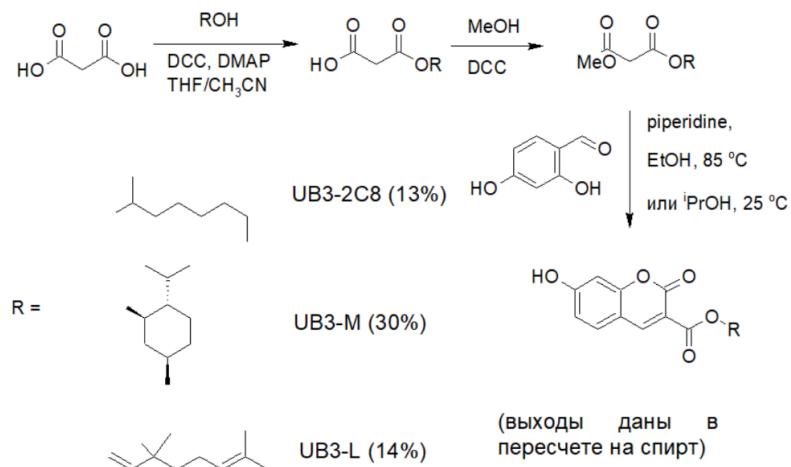


Рисунок 12. Метилированный аналог децилового эфира 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты не проявляет разобщающей активности, однако замедляет гидролиз UB3-C8.

Все описанные ранее сложные эфиры умбеллиферона содержали линейные гидрофобные группы. Для того, чтобы выяснить влияние природы спирта на активность, были синтезированы производные умбеллиферона с вторичными и третичными спиртами: 2-октанолом (UB3-2C8), L-ментолом (UB3-M) и линалоолом (UB3-L). Методика синтеза основана на конденсации Кневенагеля смешанных сложных эфиров малоновой кислоты с 2,4-дигидроксибензальдегидом:



По результатам измерений сброса мембранныного потенциала, скорость гидролиза (а точнее, скорость восстановления мембранныго потенциала) падала при переходе от первичного спирта ко вторичному, стерически затрудненному вторичному и, наконец, третичному (рис. 13).

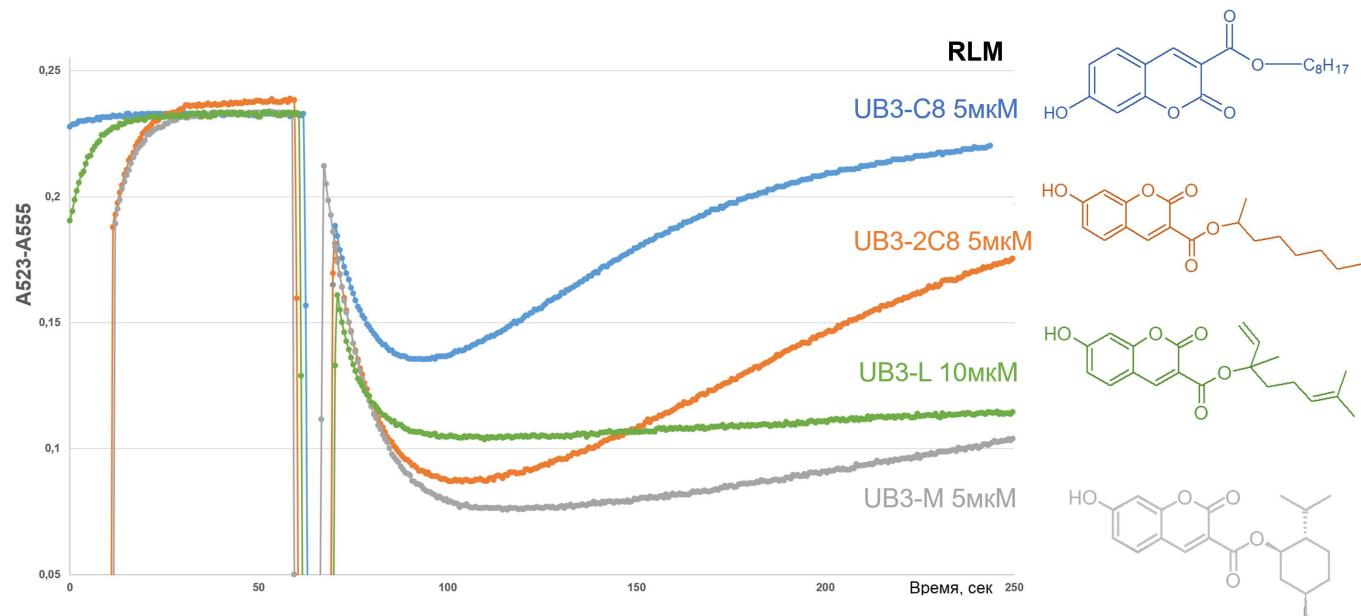
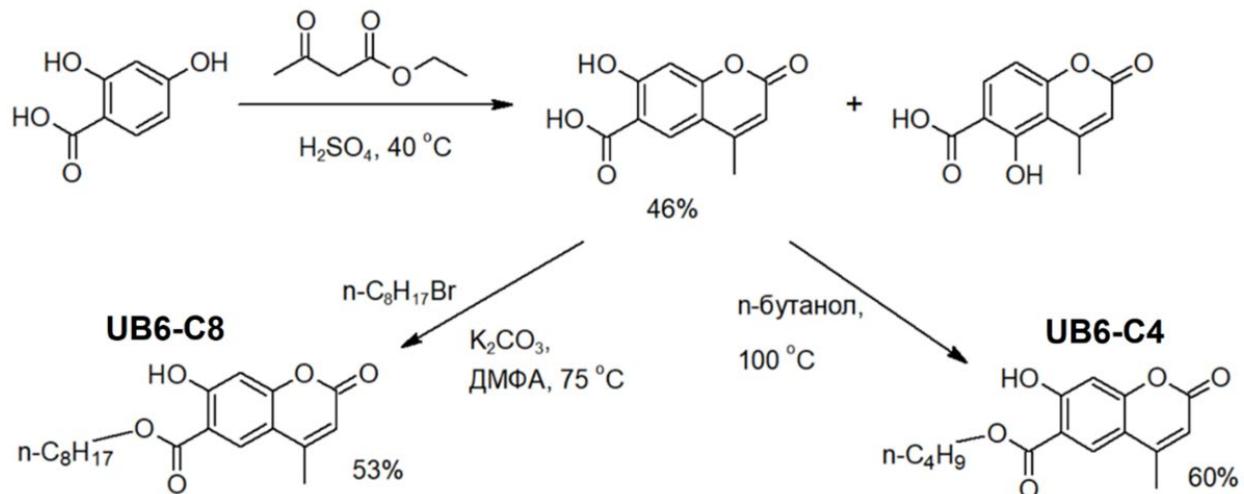


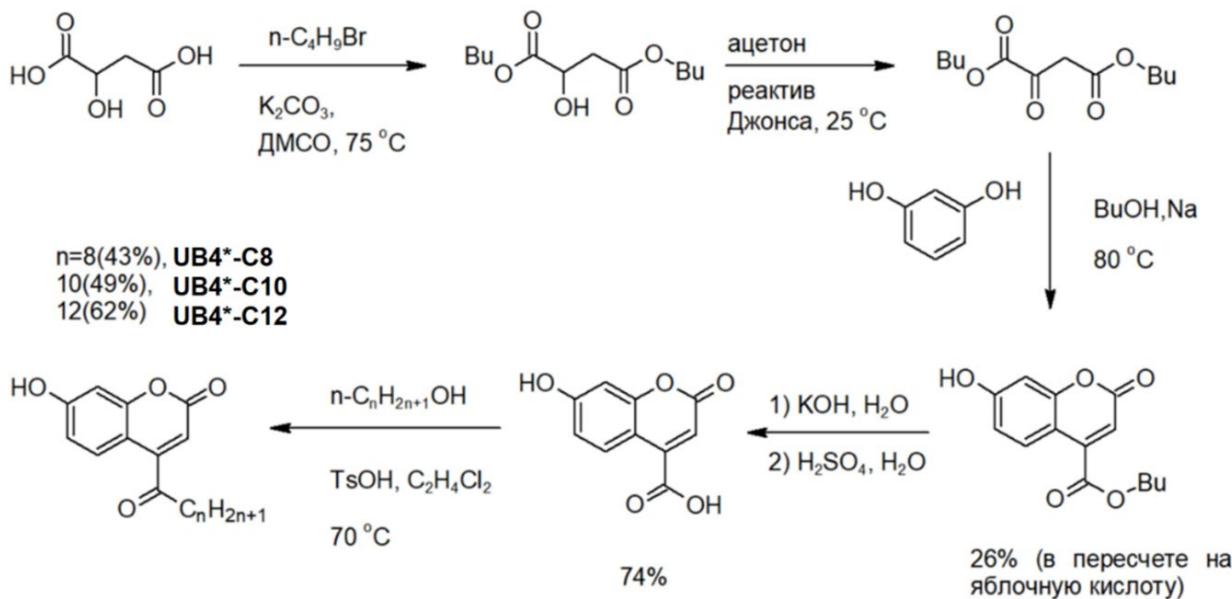
Рисунок 13. Скорость спонтанной инактивации снижалась вследствие стерических затруднений ферментативного гидролиза в ряду сложных эфиров 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты и гидрофобных спиртов: октанол > 2-октанол > L-ментол > линалоол.

Сложные эфиры 7-гидроксикумарин-4- и 6-карбоновых кислот

Для дальнейшего исследования связи структуры производных кумарина со свойствами были синтезированы производные по другим положениям. Для получения сложных эфиров 7-гидроксикумарин-4-карбоновой кислоты (серия UB4*-Cn) исходными соединениями были резорцин, соответствующий спирт и яблочная кислота:



Производные 7-гидрокси-4-метилкумарин-6-карбоновой кислоты (серия UB6-Cn) были получены конденсацией 2,4-дигидроксибензойной кислоты с этиловым эфиром ацетоуксусной кислоты и последующей этерификацией:



Измерения сброса мембранныного потенциала показали, что UB4*-Cn практически на порядок менее активны, чем UB3-Cn серия, а UB6-C8 и UB6-C4 вообще не проявляют разобщающей активности (рисунок 14).

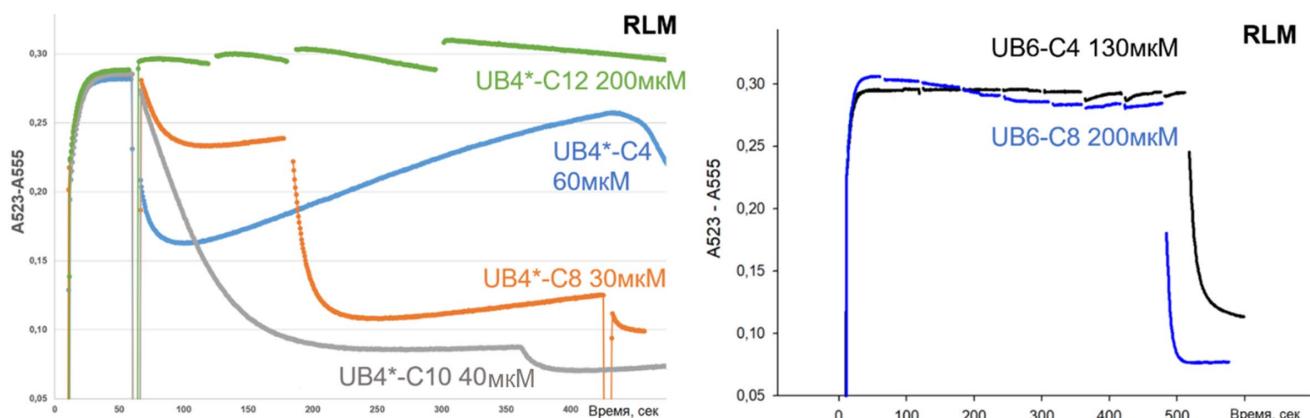
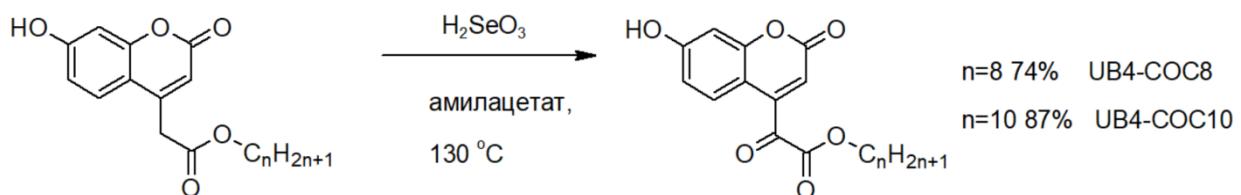


Рисунок 14. Эффект добавления сложных эфиров 7-гидроксикумарин-4-карбоновой кислоты ($UB4^*-C4$ – $UB4^*-C12$) и 7-гидрокси-4-метилкумарин-6-карбоновой кислоты (бутиловый $UB6-C4$ и октиловый $UB6-C8$) на мембранный потенциал RLM . Подписанные концентрации – в финальный момент наблюдения; добавки делались равными порциями.

Производные умбеллиферон-4-глиоксалевой кислоты

В литературе представлены данные об ингибиторной активности некоторых 1,2-дионов и β -лапахона, в частности, по отношению к CES. Введение альфа-кетогруппы в сложные эфиры умбеллиферон-4-уксусной кислоты по реакции Райли (соединения $UB4-COC8$ и $UB4-COC10$) интересным образом изменило их биологическую активность: было обнаружено, что такие соединения эффективно замедляют гидролиз других сложных эфиров умбеллиферона в наномолярном диапазоне: например, на рисунке 15 видно значительное замедление исчезновения активности $UB4-C8$ при прединкубации RLM с 250 нМ $UB4-COC8$ или $UB4-COC10$. Аналогичные результаты были получены ТСХ анализом на коммерческой карбоксилэстеразе печени свиньи e2884 и RLM , о чём писалось выше. Таким образом, найдены новые ингибиторы карбоксилэстераз.



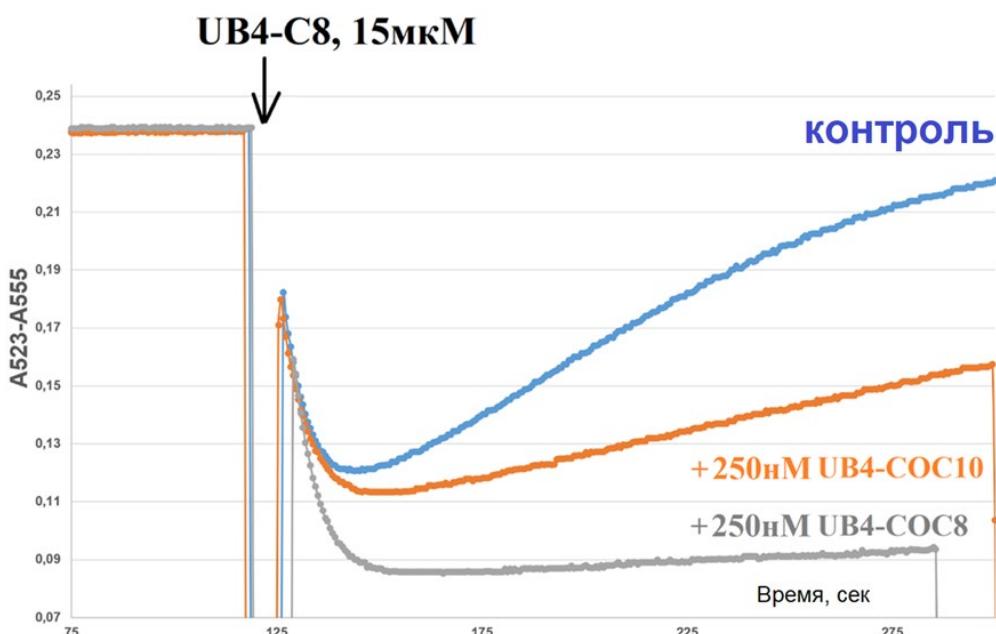


Рисунок 15. Сложные эфиры умбеллиферон-4-глиоксалевой кислоты замедляют исчезновение разобщающей активности из-за гидролиза UB4-C8 митохондриями печени крысы (RLM). Синяя линия – контрольный опыт по сбросу мембранныго потенциала UB4-C8. Оранжевая и серая линии – эффект при прединкубации RLM с дециловым и октиловым эфиром умбеллиферон-4-глиоксалевой кислоты, соответственно.

Исследование флуазинама и производных фенилтиофенамина

Как уже упоминалось, исчезновение активности в минутной шкале – достаточно уникальное свойство разобщителей. Помимо описанных выше сложных эфиров умбеллиферона, оно было известно только для фунгицида флуазинама и производных фенилтиофенамина.

Для флуазинама авторы [Guo 1991] показали зависимость скорости исчезновения разобщающей активности от добавления глутатиона на изолированных митохондриях печени, предполагая, что разобщитель является субстратом глутатион-S-трансферазы. При этом авторы не приводили каких-либо «прямых» доказательств такого механизма инактивации. В нашей работе [3] мы не только обнаружили химические конъюгаты флуазинама и глутатиона после инкубации с RLM, но и показали тканеспецифичность этого феномена.

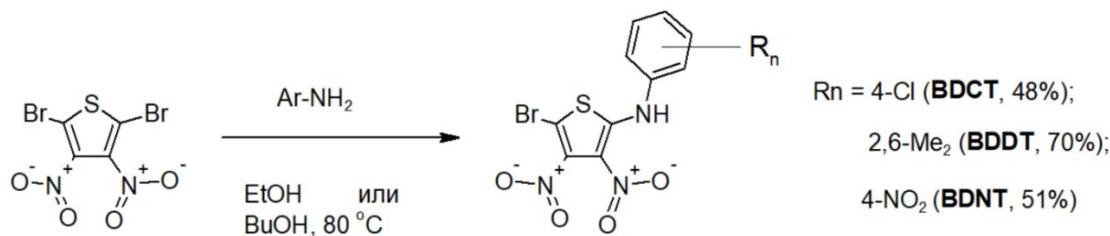
На первом этапе мы подтвердили ранее известные результаты: показали временное разобщающее действие флуазинама на RLM в наномолярном диапазоне (что сопоставимо с одним из самых сильных разобщителей SF6847), чувствительное к глутатиону (GSH) и динитрохлорбензолу (CDNB – субстрат GST, прединкубация с которым удаляет весь GSH из среды) (рисунок 16 А-Д).

Однако, как и в случае производных кумарина, на митохондриях сердца (RHM) и почек (RKM) исчезновения активности не наблюдалось. Отдельно можно отметить, что в

экспериментах и по сбросу мембранныго потенциала, и по измерению скорости дыхания, на RHM и RKM флуазинам был даже более активным, чем SF6847: так, на сердце полное разобщение наблюдалось уже при концентрации 1,5 нМ (рисунок 16 Е-Н).

Кроме того, методами капиллярного электрофореза, TCX и LC-MS было показано образование химических конъюгатов глутатиона и флуазинама после инкубации разобщителя с митохондриями печени, но не почек (рисунок 18А). Исходя из полученных данных, мы сделали вывод о катализическом глутатионилировании флуазинама как механизме тканеспецифичной спонтанной инактивации данного разобщителя.

Аналогичная серия экспериментов по изучению разобщающей активности была проведена для производных фенилтиофенамина [5]. 4-Хлорфенил, 2,6-диметилфенил и 4-нитрофенил производные 5-бром-3,4-динитротиофен-2-амина (BDCT, BDDT и BDNT, соответственно) были синтезированы по известной методике [Büchel 1970].



Как и флуазинам, они инактивировались в митохондриях печени (но не сердца) или в присутствии дополнительного GSH, а добавка CDNB или этакриновой кислоты (ингибитора GST) замедляла процесс ресопряжения (рисунок 17). Самым сильным разобщителем серии был BDNT, что согласуется с оригинальной работой [Büchel 1970]. Образование конъюгата GS-BDNT путем замещения атома брома детектировали методами TCX, LC-MS и CE (рисунок 18Б). Дополнительно было показано его образование при инкубировании BDNT и GSH с GST печени лошади (CAS 50812-37-8) (по TCX).

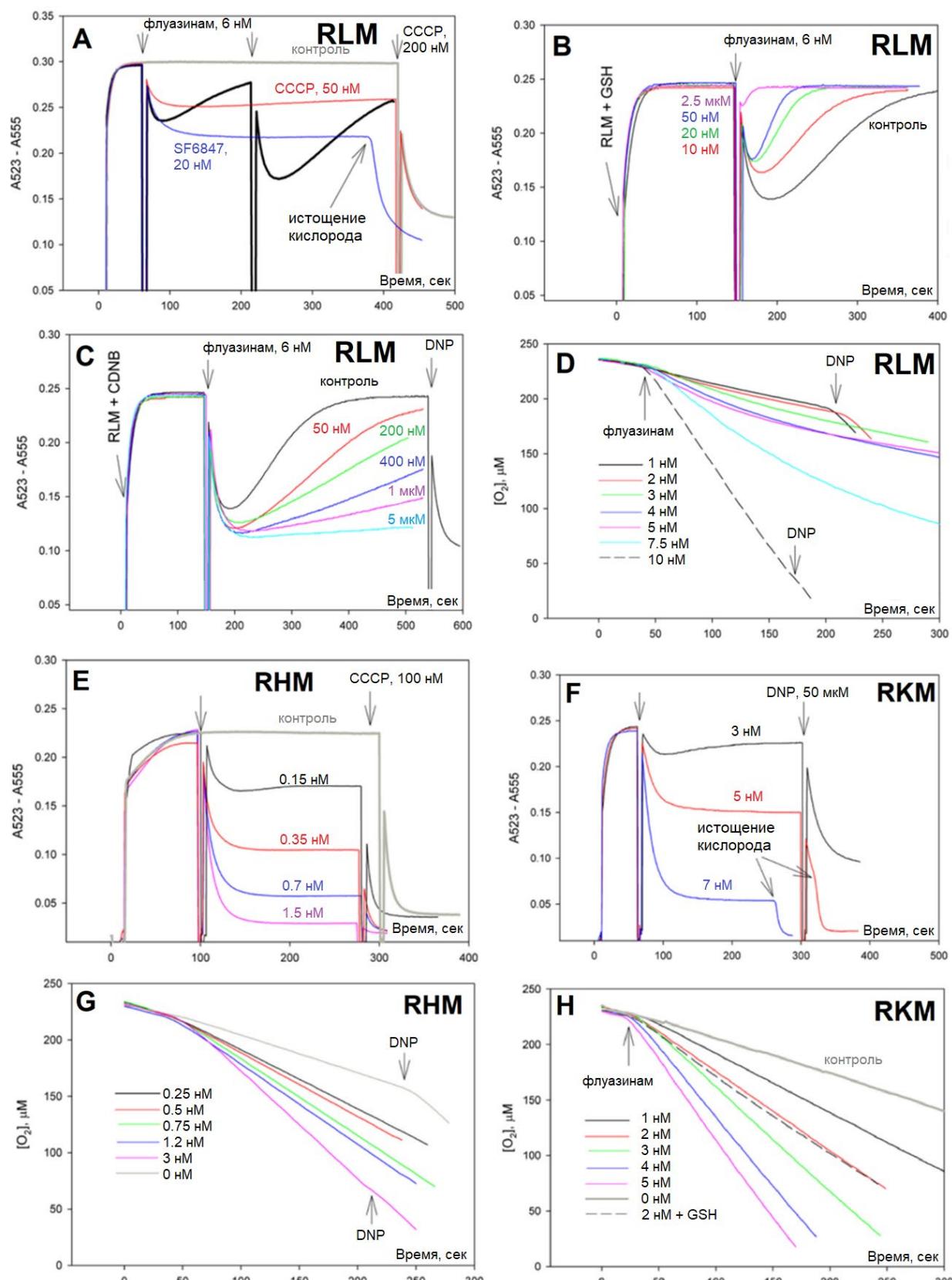


Рисунок 16. Эффект добавления флуазинама на сброс мембранныго потенциала (A-C) и дыхание (D) энергизованных изолированных митохондрий печени крысы (RLM). Прединкубация митохондрий с глутатионом (B) дозозависимо ускоряет, а с CDNB (C) – замедляет эффект ресопряжения, что говорит о GST-зависимом механизме инактивации. Эксперименты, доказывающие тканеспецифичность действия флуазинама: отсутствие исчезновения сброса мембранныго потенциала и гораздо большее ускорение дыхания наблюдается в случае митохондрий сердца (RHM; E, F) и почек (RKM; G, H) крыс.

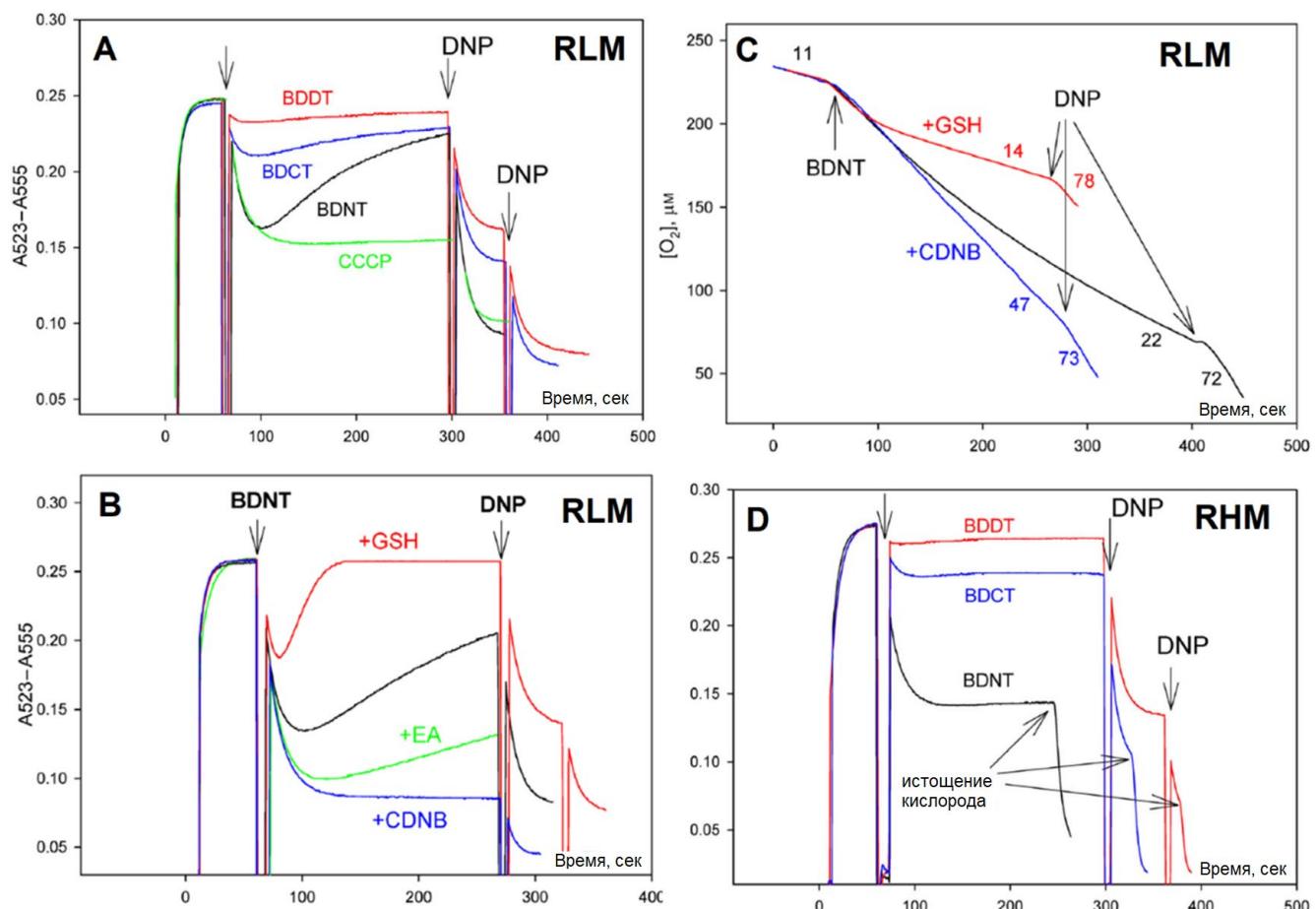


Рисунок 17. Эффект добавления *BDCT*, *BDDT* и *BDNT* на сброс мембранныго потенциала и дыхание *RLM* (**A-C**) и *RHM* (**D**). Аналогично флуазинаму, наблюдается зависимость от глутатиона, динитрохлорбензола и этакриновой кислоты (*EA*) (**B**).

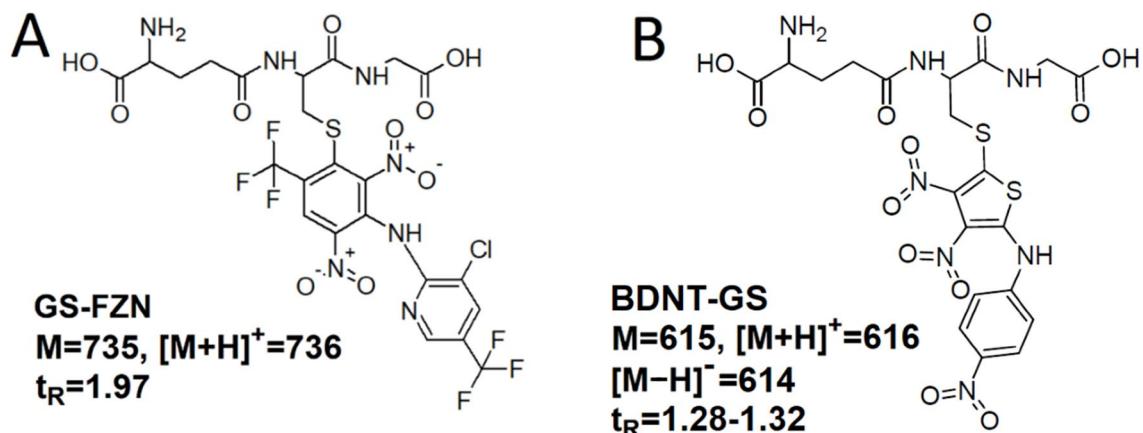


Рисунок 18. **A** Химическая структура конъюгатов *BDNT* (**A**) и флуазинама (**B**) с глутатионом: происходит замещение атома хлора или брома, соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итоги работы, можно утверждать, что поставленные цели и задачи исследования выполнены. Путем присоединения гидрофобного (алкильного) заместителя оптимальной длины к 7-гидроксикумариновому остатку удалось получить разобщители окислительного фосфорилирования средней силы, при этом проведено систематическое исследование нескольких серий гидрофобных эфиров 7-гидроксикумарина. Химическими, биофизическими и биохимическими методами установлено, что вследствие ферментативного гидролиза разобщающая активность сложных эфиров 7-гидроксикумаринсодержащих кислот носила временный характер в изолированных митохондриях печени, но не сердца крыс, иными словами, происходила спонтанная тканеспецифичная инактивация разобщителей. В ходе работы, нами открыт новый класс ингибиторов карбоксилэстераз, ответственных за такую инактивацию, на основе сложных эфиров умбеллиферон-4-глиоксалевой кислоты из ряда α -кетоэфиров. Дальнейшее исследование, проведённое для известных ранее разобщителей с аналогичными свойствами – флуазинама и производных анилинотиофена – показало, что они теряли свою активность посредством другого механизма, зависимого от глутатион-S-трансфераз.

На основании проведённого исследования можно сформулировать следующие **основные результаты работы и выводы:**

1. Методами органического химического синтеза получены 2 серии сложных эфиров умбеллиферон-содержащих кислот и показана их способность разобщать окислительное фосфорилирование в митохондриях, исчезающая в минутной шкале.
2. Биофизическими и химическими (TCX и LC-MS) методами доказан ферментативный тканеспецифичный гидролиз в изолированных митохондриях крыс как причина исчезновения разобщающей активности таких соединений.
3. Синтезировано ещё 15 производных умбеллиферона самого разного строения – сложные эфиры по другим положениям кумаринового остатка, негидролизуемые производные и аналоги без протонофорной группы. Наибольшую разобщающую активность проявлял октиловый и дециловый эфиры 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты. Найдены новые ингибиторы карбоксилэстераз на основе сложных эфиров умбеллиферон-4-глиоксалевой кислоты.
4. С помощью биохимического исследования и молекулярного докинга показано, что карбоксилэстераза 1, но не альдегиддегидрогеназа 2 гидролизует сложные эфиры умбеллиферон-содержащих кислот в митохондриях печени крысы.
5. Для флуазинама и фенилтиоферонаминов биофизическими и химическими методами доказан другой, глутатион-зависимый механизм тканеспецифичного исчезновения разобщающей активности.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова по специальности и отрасли наук:

1. **Krasnov V.S.**, Kirsanov R.S., Khailova L.S., Firsov A.M., Nazarov P.A., Tashlitsky V.N., Korshunova G.A., Kotova E.A., Antonenko Y.N. Alkyl esters of umbelliferone-4-acetic acid as protonophores in bilayer lipid membranes and ALDH2-dependent soft uncouplers in rat liver mitochondria. *Bioelectrochemistry*. 2022. V. 145. P. 108081. Импакт-фактор 4,5 (JIF). EDN: TMYREZ. 1,16 п. л.

2. **Krasnov V.S.**, Kirsanov R.S., Khailova L.S., Popova L.B., Lyamzaev K.G., Firsov A.M., Korshunova G.A., Kotova E.A., Antonenko Y.N. Alkyl esters of 7-hydroxycoumarin-3-carboxylic acid as potent tissue-specific uncouplers of oxidative phosphorylation: Involvement of ATP/ADP translocase in mitochondrial uncoupling. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2022. V. 728. P. 109366. Импакт-фактор 3,0 (JIF). EDN: WDGRQB. 1,34 п. л.

3. Khailova L.S., **Krasnov V.S.**, Kirsanov R.S., Popova L.B., Tashlitsky V.N., Kotova E.A., Antonenko Y.N. The transient character of mitochondrial uncoupling by the popular fungicide fluazinam is specific for liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2023. V. 746. P. 109735. Импакт-фактор 2,7 (JIF). EDN: JSLOCN. 1,41 п. л.

4. Khailova L.S., Kirsanov R.S., Rokitskaya T.I., **Krasnov V.S.**, Korshunova G.A., Kotova E.A., Antonenko Y.N. Mitochondrial uncoupling caused by a wide variety of protonophores is differently sensitive to carboxyatractyloside in rat heart and liver mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2024. V. 1865. № 4. P. 149506. Импакт-фактор 2,7 (JIF). EDN: KQRKTI. 1,73 п. л.

5. Kirsanov R.S., Khailova L.S., **Krasnov V.S.**, Firsov A.M., Lyamzaev K.G., Panteleeva A.A., Popova L.B., Nazarov P.A., Tashlitsky V.N., Korshunova G.A., Kotova E.A., Antonenko Y.N. Spontaneous reversal of small molecule-induced mitochondrial uncoupling: the case of anilinothiophenes. *FEBS Journal*. 2024. V. 291. № 24. P. 5523-5539. Импакт-фактор 4,2 (JIF). EDN: VPIDXW. 1,68 п. л.