

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА  
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

*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**

**ДИССЕРТАЦИЯ**

**на соискание учёной степени  
кандидата химических наук**

**Научные руководители:**

**д.б.н., профессор Антоненко Юрий Николаевич**

**к.х.н., с.н.с. Кирсанов Роман Сергеевич**

**Москва 2025**

<b>Список сокращений.....</b>	<b>5</b>
<b>Введение .....</b>	<b>8</b>
Актуальность и степень разработанности темы исследования.....	8
Цели и задачи исследования.....	10
Объект и предмет исследования .....	11
Научная новизна исследования.....	11
Научная и практическая значимость исследования.....	11
Методология диссертационного исследования.....	12
Основные положения, выносимые на защиту .....	13
Степень достоверности результатов.....	13
Апробация работы .....	13
Список инноваций .....	14
Публикации .....	14
Личный вклад автора.....	15
Структура и объем диссертации .....	15
<b>Глава 1. Обзор литературы .....</b>	<b>16</b>
1.1 Митохондрии. Строение и функции.....	16
1.2 Хемиосмотическая теория клеточного синтеза АТФ .....	18
1.2.1 Гликолиз и цикл Кребса .....	19
1.2.2 Дыхательная цепь переноса электронов.....	20
1.2.3 АТФ: механизм синтеза и суммарная стехиометрия.....	24
1.3 Разобщители окислительного фосфорилирования.....	26
1.3.1 Природные разобщители – термогенины .....	26
1.3.2 Синтетические разобщители .....	28
1.3.3 Терапевтические свойства разобщителей.....	31
1.4 Кумарины. Физико-химические и терапевтические свойства .....	33
1.5 Клеточные эстеразы .....	41

1.5.1 Альдегиддегидрогеназы .....	45
1.5.2 Структура ингибиторов ALDH2 и их терапевтические свойства .....	48
1.5.3 Ингибиторы ALDH2 на основе кумарина и умбеллиферона .....	48
1.5.4 Карбоксилэстеразы .....	50
1.5.5 Карбоксилэстераза 1 .....	52
1.5.6 Ингибиторы карбоксилэстераз .....	54
1.6 Химическая модификация ксенобиотиков.....	55
1.6.1 Глутатион. Структура и роль в клетке .....	57
1.6.2 Глутатионилирование и глутатион-S-трансферазы .....	61
1.7 Флуазидам – синтетический фунгицид-протонофор .....	66
1.8 Производные анилинотиофена: терапевтические и протонофорные свойства.....	69
<b>Глава 2. Материалы и методы.....</b>	<b>72</b>
2.1 Таблица синтезированных соединений.....	72
2.2 Методы химического синтеза.....	78
2.3 Методы биофизического анализа .....	104
<b>Глава 3. Результаты и обсуждение.....</b>	<b>109</b>
3.1 Сложные эфиры 7-гидроксикумарин-3-карбоновой и 7-гидроксикумарин-4-уксусной кислот. Методики химического синтеза .....	109
3.2 Биофизические эксперименты по измерению активности разобщителей окислительного фосфорилирования .....	110
3.3 Предположительное участие ALDH2 в тканеспецифичном гидролизе производных 7-гидроксикумарина .....	114
3.4 Опровержение гипотезы участия ALDH2.....	117
3.5 Карбоксилэстераза 1 инактивирует сложные эфиры умбеллиферона .....	120
3.6 Модификация структуры сложных эфиров 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты .....	126
3.7 Сложные эфиры 7-гидроксикумарин-4- и 6-карбоновых кислот .....	131
3.8 Производные умбеллиферон-4-глиоксалевой кислоты .....	132
3.8 Исследование флуазидама и производных фенил-тиофенамина .....	134

<b>Заключение .....</b>	<b>139</b>
<b>Список литературы .....</b>	<b>140</b>
<b>Приложение.....</b>	<b>157</b>
Таблица значений Rf.....	157
ЯМР спектры синтезированных соединений.....	158



**Список сокращений**

AADAC	арилацетамиддеацетилазы
ALDH	альдегиддегидрогеназы
ALDH2	альдегиддегидрогеназа 2
ANT1	транслокатор адениновых нуклеотидов (АТФ/АДФ антипортер)
BAM15	N5,N6-бис(2-фторфенил)[2,1,3]оксадиазоло[4,5-b]пиразин-5,6-диамин
BAT	бурая жировая ткань
BDCT	5-бром-3,4-динитро-N-(4-хлорфенил)тиофен-2-амин
BDNT	5-бром-3,4-динитро-N-(4-нитрофенил)тиофен-2-амин
CATR	карбоксиатрактилозид
CCCP	карбонилцианид-м-хлорфенилгидразон
CDNB	2,4-динитрохлорбензол
CES	карбоксилэстераза человека
CES1	карбоксилэстеразы 1 человека
CES2	карбоксилэстеразы 2 человека
DDCT	5-бром-3,4-динитро-N-(2,3-диметилфенил)тиофен-2-амин
DMAp	4-диметиламинопиридин
DNP	2,4-динитрофенол
DSF	дисульфирам
DZ	дайдзин
FAD	флавинадениндинуклеотид окисленный
FADH <sub>2</sub>	флавинадениндинуклеотид восстановленный
FCCP	карбонилцианид 4-трифторметоксифенилгидразон
FZN	флуазиам
GCL	глутамат-цистеинлигаза

GGT	γ-глутамилтранспептидаза
GR	глутатионредуктаза
GS	глутатионсинтетаза
GS-FZN	конъюгат глутатиона и флуазинама
GSH	глутатион
GSSG	глутатион окисленный
GST	глутатион-S-трансфераза
LC-MS	хромато-масс-спектрометрия
MAPEG	мембранно-ассоциированные белки суперсемейства метаболизма эйкозаноидов и глутатиона
mitoFluo	10-[(2-(6-гидрокси-3-оксо-3H-ксантен-9-ил)бензоил)окси]децилтрифенилфосфоний бромид
MRP	белок множественной лекарственной устойчивости
NAD(P) <sup>+</sup>	никотинамидадениндинуклеотид (фосфат) окисленный
NAD <sup>+</sup>	никотинамидадениндинуклеотид окисленный
NADH	никотинамидадениндинуклеотид восстановленный
OAA	оксалоацетат
PLA2	фосфолипаза A2
PMSF	фенилметилсульфонил фторид
PON	параоксоназы
Q	убихинон
QH <sub>2</sub>	убихинол
RHM	изолированные митохондрии сердца крысы
RHMm	матрикс митохондрий сердца крысы
RKM	изолированные митохондрии почек крысы
RLM	изолированные митохондрии печени крысы

RLMm	матрикс митохондрий печени крысы
ROS	активные формы кислорода
TTFA	теноилтрифторацетон
TTFB	4,5,6,7-тетрахлор-2-трифторметилбензимидазол
UCP	разобщающие белки
UDP	уридиндифосфат
UGT	УДФ-глюкуронозилтрансфераза
WAT	белая жировая ткань
$\alpha$ KG	альфа-кетоглутарат
АДФ	аденозиндифосфат
АТФ	аденозинтрифосфат
БЛМ	бислойная липидная мембрана
ГТФ	гуанидинтрифосфат
ДМСО	диметилсульфоксид
ЛПОНП	липопротеины очень низкой плотности
НАСГ	неалкогольный стеатогепатит
СМЧ	субмитохондриальные частицы
ТСХ	тонкослойная хроматография
ФМН	флавинмононуклеотид
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭПР	эндоплазматический ретикулум
ЭТЦ	электрон-транспортная цепь / дыхательная цепь переноса электронов
ЯМР	ядерный магнитный резонанс

**Актуальность и степень разработанности темы исследования**

Хемиосмотическая теория, предложенная британским биохимиком Питером Митчеллом в 1961 году, произвела революцию в понимании синтеза аденозинтрифосфата (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 мембране или тилакоидной мембране хлоропластов. Этот градиент, называемый протондвижущей силой, состоит как из химической составляющей (разница в концентрации протонов, или  $\Delta pH$ ), 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 межмембранное пространство (или люмен тилакоида) за счёт энергии, выделяемой при окислении органических субстратов (в случае митохондрий) или энергии света (в случае хлоропластов).

Разобшителями 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, запасённую 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 разобшители, 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 разобшителями, широко используемыми в научных экспериментах, являются также карбонилцианид м-хлорфенилгидразон (CCCP) и карбонилцианид п-трифторметоксифенилгидразон (FCCP). Разобшители 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 мембраны, 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 мембраны.

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 мембранного 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 запаса 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 — катарактогенезом, наблюдавшимся у некоторых пациентов. Это подчёркивает, что проблема применения разобщителей часто

заключается не в системной токсичности, а в достижении тканеспецифичного действия. Следовательно, в настоящее время исследования сосредоточены на таких стратегиях, как создание направленных «мягких» разобщителей, разработка тканеспецифичных 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, нитробензоксадиазол (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- $\alpha$ -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 катализирующего 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 – флуазинома и фенилтиофенаминов.

### **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 тканеспецифичности 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-гидроксикумарина, 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 бислойной липидной мембране и выравниванию градиента pH на липосомах) и изолированных митохондриях печени, сердца и почек крыс *Rattus norvegicus* (линии Wistar) – по измерению мембранного 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 масс-спектрометрии и SDS-электрофореза в полиакриламидном геле.



### **Основные положения, выносимые на защиту**

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

2. Разобщающее действие 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  $\alpha$ -кетоефиров.

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 международных и всероссийских конференциях в виде устных и стендовых докладов, а именно:

1) XXVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов 2021", МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, 12-23 апреля 2021

2) VII Съезд биофизиков России, Краснодар, Россия, 17-23 апреля 2023

3) Всероссийская конференция по электрохимии с международным участием, Москва, Россия, 23-27 октября 2023 г.

4) Международная научная конференция «Физико-химическая биология в год 270-летия МГУ», приуроченная к 270-летию Университета и посвященная двум выдающимся научным школам — молекулярной биологии и биоэнергетики, возникшим в МГУ под руководством А.Н.Белозерского и В.П.Скулачева, МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, 20-22 февраля 2025

## Список инноваций

ПРОИЗВОДНОЕ 7-ГИДРОКСИКУМАРИНА ДЛЯ ИНДУКЦИИ МИТОФАГИИ В КЛЕТКАХ, СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ. Краснов В.С., Кирсанов Р.С., Хайлова Л.С., Попова Л.Б., Назаров П.А., Лямзаев К.Г., Фирсов А.М., Коршунова Г.А., Котова Е.А., Антоненко Ю.Н. Номер патента: RU 2819611 С1. EDN: RVWCDF

## Публикации

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. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2022.108081. 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. *Arch Biochem Biophys*. 2022. V. 728. P. 109366. Импакт-фактор 3,0 (JIF). EDN: WDGRQB. DOI: 10.1016/j.abb.2022.109366. 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. *Arch Biochem Biophys*. 2023. V. 746. P. 109735. Импакт-фактор 2,7 (JIF). EDN: JSLOCN. DOI: 10.1016/j.abb.2023.109735. 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. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 2024. V. 1865. № 4. P. 149506. Импакт-фактор 2,7 (JIF). EDN: KQRKTI. DOI: 10.1016/j.bbabi.2024.149506. 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 J*. 2024. V. 291. № 24. P. 5523-5539. Импакт-фактор 4,2 (JIF). EDN: VPIDXW. DOI: 10.1111/febs.17329. 1,68 п. л.

### **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 мембранного 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.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1 Митохондрии. Строение и функции

Митохондрии — двумембранные органеллы почти всех эукариотических клеток (рисунок 1). Согласно широко распространенной гипотезе, митохондрии — это сильно редуцированные прокариоты, которые были «съедены» на заре эволюции эукариотической клетки. Митохондриальная ДНК — короткий кольцевой геном, кодирующий у человека только 13 белков, 22 тРНК и 2 рРНК. «Потеряв» большую часть генома, митохондрии стали «электростанциями клетки», выполняя центральную роль в производстве энергии. Однако их функции выходят далеко за рамки синтеза АТФ, охватывая системы передачи сигналов, апоптоз, гомеостаз кальция.

Двойная мембранная система — одна из важных особенностей митохондрий. Так, внешняя мембрана проницаема для малых молекул ( $<6$  кДа) благодаря пориновым каналам, а внутренняя — непроницаема даже для ионов, что критически необходимо для поддержания градиента протонов для синтеза АТФ. Кроме того, внутренняя мембрана свернута в кристы для увеличения площади поверхности при минимальном объёме и содержит белки окислительного фосфорилирования (комплексы цепи переноса электронов, АТФ-синтаза). Межмембранное пространство, в свою очередь, содержит ферменты для регуляции апоптоза, а матрикс — внутренняя часть митохондрий — содержит митохондриальную ДНК (мтДНК), рибосомы и ферменты цикла лимонной кислоты, окисления жирных кислот и репликации мтДНК.

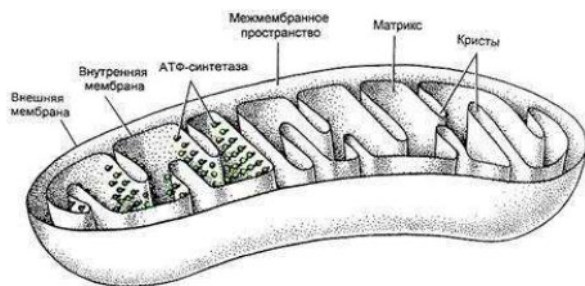


Рисунок 1. Структура митохондрии.

Митохондрии — организм в организме — оптимизировали свою архитектуру для выполнения разнообразных ролей.

Основная функция митохондрий — производство энергии за счёт окислительного фосфорилирования. Окисление питательных веществ через цикл лимонной кислоты (цикл Кребса) в матриксе приводит к образованию  $\text{NADH}$ ,  $\text{FADH}_2$  и сукцината для электрон-транспортной цепи (ЭТЦ). ЭТЦ в кристах внутренней мембраны, используя кислород как

конечный донор электронов, генерирует электрохимический потенциал протонов, необходимый АТФ-синтазе для фосфорилирования АДФ до АТФ.

Другие функции митохондрий заключаются в (1) обеспечении гомеостаза кальция: митохондрии поддерживают уровень цитозольного кальция, регулируя высвобождение нейромедиаторов и сокращение мышц; (2) регуляции апоптоза: высвобождение цитохрома *c* из межмембранного пространства инициирует запрограммированную гибель клеток; (3) передаче сигналов и предотвращении повреждений активными формами кислорода (ROS): ROS – побочные продукты окислительной активности ЭТЦ – на низких уровнях действуют как сигнальные молекулы, но их избыток повреждает мтДНК, белки и липиды, способствуя старению и развитию болезней; (4) регулируемой выработке тепла: разобщающие белки (UCP) в митохондриях бурого жира млекопитающих генерируют тепло посредством несократительного термогенеза (минуя синтез АТФ).

Кроме того, из-за уникальных окислительно-восстановительных условий, в митохондриях идёт синтез гема и железо-серных кластеров, различных метаболитов стероидогенеза, предшественников нуклеотидов. Примечательно, что митосомы (наиболее рудиментарная форма митохондрий) сохранили только роль в создании железо-серных кластеров, что говорит о важности этой функции митохондрий.

Из-за особенностей наследования мтДНК (у человека она передаётся только по материнской линии), а также «близости» к источнику ROS, симптомы митохондриальных заболеваний имеют характерные особенности: мутации в мтДНК или ядерных генах (например, PINK1, POLG) нарушают выработку энергии, вызывая такие расстройства, как синдром Ли, миопатию и нейродегенерацию.

## 1.2 Хемиосмотическая теория клеточного синтеза АТФ

Хемиосмотическая теория [1], предложенная британским биохимиком Питером Митчеллом в 1961 году, произвела революцию в понимании клеточного синтеза аденозинтрифосфата (АТФ) во время окислительного фосфорилирования и фотосинтеза. Согласно Митчеллу, энергия, получаемая из цепи переноса электронов (ЭТЦ), не используется напрямую для синтеза АТФ, а вместо этого используется для создания электрохимического протонного градиента на энергопреобразующих биологических мембранах: внутренней митохондриальной мембране или тилакоидной мембране хлоропластов. Этот градиент, называемый протондвижущей силой, состоит как из химической составляющей (разница в концентрации протонов, или  $\Delta pH$ ), так и электрического потенциала (мембранный потенциал,  $\Delta\psi$ ). А комплексы ЭТЦ действуют как протонные насосы, перемещая протоны из митохондриального матрикса (или стромы хлоропласта) в межмембранное пространство (или люмен тилакоида), за счёт энергии, выделяемой при переносе электронов по цепи.

Рассмотрим весь путь, от одного из самых распространенных источников энергии в живых организмах – глюкозы, до получения энергетической валюты клетки – АТФ.

### 1.2.1 Гликолиз и цикл Кребса

Катаболические пути последовательного окисления органической молекулы для синтеза АТФ состоят из трёх взаимосвязанных этапов: гликолиз, цикл лимонной кислоты (цикл Кребса) и окислительное фосфорилирование. Цитоплазматический гликолиз (рисунок 2) запускает катаболизм глюкозы путем фосфорилирования и расщепления шестиуглеродной молекулы глюкозы на две трехуглеродные молекулы пирувата с образованием 2 АТФ и 2 NADH. Суммарное уравнение гликолиза:

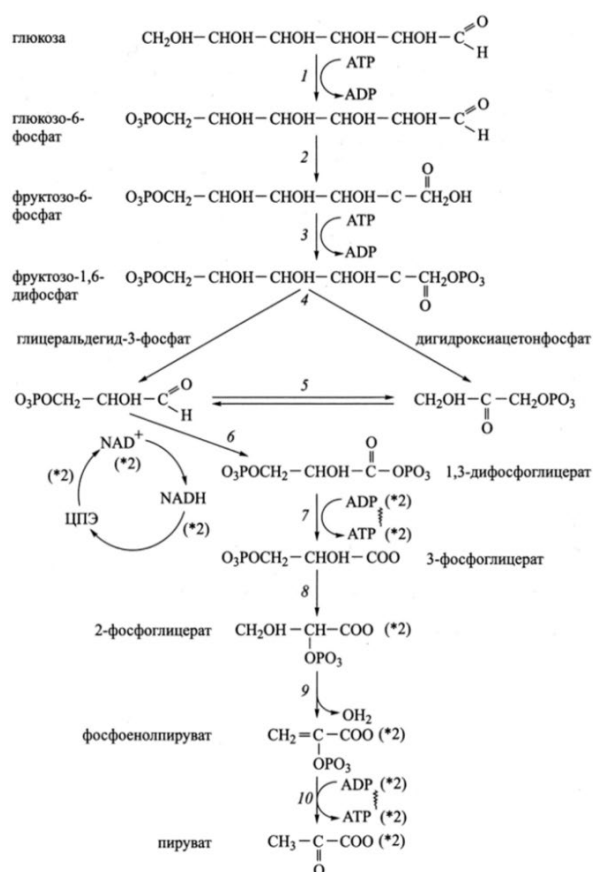
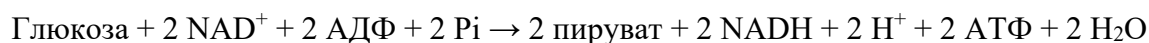
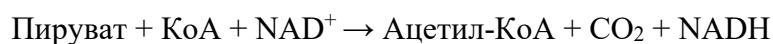


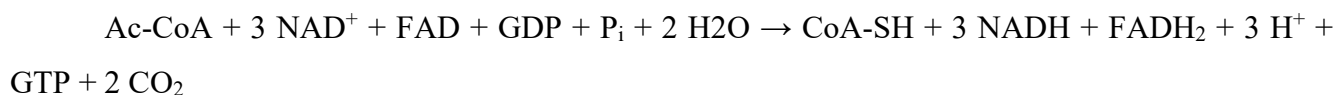
Рисунок 2. Схема гликолиза.

Пируват затем транспортируется в митохондриальный матрикс, где он подвергается окислительному декарбоксилированию пируватдегидрогеназным комплексом (ПДГ), в ацетил-КоА, высвобождая  $\text{CO}_2$  и генерируя NADH.



Затем ацетил-КоА входит в цикл лимонной кислоты в митохондриальном матриксе, который завершает окисление ацетильных групп (рисунок 3). Цикл начинается с конденсации ацетил-КоА и оксалоацетата, катализируемой цитратсинтазой, с образованием цитрата. Через ряд

ферментативных реакций, включая изомеризацию аконитазой, окислительное декарбоксилирование изоцитратдегидрогеназой и  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназой, фосфорилирование GDP сукцинил-КоА-синтетазой и окислительно-восстановительные реакции, опосредованные сукцинатдегидрогеназой и малатдегидрогеназой, цикл регенерирует оксалоацетат, производя при этом 3 NADH, 1 FADH<sub>2</sub> и 1 ГТФ на 1 ацетил-КоА.



Суммарное уравнение окисления глюкозы можно представить в виде:

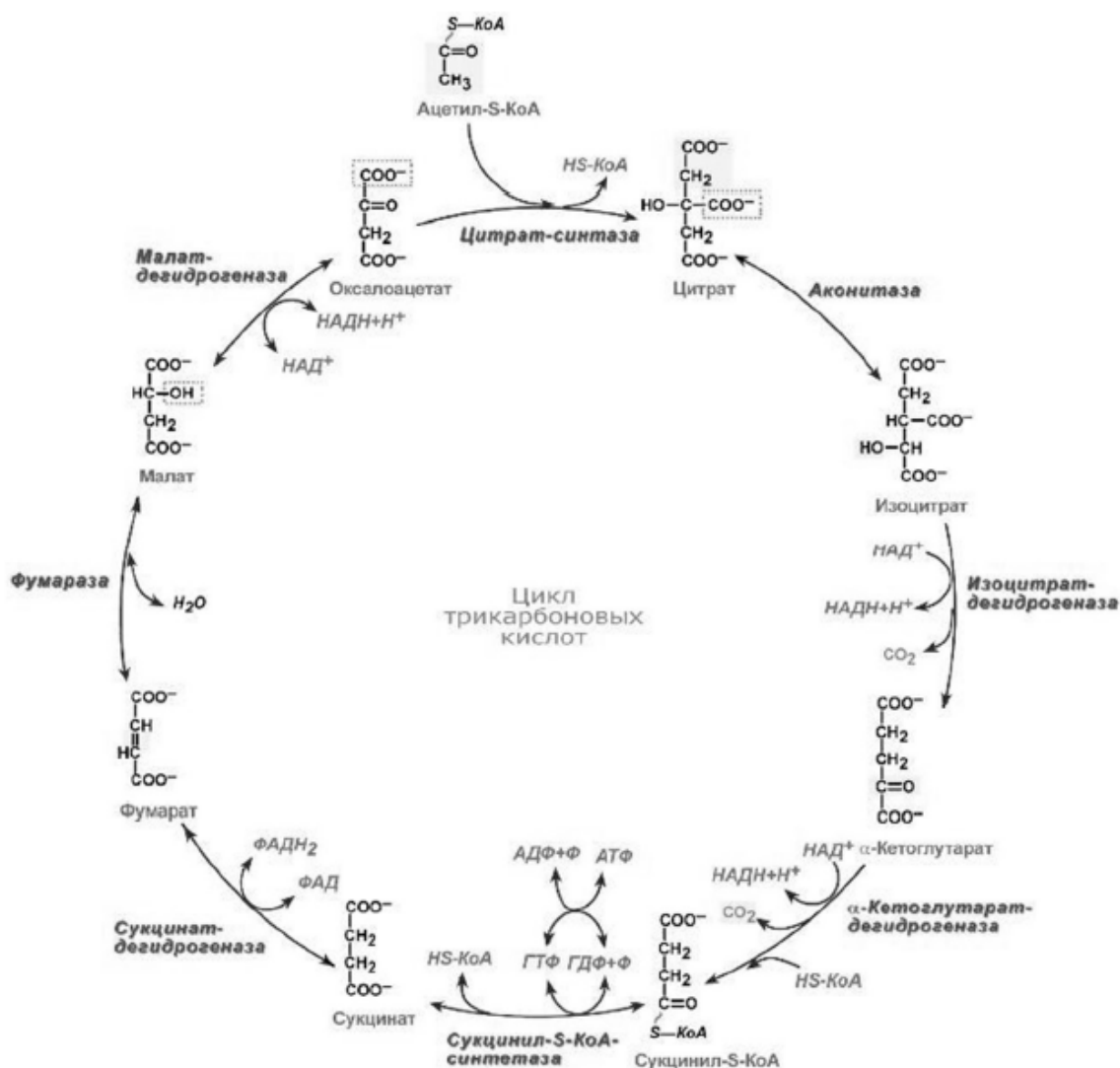
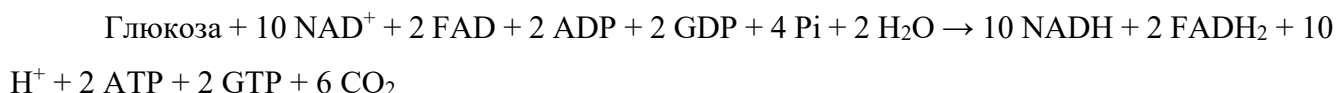


Рисунок 3. Цикл Кребса.

### 1.2.2 Дыхательная цепь переноса электронов

Аденозинтрифосфат (АТФ) — это конъюгат аденина, рибозы и трех фосфатных групп. Он служит универсальной энергетической валютой клеток для передачи энергии между



метаболическими путями и питания термодинамически невыгодных процессов, таких как биосинтез, активный транспорт и сокращение мышц.

Синтез такого важного метаболита – финальная стадия окисления глюкозы (или другого питательного вещества) в клетках любого организма. NADH и  $\text{FADH}_2$ , образующиеся в ходе гликолиза, декарбоксилирования пирувата и цикла Кребса, служат донорами электронов в ЭТЦ, серии мультисубъединичных белковых комплексов внутренней мембраны митохондрий. Постепенчато перенося электроны к молекулярному кислороду, белки дыхательной ЭТЦ связывают этот экзергонический процесс с генерацией протонного градиента для синтеза АТФ. Давайте подробнее рассмотрим данный процесс.

Электроны из NADH поступают в ЭТЦ в комплекс I (NADH-дегидрогеназа), который переносит электроны на убихинон (CoQ, коэнзим Q). Структурно комплекс I у млекопитающих состоит из 45 субъединиц, включая кофактор флавинмононуклеотид (ФМН) и восемь железо-серных (Fe-S) кластеров. Реакция начинается со связывания NADH с обращенным к матриксу плечом L-образного комплекса, где ФМН окисляет NADH до  $\text{NAD}^+$ , захватывая два электрона. Эти электроны пересекают ряд кластеров Fe-S, пространственно расположенных для минимизации потерь энергии, в конечном итоге восстанавливая убихинон (Q) до убихинола ( $\text{QH}_2$ ) уже в мембранном домene (рисунок 4). Этот перенос электронов сопряжен с транслокацией четырех протонов из митохондриального матрикса в межмембранное пространство.

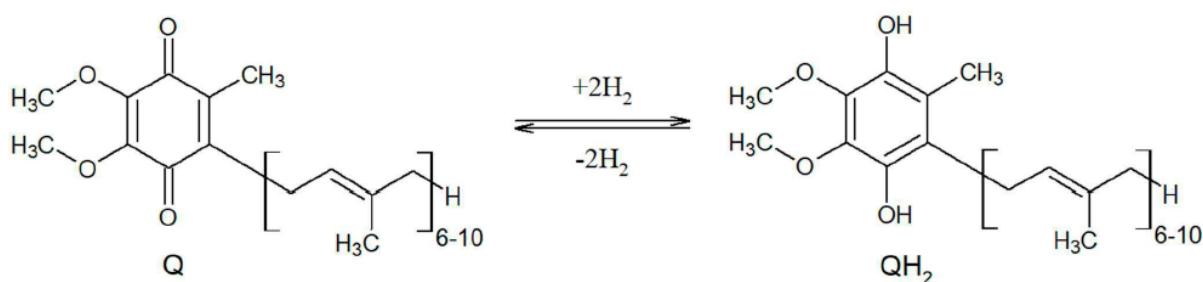
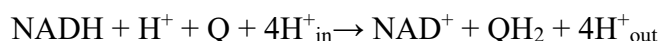
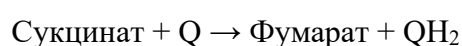


Рисунок 4. Схема взаимопревращений убихинона (Q) и убихинола ( $\text{QH}_2$ ).

Комплекс II (сукцинат-убихинон оксидоредуктаза) связывает цикл лимонной кислоты с функционированием ЭТЦ. Этот интегральный белок внутренней мембраны митохондрий содержит четыре субъединицы: из них две гидрофильные – флавопротеин (с FAD) и железо-серная субъединица (с тремя кластерами Fe-S) – окисляют сукцинат до фумарата в цикле Кребса, перенося электроны через  $\text{FADH}_2$  к кластерам Fe-S, и две гидрофобные, якорные, окончательно переносящие электроны к убихинону, образуя  $\text{QH}_2$  без перекачки протонов.



Электроны из обоих комплексов I и II поступают в пул липидорастворимых молекул убихинона, которые дальше переносят электроны на комплекс III (убихинол-цитохром с оксидоредуктаза или комплекс цитохрома bc<sub>1</sub>). Комплекс III работает через Q-цикл (рисунок 5), который оптимизирует транслокацию протонов за счёт того, что, окисляясь и восстанавливаясь в двух пространственно разделённых цепях транспорта электронов, два связанных хинона соответственно отдают и забирают протоны избирательно с разных сторон мембраны. Структурно он содержит погруженный в мембрану цитохром b и выступающие в межмембранное пространство цитохром c<sub>1</sub> и железосерный белок Риске. Убихинол (QH<sub>2</sub>) связывается с сайтом Q<sub>out</sub> комплекса III, отдавая один электрон кластеру Fe-S белка Риске (который переносит его на цитохром c<sub>1</sub>, а затем на мобильный переносчик – цитохром c), а другой — на гем В<sub>L</sub>. Далее этот электрон через гем В<sub>H</sub> восстанавливает второй убихинон в сайте Q<sub>in</sub> до семихинона. Вторая молекула QH<sub>2</sub> повторяет этот процесс, полностью восстанавливая убихинон в сайте Q<sub>in</sub> до QH<sub>2</sub> (за счёт протонов из матрикса), высвобождая по два протона в межмембранное пространство при окислении убихинола в Q<sub>out</sub>.

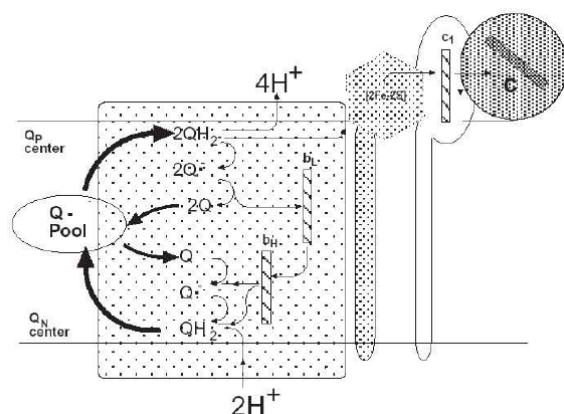
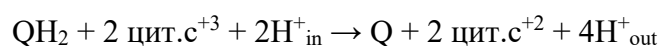
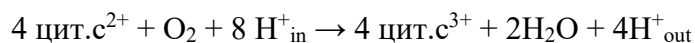


Рисунок 5. Механизм переноса электронов в комплексе III и Q-цикл.

Цитохром c, небольшой растворимый гемовый белок, затем диффундирует вдоль поверхности мембраны, чтобы доставить электроны в комплекс IV (цитохром c оксидаза), терминальную оксидазу. Комплекс IV (рисунок 6), димерный комплекс по 13 субъединиц у млекопитающих, содержит две гемовые группы (a и a<sub>3</sub>) и два медных центра (Cu<sub>A</sub> и Cu<sub>B</sub>). Электроны от цитохрома c переносятся последовательно сначала на Cu<sub>A</sub>, затем на гем a и, наконец, на биядерный центр гема a<sub>3</sub> – Cu<sub>B</sub>, где связывается молекулярный кислород. Восстановление O<sub>2</sub> до воды включает четырехэлектронный процесс образования двух молекул H<sub>2</sub>O за счет четырёх протонов матрикса.



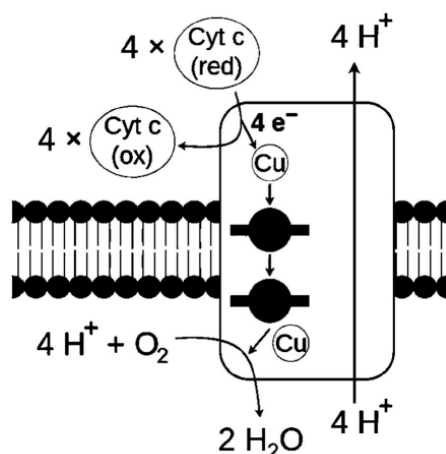


Рисунок 6. Механизм переноса электронов в комплексе IV.

Такое поэтапное восстановление и точное пространственное расположение окислительно-восстановительных центров — ФМН, кластеров Fe-S, гемов и ионов меди — обеспечивает поток электронов с минимальной диссипацией энергии и позволяет избежать образования активных форм кислорода (ROS). Перекачка протонов комплексами I ( $4 \text{ H}^+$  на 1 NADH), III ( $4 \text{ H}^+$  на цикл Q) и IV ( $2 \text{ H}^+$  на 1 атом кислорода) создаёт электрохимический градиент протонов ( $\Delta\psi + \Delta\text{pH}$ ), который используется АТФ-синтазой (комплексом V) для фосфорилирования АДФ (рисунок 7).

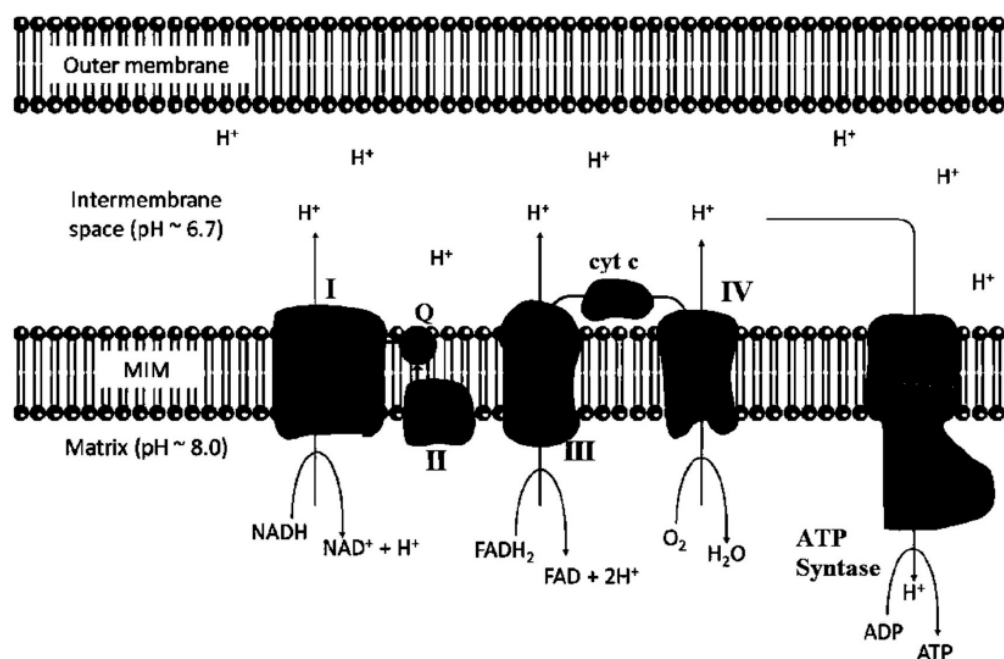


Рисунок 7. Общее строение дыхательной цепи переноса электронов и АТФ-синтазы.

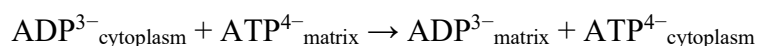
### 1.2.3 АТФ: механизм синтеза и суммарная стехиометрия

Ключевой компонент системы окислительного фосфорилирования – АТФ-синтаза, молекулярная машина, которая преобразует аденозиндифосфат (АДФ) и неорганический фосфат (Pi) в аденозинтрифосфат (АТФ), используя энергию градиента протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану.

АТФ-синтаза – двухкомпонентный комплекс, заякоренный во внутренней мембране митохондрий (рисунок 8). Субъединица  $F_o$  представляет собой трансмембранный протонный канал из кольца субъединиц  $c$  (образующих ротор) и субъединиц  $a$ ,  $b$  и  $e$ , которые стабилизируют структуру и создают путь для протонов через мембрану. Число  $c$ -субъединиц в кольце варьирует у разных видов (например, 8 у людей), влияя на  $H^+$ /АТФ стехиометрию. Субъединица  $F_1$  – гидрофильная головка, выступающая в митохондриальный матрикс. Она содержит  $(\alpha\beta)_3$  - гексамер, где три  $\beta$ -субъединицы катализируют синтез АТФ, а три  $\alpha$ -субъединицы регулируют активность. Центральная  $\gamma$ -субъединица (роторная ось) соединяет  $F_1$  с  $F_o$  и вращается во время катализа, в то время как периферический стебель (состоящий из субъединиц  $b$ ,  $d$ ,  $h$  и OSCP (из  $F_1$ )) действует как статор, предотвращая вращение  $(\alpha\beta)_3$ .

АТФ-синтаза работает по механизму механического катализа: химическая энергия градиента протонов превращается во вращательную, которая катализирует синтез АТФ. Так запускается процесс транслокации протонов из межмембранного пространства в матрикс через  $F_o$ : субъединица  $b$  направляет протоны в  $c$ -кольцо, где каждый протон связывается с консервативным остатком аспарагина, заставляя  $c$ -кольцо вращаться. Это вращение через  $\gamma$ -субъединицу запускает последовательные конформационные изменения в  $\beta$ -субъединицах  $F_1$  — свободное состояние (связывание  $ADP + Pi$ ), плотное (образование АТФ) и открытое (высвобождение АТФ). Каждое вращение  $\gamma$  на  $360^\circ$  производит приблизительно три молекулы АТФ (каждый шаг в  $120^\circ$  соответствует одному АТФ).

Важно рассмотреть и источники АДФ и фосфата в матриксе. В нормальных условиях нуклеотиды не могут проникать через внутреннюю мембрану митохондрий, поэтому для пополнения пула цитозольного АТФ (и пула матричного субстрата АТФ-синтазы – АДФ) адениннуклеотидтрансфераза (ANT1) обменивает матричный АТФ на цитозольный АДФ за счёт электрической составляющей мембранного потенциала.



Неорганический фосфат ( $P_i$ ) транспортируется в матрикс митохондриальным переносчиком фосфата, за счёт химической составляющей мембранного потенциала: захват  $P_i$  связан с симпортом протона по градиенту концентрации, поддерживающим электронейтральность.

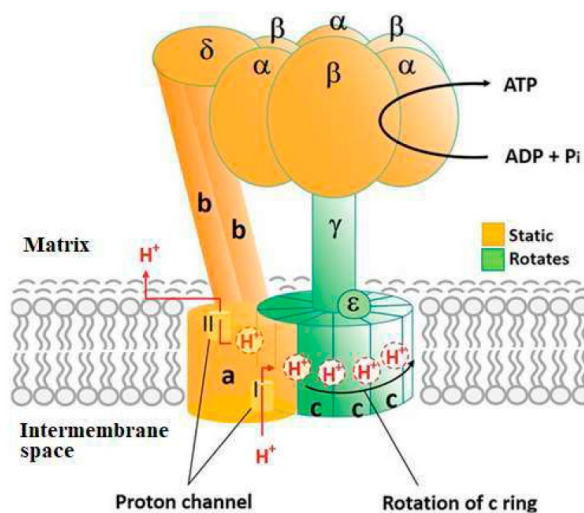


Рисунок 8. Строение и механизм работы АТФ-синтазы.

Возвращаясь к митохондрии, как энергетической станции клетки, отметим, что цикл Кребса и ЭТЦ играют центральную роль в аэробном синтезе АТФ. Так, именно цикл трикарбоновых кислот (и гликолиз в меньшей степени) генерирует высокоэнергетические переносчики электронов ( $\text{NADH}$ ,  $\text{FADH}_2$ ), которые управляют перекачкой протонов через цепь переноса электронов. Результирующий протонный градиент ( $\Delta\psi$  и  $\Delta\text{pH}$ ) обеспечивает энергию для вращательного катализа синтеза АТФ. Цикл Кребса и ЭТЦ жестко регулируются механизмами обратной связи: АТФ и высокое соотношение  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  аллостерически ингибируют ключевые ферменты (например, изоцитратдегидрогеназу), в то время как АДФ активирует их, демонстрируя сложную систему саморегуляции.

Стехиометрия синтеза АТФ зависит от градиента протонов и эффективности связывания (доступности) субстратов. У млекопитающих требуется приблизительно 3–4 протона на синтез АТФ в зависимости от размера с-кольца, при этом каждый  $\text{NADH}$  вносит приблизительно 2,5–3 АТФ, а каждый  $\text{FADH}_2$  дает 1,5–2 АТФ. Так, аэробное дыхание теоретически производит 38 молекул АТФ на молекулу глюкозы (4  $\text{H}^+$  требуется на синтез АТФ), полученных из:

Гликолиз: 2 АТФ (цитозоль) + 2  $\text{NADH}$  ( $\approx 3\text{--}5$  АТФ через ЭТЦ).

Окисление пирувата: 2  $\text{NADH}$  ( $\approx 5$  АТФ).

Цикл Кребса: 6  $\text{NADH}$  ( $\approx 15$  АТФ), 2  $\text{FADH}_2$  ( $\approx 3$  АТФ), 2 ГТФ ( $\approx 2$  АТФ).

Однако фактический выход АТФ ниже ( $\sim 29\text{--}32$  АТФ/ 1 глюкоза) из-за образования активных форм кислорода и энергетических затрат на транспортировку АДФ, фосфата и пирувата в митохондрии. Несмотря на это, энергетическая эффективность клеточного дыхания подчеркивает критическую роль митохондрий в удовлетворении потребностей клеток в универсальном источнике энергии.

### 1.3 Разобщители окислительного фосфорилирования

Разобщителями называют соединения (как низкомолекулярные, так и полимерные), которые нарушают связь (сопряжение) между переносом электронов по ЭТЦ и синтезом АТФ при окислительном (или фотосинтетическом) фосфорилировании, позволяя протонам «обходить» АТФ-синтазу. Этот процесс преобразует энергию, запасенную в протондвижущей силе, в тепло, а не в энергию фосфодиэфирной связи АТФ, рассеивая протонный градиент через внутреннюю мембрану митохондрий. Концепция разобщения возникла уже на ранних этапах исследований митохондриальной биоэнергетики [2], в частности при изучении термогенеза у 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 [3-5]. Это открытие подтвердило хемиосмотическую теорию Питера Митчелла [1], а также показало, какие биологические системы могут являться исключением, только подтверждающим этот постулат.

#### 1.3.1 Природные разобщители – термогенины [6-10]

Термогенин, также известный как разобщающий белок 1 (UCP1), является митохондриальным трансмембранным белком внутренней мембраны митохондрий бурой жировой ткани (ВАТ). Его основная функция – выработка тепла у новорожденных млекопитающих и животных в спячке путем несократительного термогенеза – разъединения (разобщения, т.е. нарушения сопряжения) переноса электронов по ЭТЦ и образования АТФ (рисунок 9).

Электрохимический потенциал протонов, генерируемый на внутренней мембране митохондрий сопряженно с переносом электронов по ЭТЦ, обычно используется АТФ-синтазой для синтеза АТФ. Вместо этого UCP1 обеспечивает альтернативный поток протонов напрямую в митохондриальный матрикс вне АТФ-синтазы, высвобождая запасенную энергию в виде тепла. Активация этого процесса разобщения происходит через каскад сигналов, инициируемый симпатической нервной системой: связывание норадреналина с  $\beta_3$ -адренергическими рецепторами запускает цАМФ-зависимый липолиз, высвобождая свободные жирные кислоты (СЖК) из триглицеридов. Эти СЖК связываются с UCP1, открывая его протонный канал и «разрешая» утечку протонов. GDP и ADP – маркеры недостатка химической энергии в виде АТФ – наоборот, ингибируют действие UCP1. Активность белка дополнительно регулируется гормональными сигналами, которые усиливают термогенез ВАТ во время воздействия холода.

UCP1 принадлежит к семейству митохондриальных переносчиков SLC25 и структурно гомологичен ANT1: шесть трансмембранных  $\alpha$ -спиралей образуют гидрофильный канал в мембране. Исследования с помощью криоэлектронной микроскопии [11], [12] показывают, что UCP1 принимает цитоплазматически открытую конформацию, стабилизированную связыванием GTP в зависимости от pH, что предотвращает утечку протонов в условиях покоя.

UCP1 преимущественно экспрессируется в богатой митохондриями BAT (именно поэтому ткань приобретает коричневый цвет), специализированной термогенной ткани. Эволюционно UCP1 представлен только у плацентарных млекопитающих как адаптация к эндотермии. У людей BAT наиболее распространен у младенцев, но также присутствует и у взрослых, особенно в областях шеи и почек. Интересно, что UCP1 был утрачен у крупных млекопитающих (например, китов, слонов), возможно, из-за гораздо меньшего соотношения поверхности к объему тела, и видов с низкой скоростью метаболизма (например, ленивцев). При рождении у человека общий вес BAT составляет около 150-250 г (2-5% от общего веса тела) и фактически исчезает в течение первых лет детства в относительном, но не абсолютном значении.

Примечательно, что в белой жировой ткани (WAT) и скелетных мышцах представлены гомологи UCP1 (UCP2 и UCP3), не имеющие значительной термогенной функции (возможно, они участвуют в защите от окислительного стресса, вызываемого АФК). Неплацентарные позвоночные (например, рыбы и птицы) обладают ортологами UCP1 без термогенной функции. Можно предположить, что изначальная роль UCP1 была связана не с выработкой тепла, а, по одной из версий, с переносом дикарбоновых кислот через митохондриальную мембрану.

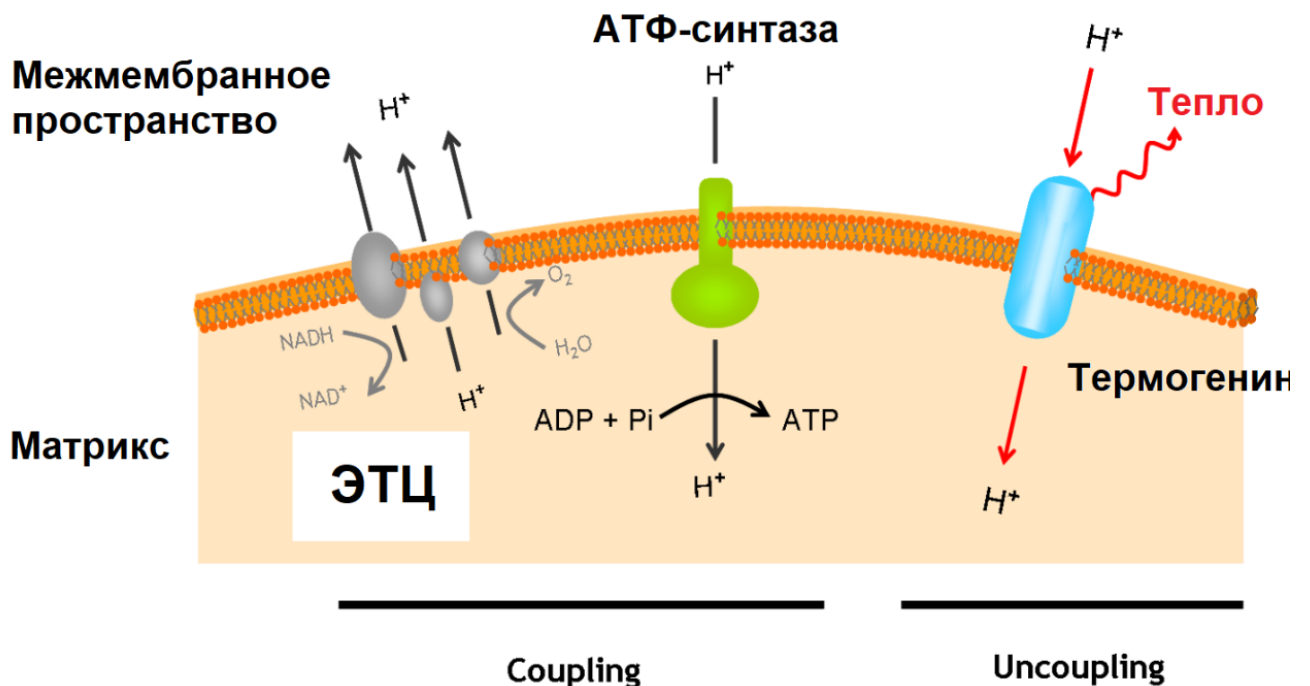


Рисунок 9. Схема работы белка термогенина в несократительном термогенезе.

### 1.3.2 Синтетические разобщители [13-19]

Первые синтетические разобщители, такие как 2,4-динитрофенол (DNP), были идентифицированы в 1930-х годах. DNP приобрел известность как лекарство от ожирения у животных и человека, хотя его побочные эффекты быстро ограничили его терапевтическое применение. DNP до сих пор продолжают применять в сфере фитнеса. Классическими разобщителями считаются также карбонилцианид м-хлорфенилгидразон (CCCP) и карбонилцианид п-трифторметоксифенилгидразон (FCCP), которые являются сильными протонифорами, широко используемыми в научных экспериментах. Эти молекулы имеют общий структурный мотив: диссоциирующую группу (например, фенольную -ОН или аминогруппу -NH), объемную гидрофобную часть (например, ароматические кольца) и сильные акцепторные заместители (например, нитро- или трифторметоксигруппы) (рисунок 10). Эта комбинация позволяет им переносить протоны напрямую через митохондриальную мембрану, чередуя протонированные и депротонированные состояния.

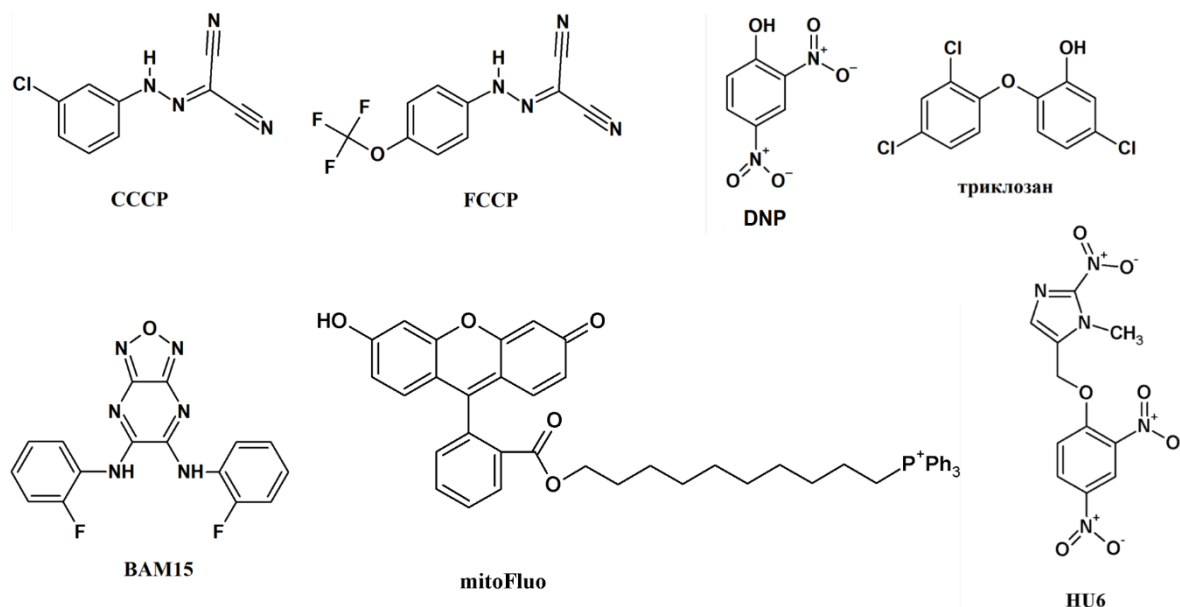


Рисунок 10. Структуры некоторых синтетических разобщителей.

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 встраивания в биологические мембраны. Так, для дополнительного «направления» какого-либо соединения (и разобщителя, в частности) в митохондрии, к нему «пришивают» различные липофильные катионы фосфора (трифенилфосфоний) или азота



(родамин, розамин, хиолин, берберин) (рисунок 11). Однако, часто такая модификация снижает разобщающую активность соединений [20-22].

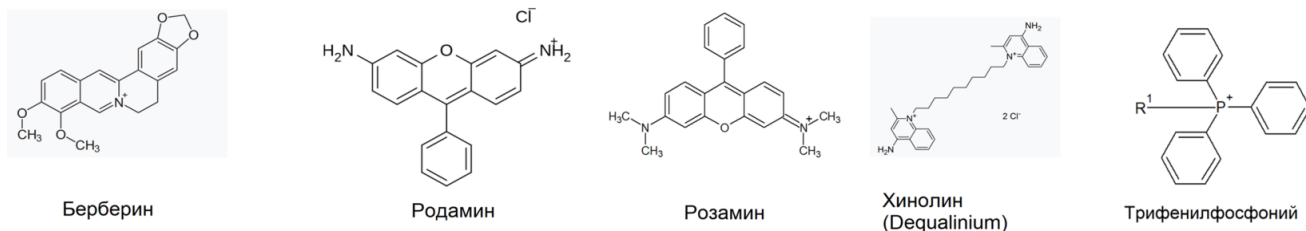


Рисунок 11. Примеры липофильных катионов митохондриально-направленных соединений.

Химическая структура синтетических разобщителей имеет решающее значение для их активности. Например, нитрогруппы DNP повышают кислотность его фенольного -ОН ( $pK_a \sim 4$ ), обеспечивая эффективную диссоциацию протонов в митохондриальном матриксе ( $pK_a$  незамещенного фенола – около 10). Аналогичным образом, трифторметоксигруппа FCCP стабилизирует депротонированный анион, посредством делокализации электронной плотности, в то время как его гидрофобный фенилгидразонный фрагмент обеспечивает мембранную проницаемость. Модификации этих структурных элементов, такие как замена нитрогрупп на менее электроноакцепторные заместители, значительно снижают разобщающую способность. Слабокислотные разобщители на основе салициланилида (например, никлозамид), также следуют этому принципу химического проектирования, используя свои ароматические кольца и сульфонамидные группы для некатализируемого транспорта протонов.

Точный механизм разобщения синтетическими соединениями до конца не изучен и, видимо, сильно зависит от структуры молекул. Детальный механизм разработан на примере СССР – протонофоре типа А- (рисунок 12). В межмембранном пространстве (низкий pH) разобщитель принимает протон, становясь нейтральным и липофильным, и диффундирует в митохондриальный матрикс (высокий pH). Там протон высвобождается, регенерируя анионную форму, которая затем возвращается в межмембранное пространство для повторения цикла. Этот циклический транспорт протонов не задействует АТФ-синтазу, разъединяя транспорт электронов и фосфорилирование.

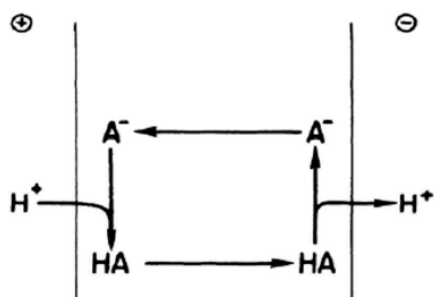


Рисунок 12. Схема работы протонофора: А – типа А<sup>-</sup> [23].

Важным допущением описанной модели является отсутствие учёта влияния белков. Долгое время было известно, что ингибитор АТФ-транслоказы – карбоксиатрактилозид (CATR) – частично подавляет разобщающую активность определенной группы разобщителей: жирных кислот, DNP, TTFB и других, но не СССР. Однако мы показали, что на изолированных митохондриях сердца (стандартный объект исследований – митохондрии печени) CATR влияет на действие практически всех разобщителей, за исключением эллиптицина и грамицидина А.

### 1.3.3 Терапевтические свойства разобщителей

Разобщители проявляют очень разнообразные терапевтические свойства против широкого спектра заболеваний, что подтверждается доклиническими и клиническими исследованиями. При раке митохондриальные разобщители, такие как 2,4-динитрофенол и карбонилцианид-р-трифторметоксифенилгидразон (FCCP), нарушают метаболические пути, критически важные для выживания опухоли [24]. Эти соединения снижают уровень АТФ, нарушая окислительное фосфорилирование, и дестабилизируют ключевые сигнальные пути, такие как AMPK/mTOR, что приводит к избирательной цитотоксичности для раковых клеток. Так, из-за повышенного уровня метаболизма опухоли, DNP показал эффективность в доклинических моделях, хотя его клиническое применение остается ограниченным из-за проблем с побочными эффектами. Аналогичным образом FCCP и другие синтетические разобщители вызывают митохондриальный стресс и апоптоз раковых клеток, при этом воздействуя на здоровые ткани в гораздо меньшей степени. Недавние исследования подчеркивают потенциал сочетания разобщителей с химиотерапией для преодоления лекарственной устойчивости, хотя необходимы дальнейшие исследования для повышения безопасности и селективности.

При нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезни Паркинсона и Альцгеймера, разобщители (например, никлозамид) продемонстрировали нейропротекторные эффекты, уменьшая окислительный стресс (подавляя выработку активных форм кислорода) за счет умеренного снижения митохондриального потенциала и тем самым сохраняя целостность нейронов.

Отдельно можно отметить антибактериальные свойства разобщителей. Так, широко применяемый в средствах личной гигиены антибактериальный агент 5-хлоро-2-(2,4-дихлорфеноксифенол (триклозан) характеризуется высокой протонофорной активностью [25]. Кроме того, повышенный практический интерес представляют гидрофобные производные родамина [26], [27] и митохондриально-направленное производное флуоресцеина mitoFluo [28]. Однако, антибактериальные свойства проявляют не только синтетические разобщители, но и природные соединения: пентадекапептид грамицидин А, пирроломицин и др.

При метаболических расстройствах, таких как ожирение, диабет 2 типа и неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), разобщители (DNP или BAM15) увеличивают расход энергии за счет рассеивания протонного градиента, тем самым увеличивая скорость окисления липидов и

уменьшая накопление жира. Например, BAM15 продемонстрировал значительное снижение содержания жира в печени и улучшение чувствительности к инсулину в моделях грызунов без неблагоприятного воздействия на мышечную массу или температуру тела [29], [30]. Клинические испытания с HU6 (5-[(2',4'-динитрофенокси)метил]-1-метил-2-нитроимидазол), тканеспецифичным печеночным пролекарством (высвобождающим DNP), показали многообещающие результаты в снижении жира в печени на 33% у пациентов с НАСГ, что подчеркивает потенциал тканеспецифичных разобщителей для смягчения системной токсичности. Кроме того, изучаются модифицированные разобщители, конъюгированные с гидрофобными алкильными заместителями (2,6-динитро-4-(октилокси)фенол и карбонилцианид-4-октилоксифенилгидразон): было показано их селективное накопление в жировой ткани, хотя они оказались нестабильны в организме крыс [31].

Разобщители также демонстрируют терапевтический потенциал при сердечно-сосудистых заболеваниях. Например, BAM15 снижает образование атеросклеротических бляшек в доклинических моделях, подавляя накопление липидов макрофагами, а также NF- $\kappa$ B и NLRP3 сигнальные пути. Исследования РНКома и связывания молекулярным докинггом показывают, что BAM15 взаимодействует с ключевыми белками IL-1 $\alpha$  и CSF3, модулируя воспаление и окислительный стресс в стенках артерий [30]. Такой многонаправленный механизм действия подчеркивает его потенциал как антиатеросклеротического агента.

При ишемически-реперфузионном повреждении разобщающие агенты, такие как BAM15, снижают повреждение тканей, значительно уменьшая образование активных форм кислорода (ROS) во время реперфузии. Доклинические исследования демонстрируют улучшение результатов реперфузионной терапии сердца, печени и почек разобщающими агентами, вероятно, за счет их способности уравнивать метаболические потребности и продукцию активных форм кислорода (ROS) [30], [32]. Нейро- и нефро-протекторное действие *in vivo* на модели травмы головного мозга и модели ишемии-реперфузии было показано для BAM15 и mitoFluo (конъюгат трифенилфосфония и флуоресцеина).

#### 1.4 Кумарины. Физико-химические и терапевтические свойства

Кумарины — это широкий класс ароматических органических соединений с  $\alpha$ -бензопионовым ядром в структуре: ароматичный лактон  $C_9H_6O_2$  (2H-хромен-2-он). Эти соединения широко распространены в растениях, особенно в семействе *Apiaceae* (*Umbelliferae*), и синтезируются посредством гидроксирования и лактонизации производных коричной кислоты [33]. Кумарины обычно представляют собой бесцветные или белые кристаллические вещества со сладким, ванильным запахом, низкой растворимостью в воде. Они проявляют видимую флуоресценцию при облучении ультрафиолетом, свойство, широко используемое в аналитических приложениях [33].

Умбеллиферон (7-гидроксикумарин; рисунок 12) — наиболее изученное природное производное кумарина с молекулярной формулой  $C_9H_6O_3$ , имеет гидроксильную группу в положении C7 бензопиринового кольца. Эти соединения широко распространены в растениях, особенно в семействе *Apiaceae* (*Umbelliferae*, отчего и получили своё тривиальное название), и синтезируются посредством гидроксирования и лактонизации производных коричной кислоты [33]. Это бесцветное кристаллическое вещество с температурой плавления 230–233 °C [34], [35]. Его растворимость в воде ограничена (~0,17 г/100 мл), но улучшается в полярных органических растворителях, таких как метанол или ДМСО.

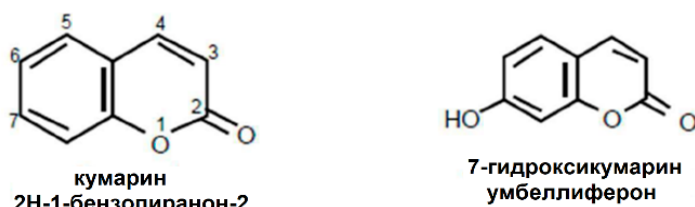


Рисунок 12. Структура кумарина и умбеллиферона.

Умбеллиферон проявляет выраженные флуоресцентные свойства, причём зависящие от pH среды, поэтому широко используется в роли флуоресцентного зонда [34], [36]. Поскольку умбеллиферон является производным бензопирона, его флуоресценция возникает из-за сопряженной  $\pi$ -электронной системы и присутствия 7-гидроксигруппы, которая подвергается pH-зависимому депротонированию. Так, в своей незаряженной форме в кислых условиях умбеллиферон проявляет слабую флуоресценцию из-за ограниченной делокализации электронов. Однако при более высоких значениях pH (выше его  $pK_a \sim 7$ ) депротонирование 7-гидроксигруппы генерирует фенолят-анион, который усиливает флуоресценцию через механизм внутримолекулярного переноса заряда (ICT). Это приводит к сильному сине-фиолетовому свечению под ультрафиолетовым светом, при этом максимумы длин волн возбуждения и

испускания флуоресценции находятся при ~375 нм и ~452 нм [37]. Это свойство широко используется в биохимических анализах, когда ферментативный гидролиз нефлуоресцирующих эфиров или гликозидов умбеллиферона высвобождает свободный флуорофор, что позволяет в реальном времени обнаруживать ферментативную активность. Примером может служить субстрат  $\beta$ -галактозидазы – 7-гидроксикумарин- $\beta$ -D-галактопиранозид [37].

Флуоресценцией умбеллиферона также можно управлять путём химической модификации его структуры. Например, производное CF-MU (6-хлор-8-фтор-умбеллиферон), демонстрирует более низкий  $pK_a$  и, как следствие, более сильную флуоресценцию при нейтральном pH, что выгодно для визуализации в биологических системах [[38]]. Кроме того, были разработаны зонды на основе умбеллиферона для селективного обнаружения перекиси водорода (через расщепление бороната) [37] и ионов палладия (через гидролиз эфирной связи) [39], используя восстановление флуоресценции в зависимости от pH. Способность молекулы действовать как сенсор еще больше подчеркивает ее универсальность, как показано в исследованиях, где флуоресценция смещается с 380 нм до 450 нм при взаимодействии с аналитами, такими как Pd(II) [39].

Известно, что производные умбеллиферона проявляют широкий спектр **терапевтических свойств**, которые сильно зависят от структурных модификаций кумаринового кольца [34].

Например, заметная **противовоспалительная** активность наблюдается для умбеллиферона, эскулетина, скополетина и фраксетина (ди- и тригидроксикумаринов), в которых соседние гидроксильные группы в положениях 6 и 7 обеспечивают хелатирование ионов металлов, удаление активных форм кислорода (ROS), а также играют важную роль в ингибировании провоспалительных киназ COX-2, ERK, JNK, NLRP3, Nrf2 (рисунок 13) [40]. Противовоспалительные свойства остеола, вероятнее всего, обусловлены ингибированием неселективного катионного канала TRPV3 [40]. Более сложное синтетическое производное 7-гидроксикумарина 9,10-дигидрохромено[8.7-е][1,3]оксазин-2(8H)-он [34], подавляя провоспалительные цитокины TNF- $\alpha$  и IL-6 в макрофагах, продемонстрировало мощное противовоспалительное действие. Эти соединения ингибируют сигнальные пути MAPK, TLR4 и NF- $\kappa$ B, которые играют ключевую роль в воспалительных процессах. Аналогичным образом 2-[(2-оксо-2H-хромен-7-ил)окси]ацетамиды, гибридизированные с замещенными анилиновыми или бензиламиновыми группами, снижают высвобождение цитокинов в клетках RAW264.7, что еще больше подчеркивает их потенциал в лечении хронических воспалительных состояний, таких как ревматоидный артрит [34].

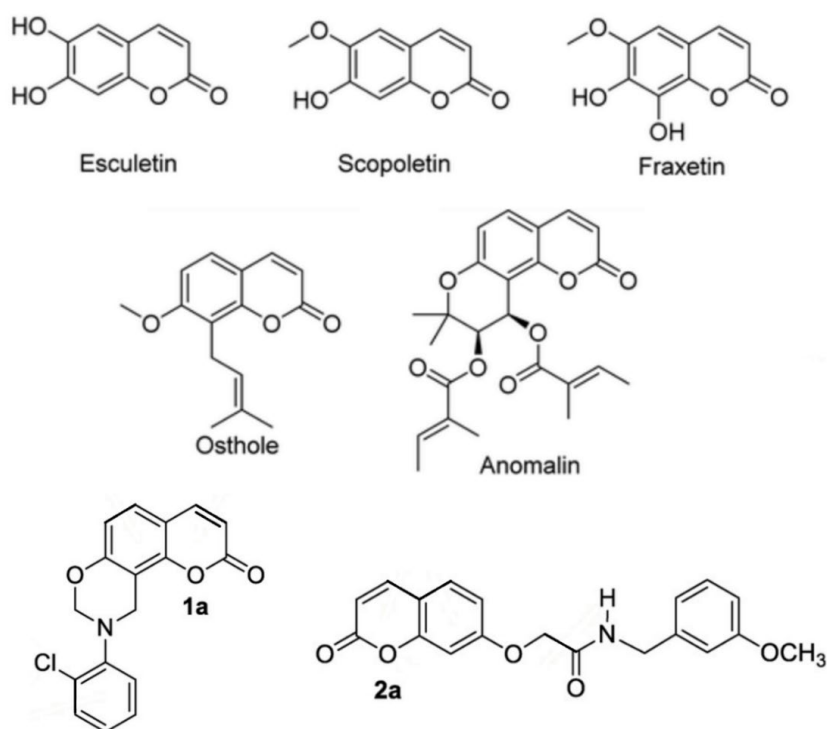


Рисунок 13. Структура производных кумарина с противовоспалительными свойствами.

В контексте **нейродегенеративных заболеваний** умбеллиферон, производные эскулетина и формил-умбеллиферон (рисунок 14) продемонстрировали нейропротекторные свойства путем ингибирования моноаминоксидазы А (MAO-A) и самоагрегации амилоида- $\beta$ , открывая путь к лечению болезни Альцгеймера. 7-гидроксикумариновые производные также смягчают окислительный стресс, ингибируя перекисное окисление липидов, и взаимодействуют с каскадом SIRT1/PPAR $\gamma$ , ингибируя активность NF- $\kappa$ B и уменьшая нейровоспаление. В моделях ревматоидного артрита умбеллиферон ингибирует тирозинкиназы на фибробластоподобных синовиоцитах, блокируя сигнализацию Wnt/ $\beta$ -катенина и способствуя апоптозу воспалительных клеток [41]. Другой описанный механизм нейропротекторных свойств умбеллиферона – ингибирование ацетилхолинэстеразы (AChE), бутирилхолинэстеразы (BuChE) и  $\beta$ -секретазы 1 (BACE1) – подвергается сомнению [34].

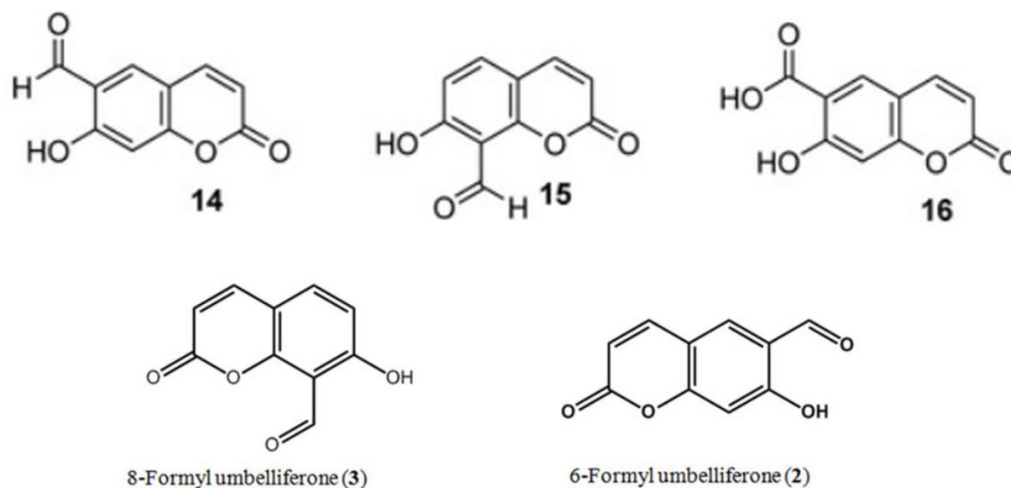


Рисунок 14. Структура производных кумарина с нейропротекторными свойствами.

Гидроксильная группа умбеллиферона позволяет ему отдавать протоны свободным радикалам, тем самым нейтрализуя их и предотвращая окислительное повреждение [34], [42]. Кроме того, умбеллиферон активирует сигнальный путь Nrf2, что приводит к повышению регуляции ряда эндогенных **антиоксидантных** ферментов, таких как супероксиддисмутаза (SOD), глутамат-цистеинлигаза (GCL) и  $\text{NAD(P)}^+$ -хинон оксидоредуктаза (NQO1). Другим примером являются 7-[(4-фенил-5-тиоксо-4,5-дигидро-1H-1,2,4-триазол-3-ил)метокси]кумарин и 5-{(кумарин-7-ил)окси}метил-1,3,4-тиадиазол-2(3H)-он: эфирный заместитель усиливает электронодонорные свойства кумаринового остова и увеличивает способность молекулы улавливать свободные радикалы. Кроме того, описываются свойства различных карбаматных производных кумарина: циклические заместители на азоте карбамата повышают, а метильная группа в четвёртом положении кумаринового остова, наоборот, уменьшает антиоксидантную активность (рисунок 15A) [34].

Умбеллиферон продемонстрировал эффективность в улучшении **чувствительности к инсулину** [34] путем активации фосфорилирования инсулинового рецептора и ферментов нижестоящих уровней, таких как IRS-1, PI3K, Akt. Кроме того, 7-гидроксикумарин облегчал диабетические осложнения, такие как кардиомиопатия, подавляя путь JAK2/STAT3 и диабетическую нефропатию, ингибируя ферроптоз через путь Nrf2/HO-1 (рисунок 15B).

Природный 6-формилумбеллиферон (соединение 14), выделенный из применяемого в традиционной китайской медицине *Angelica decursiva*, тоже проявлял антидиабетические свойства. Он ингибировал ферменты, критически важные для прогрессирования диабета, включая протеинтирозинфосфатазу 1B,  $\alpha$ -глюкозидазу и человеческую рекомбинантную альдозоредуктазу. Кроме того, он подавлял образование конечных продуктов гликирования



(AGE) и усиливал поглощение глюкозы в инсулинорезистентных мышечных клетках C2C12, что подчеркивает его потенциал для борьбы как с гипергликемией, так и с диабетическими осложнениями. Утверждается, что формильная группа в положении С6 кумаринового каркаса имела решающее значение для его активности [34].

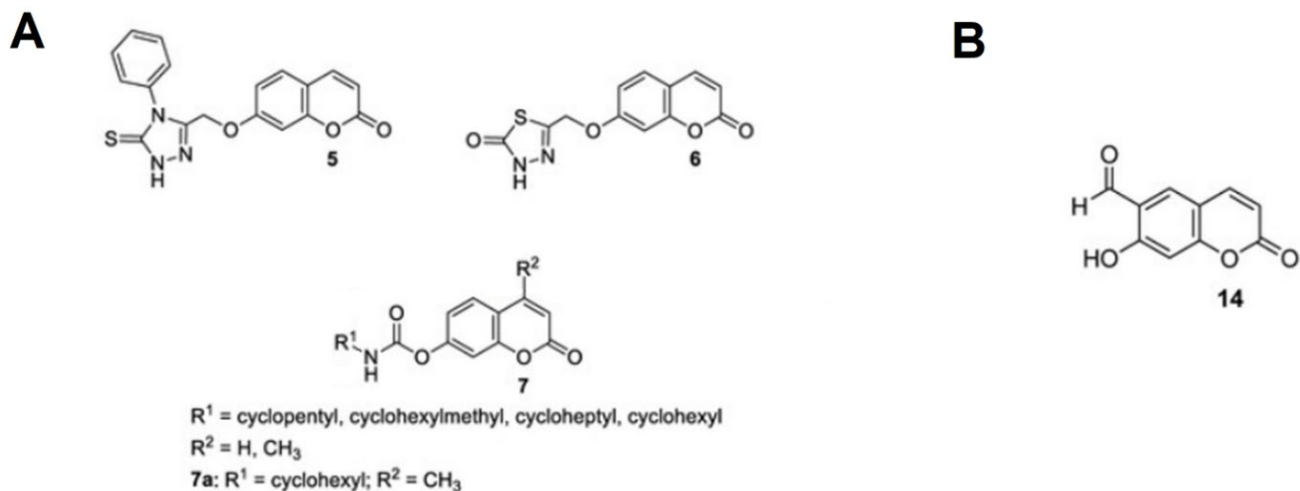


Рисунок 15. Структура производных кумарина с антиоксидантными (А) и антидиабетическими (В) свойствами.

**Противораковые** эффекты проявляет фраксетин (7,8-дигидрокси-6-метоксикумарин), оказывая ингибирующее действие на немелкоклеточный рак легких, рак молочной железы и остеосаркому посредством остановки клеточного цикла в фазе G1, индукции апоптоза и ингибирования дифференцировки макрофагов M2 [39], [43].

Кроме того, герниарин (7-метоксикумарин), синтезированный путем ферментативного метилирования умбеллиферона, проявляет повышенную антибактериальную и противораковую активность по сравнению с незамещенным умбеллифероном. В доклинических исследованиях герниарин продемонстрировал значительную селективную цитотоксичность для линий раковых клеток, но не нормальных фибробластов [44].

В статье [45] обсуждается серия О-пренилированных производных кумарина с заявленной противораковой активностью. 6-О-производные, такие как 6-изопентенилоксикумарин (6-IC), 6-геранилоксикумарин (6-GC) и 6-фарнезилоксикумарин (6-FC), продемонстрировали мощное токсическое действие на клетки рака шейки матки HeLa, индуцируя апоптоз и остановку клеточного цикла в G1. Природные 7- и 8-производные геранила и фарнезила (аураптен (7-GC), умбеллипренин (7-FC), 8-геранилоксикумарин (8-GC) и 8-фарнезилоксикумарин (8-FC)) показали умеренную активность, в то время как производные, замещенные по положениям 3, 4, 5 и 7 (за исключением 7-FC), показали ограниченную или нулевую цитотоксичность. Длинные гидрофобные заместители геранила (C10) и фарнезила (C15) в 6 положении значительно

улучшили липофильность производных кумарина и их клеточный захват, что коррелировало с более сильной апоптотической индукцией и остановкой G<sub>1</sub>-фазы.

Отдельно можно отметить ингибиторы гистондеацетилаз (HDAC) на основе 7-гидроксикумарина как универсальные противораковые средства. Авторы [46] провели большое структурное исследование конъюгатов умбеллиферона с 2-аминобензамидом или гидроксамовой кислотой через гидрофобный линкер, показав высокую активность и низкую цитотоксичность соединения 55. Аналогичное исследование выявило соединение 59 как самое активное производное кумарина с гидроксаматной группой [47], а соединение 65 – с коричной кислотой [48].

В целом, работ по антираковой активности самых разнообразных производных кумарина очень много. Некоторые эффективны только против одного типа рака (соединение 72 для молочной железы вследствие ингибирования сигнального пути PIK3/Akt), другие – более универсальны. В данном тексте акцент делается на наиболее простые соединения, в которых кумариновый остов является функции-определяющим, однако заместители очень сильно варьируют терапевтическую активность (рисунок 16).

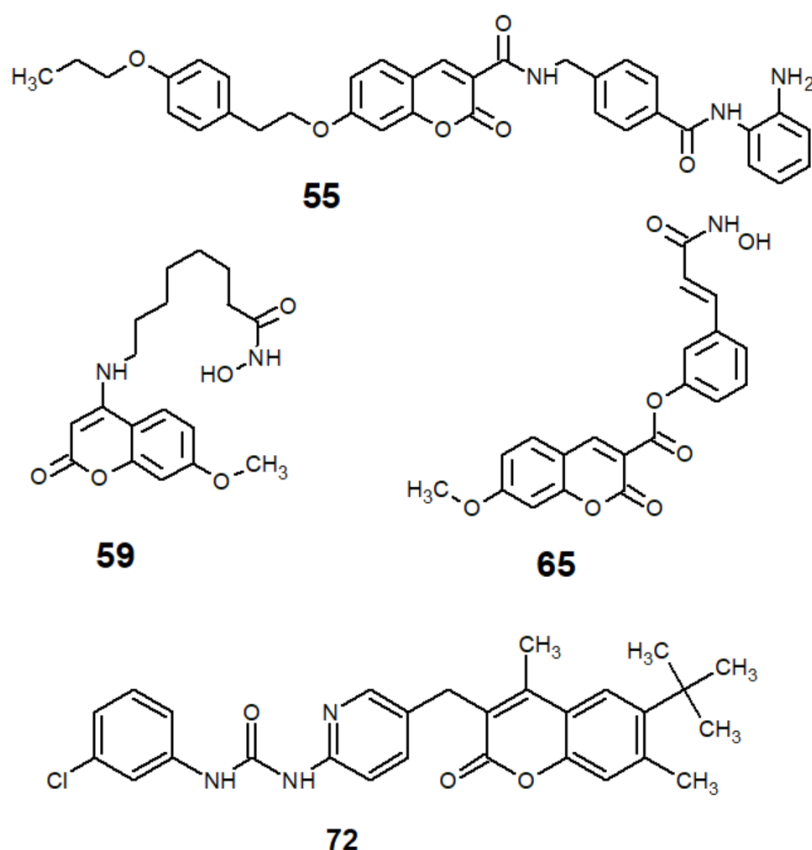


Рисунок 16. Структура производных кумарина с противораковыми свойствами.

Умбеллиферон (7-гидроксикумарин) сам по себе демонстрирует умеренную антибактериальную активность, особенно против *Bacillus cereus*, и подавляет образование

биофенок *Escherichia coli* и метициллин-резистентного *Staphylococcus epidermidis*. Примечательно, что он нарушает именно микробную адгезию, не влияя на рост бактерий, а также повышает восприимчивость к другим антибиотикам, что делает его потенциальным адъювантом [34]. Структурная оптимизация умбеллиферона привела к производным с повышенной эффективностью. Например, 8-замещенные 7-гидроксикумарины (27, 28) значительно активнее против *E. coli*, *S. aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* и штаммов грибов, таких как *Aspergillus niger* и *Candida albicans*.

7-О-ацилированные производные, такие как эфиры 30 и 31, проявляют широкий спектр активности против грамположительных бактерий (например, *B. subtilis*, *S. pyogenes*) и грибов (например, *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*). Эфирная связь и гидроксильные группы, вероятно, улучшают растворимость и проникновение в мембрану, в то время как гидрофобные цепи нарушают целостность мембраны. Длинноцепочечные жирнокислотные эфиры (например, 32, 33) дополнительно усиливают активность против метициллин-резистентного *S. aureus* (MRSA) и *Klebsiella pneumoniae*, нарушая липидные бислои. Отдельно можно отметить более сложные гибриды кумарина с триазолом (34а, 35–38), имидазолом (40) (рисунок 17) [34].

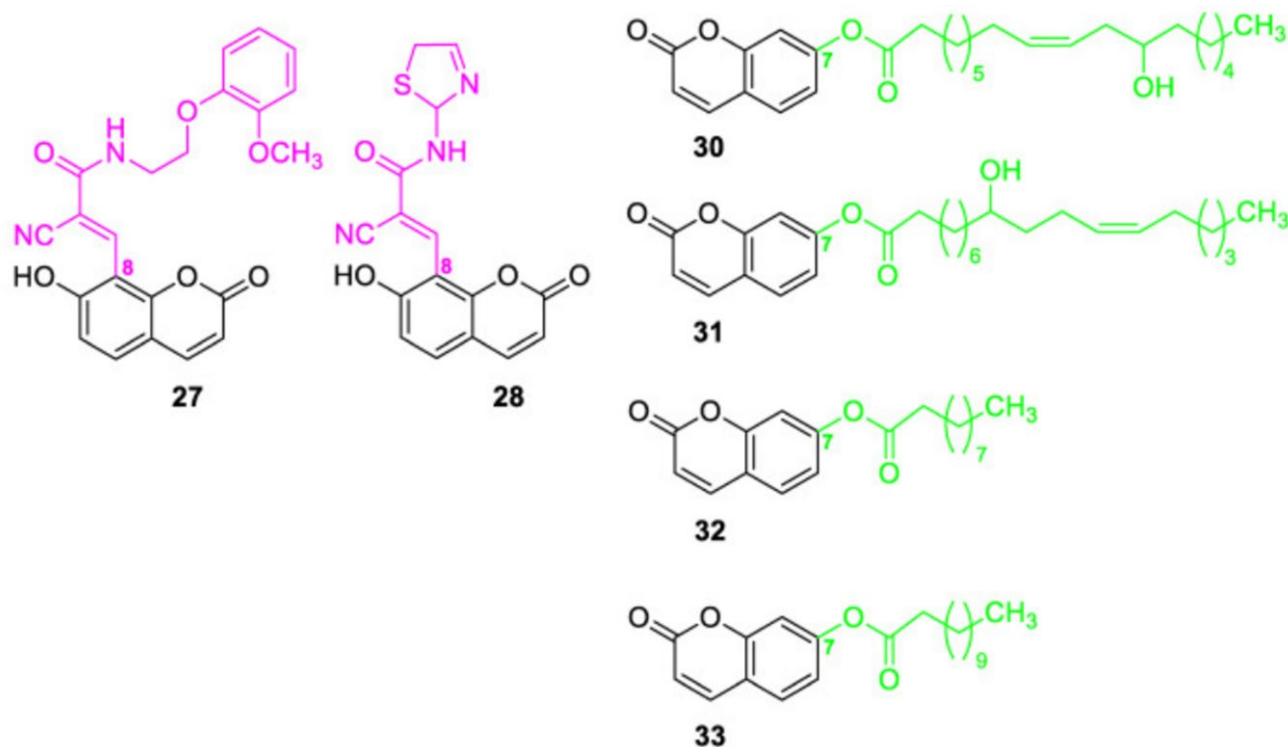


Рисунок 17. Структура производных кумарина с антибактериальными свойствами.

Кумарин-триазольный гибрид 51 ингибирует рост *Mycobacterium tuberculosis*, воздействуя на декаprenилфосфорил- $\beta$ -D-рибоза-2'-эпимеразу (DprE1), ключевой фермент в биосинтезе клеточной стенки. Триазольный и кумариновый фрагменты совместно блокируют активный сайт фермента, что приводит к повышенной эффективности, даже по сравнению с

противотуберкулезным препаратом первой линии — пипразинамидом. Противомаларийный гибрид 52b включает сульфонамидную или триазольную группу, и демонстрирует сильную активность против *Plasmodium falciparum* (рисунок 18) [34].

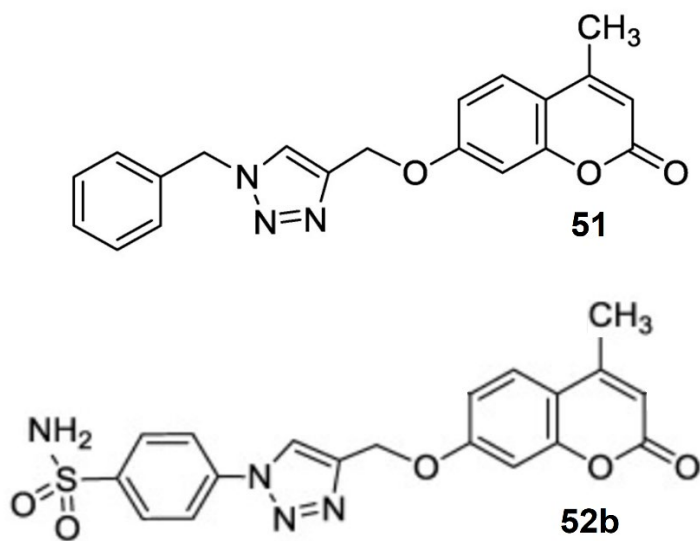


Рисунок 18. Структура производных кумарина с противотуберкулёзными свойствами.

## 1.5 Клеточные эстеразы

Ферменты, способные гидролизовать эфирные связи, можно разделить на четыре группы по соотношению их основной биологической роли и функции эстераз [49-51].

### 1. Ферменты, изначально вовлеченные в выведение ксенобиотиков

Эти ферменты в первую очередь предназначены для детоксикации ксенобиотиков посредством гидролиза эфирных связей. Карбоксилэстеразы (**CES**), члены суперсемейства сериновых гидролаз, разрушают органические сложные эфиры до исходных кислоты и спирта с широкой субстратной специфичностью [52]. Они имеют  $\alpha/\beta$ -гидролазную складку наряду с каталитической триадой (Ser-His-Glu/Asp) и консервативной оксианионной дыркой (для стабилизации отрицательного заряда переходного состояния на депротонированном кислороде). Ферменты CES локализуются в эндоплазматическом ретикулуме и цитоплазме, где преобразуют липофильные эфиры в гидрофильные метаболиты для выведения. Есть данные об активности CES и в митохондриальной фракции [53], [54]. CES1 и CES2, основные изоформы у человека, гидролизуют препараты, содержащие сложноэфирную связь (например, клопидогрел, иринотекан), и токсичные вещества окружающей среды. Более подробно этот класс ферментов будет описан далее.

Параоксоназы (**PON**) PON1 и PON3, в первую очередь участвующие в метаболизме липидов и антиоксидантной защите, гидролизуют не только окисленные фосфолипиды (органофосфаты), но и сложные эфиры (в том числе и тиоэфиры). PON обладают шестилопастной  $\beta$ -пропеллерной структурой с активным центром, расположенным в центральной полости. Так, ион кальция в структуре, координируемый остатками глутамата и аспартата, стабилизирует субстрат во время нуклеофильной атаки молекулой воды. Их эстеразная активность распространяется на такие препараты, как пилокарпин [55].

### 2. Эстеразы, участвующие в метаболизме и/или биоактивации/выведении лекарств

Эти ферменты, наряду с выполнением своих основных метаболических функций, обладают способностью катализировать гидролиз сложноэфирных связей, благодаря чему также участвуют в активации или детоксикации лекарств.

Благодаря липазной активности, арилацетамиддеацетилаза (**AADAC**) участвует в гидролизе холестерина и триглицеридов, мобилизации липидов и сборке липопротеинов. Основная терапевтическая роль AADAC заключается в деацетилировании пролекарств арилацетамида (например, рифампицина), а также гидролизе эфирных связей в таких соединениях, как флутамид и фенацетин. Её активный центр благодаря структурной гибкости

вмещает самые разнообразные субстраты, что делает его ключевым игроком в метаболизме лекарств.

Ацетилхолинэстераза (**AChE**), необходимая для прекращения синаптической передачи, гидролизует нейротрансмиттер ацетилхолин. Ее активный центр находится в основании глубокого ароматического ущелья, выстланного остатками, которые направляют субстрат к каталитической триаде (Ser-His-Glu). Серин атакует углерод эфирной связи, высвобождая холин, и после гидролиза промежуточного продукта восстанавливает активный фермент [56]. Бутирилхолинэстераза (**BChE**), структурно связанная с ацетилхолинэстеразой (но способная гидролизовать синтетический бутирилхолин благодаря структурной гибкости), гидролизует эфиры, такие как кокаин и сукцинилхолин, через ту же триаду Ser-His-Glu, способствуя их детоксикации.

**Кутиназы**, вырабатываемые грибами и бактериями, гидролизуют кутин, растительный полиэфир. В отличие от липаз, кутиназы не имеют домена крышки и активны по отношению как растворимых, так и нерастворимых эфиров. Их каталитическая триада (Ser-His-Asp) обеспечивает прямой доступ к субстрату, а механизм гидролиза аналогичен. Кутиназы демонстрируют высокую термическую стабильность, благодаря очень компактному  $\alpha/\beta$ -ядру и дисульфидным связям [57].

**Холестеринэстераза** гидролизует эфиры холестерина, способствуя их всасыванию в кишечнике. Она использует каталитическую триаду, похожую на триаду карбоксилэстераз, но включает уникальный домен связывания желчных солей. Структура фермента характеризуется большим гидрофобным карманом для размещения стериновых субстратов, с сериновым нуклеофилом для атаки на сложноэфирную связь.

Сиалат 9-О-ацетилэстераза (**SIAE**) удаляет ацетильные группы из сиаловых кислот в гликопротеинах, но может гидролизовать эфирные препараты, такие как алацеприл.

### 3. Ферменты с неэстеразными первичными функциями, но побочной способностью гидролизовать эфиры

Эти ферменты в первую очередь катализируют неэстеразные реакции, но могут гидролизовать эфирные связи в качестве вторичной функции. Примером этой группы являются сериновые **протеазы** суперсемейства  $\alpha/\beta$ -гидролаз, такие как химотрипсин, гидролизующие пептидные связи в белках [58]. Механизм гидролиза сложных эфиров сериновыми протеазами аналогичен расщеплению пептидных связей: гистидин (например, His57 в химотрипсине) действует как общее основание, отрывая протон от серина для повышения его нуклеофильности, в то время как аспарагиновая кислота (например, Asp102) стабилизирует протонированный гистидин. Серины каталитической триады (например, Ser195 в химотрипсине) инициирует

реакцию, атакуя карбонильный углерод эфирной связи и образуя тетраэдрический оксианион, стабилизированный водородными связями в «оксианионной дырке» фермента (состоящей из амидных групп основной цепи, например, Gly193 и Ser195 в химотрипсине). Этот шаг приводит к образованию ацил-ферментного промежуточного соединения, где эфирная группа субстрата ковалентно связана с серином. В последующей фазе деацилирования молекула воды гидролизует промежуточный ацил-фермент, регенерируя свободный фермент и высвобождая спирт и карбоновую кислоту. Этот механизм сохраняется во всех сериновых протеазах, включая трипсин и эластазу, которые имеют схожую каталитическую триаду и субстрат-связывающие карманы, адаптированные к различным пептидным субстратам.

**Ромбовидные протеазы**, класс внутримембранных сериновых протеаз, гидролизуют эфирные связи в синтетических субстратах, хотя их основная роль заключается в расщеплении трансмембранных белков. Эти ферменты используют каталитическую диаду серин-гистидин в гидрофобном мембрано-встроенном активном центре, иллюстрируя адаптацию механизма для функционирования в липидных бислоях [59].

**Липазы** играют решающую роль в переваривании пищевых липидов, тоже имеют  $\alpha/\beta$ -гидролазную складку, но часто имеют домен переменной «крышки», которая закрывает гидрофобный активный сайт в водной среде. На границе липид-вода крышка претерпевает конформационные изменения, обнажая активный сайт — явление, называемое интерфейсной активацией. Эта структурная адаптация позволяет липазам гидролизовать нерастворимые в воде субстраты, такие как триглицериды. Каталитический механизм аналогичен механизму карбоксилэстераз, в которых серин инициирует нуклеофильную атаку [60].

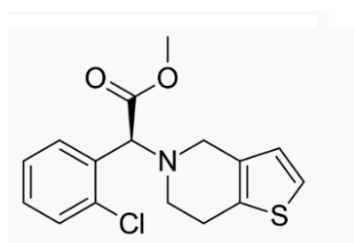
**Фосфолипаза A2 (PLA2)**, кальций-зависимый фермент, гидролизующий эфирную связь в положении sn-2 фосфолипидов. Его каталитический механизм отличается от сериновых гидролаз: каталитическая диада гистидина-аспартата, координирована с ионом кальция. Кальций поляризует карбонильный кислород эфирной связи, облегчая нуклеофильную атаку молекулой воды, активированной гистидином. Это приводит к образованию тетраэдрического промежуточного соединения, которое разрушается, высвобождая лизофосфолипид и жирную кислоту. Структура PLA2 включает гидрофобный канал для связывания субстрата и консервативную петлю связывания кальция [61]. Другой пример фосфолипаз — ацетилгидролаза фактора активации тромбоцитов (**PAFAN**), которая разрушает фактор активации тромбоцитов, но также гидролизует эфирные связи в аспирине, способствуя его противовоспалительному эффекту, а также разнообразные липидоподобные структуры.

**АПЕН** (ацилпептидгидролаза), чей активный центр вмещает как пептидные, так и эфирные субстраты, расщепляет терминальные N-ацетилированные пептиды, но также гидролизует эфирные связи в ацилглюкурониде вальпроевой кислоты.

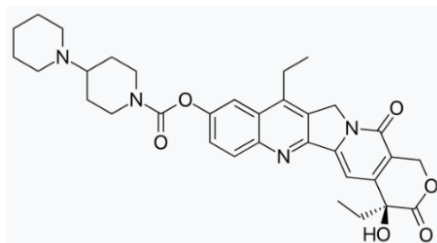
Альдегиддегидрогеназы (**ALDH**), такие как альдегиддегидрогеназа 2 ALDH2, в первую очередь окисляют альдегиды до карбоновых кислот, но проявляют эстеразную активность благодаря наличию консервативной каталитической триады (Cys-Glu-Asn). Эта вторичная функция не зависит от NAD(P)<sup>+</sup> и включает нуклеофильную атаку цистеина на карбонил эфирной связи. Более подробно этот класс ферментов будет описан далее.

4. Белки с неясными первичными функциями, но доказанной эстеразной активностью в метаболизме лекарств

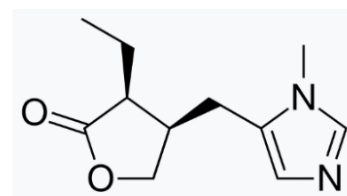
Эти белки не имеют четко определенных биологических ролей, но участвуют в биоактивации лекарств посредством гидролиза эфира. Так, гомолог карбоксиметиленбутиенолидазы (**CMBL**) эффективно гидролизует эфирные пролекарства (например, предшественника олмесартана медоксомила) с использованием диады серин-гистидин. Его субстратная специфичность напоминает карбоксилэстеразы, однако его физиологическая роль остается неясной. Бифенилгидролазоподобный белок (**BPHL**), в первую очередь пептидаза, метаболизирует эфирные пролекарства, такие как валацикловир, имея  $\alpha/\beta$ -гидролазную складку и каталитический остаток серина, хотя его эндогенные субстраты не идентифицированы.



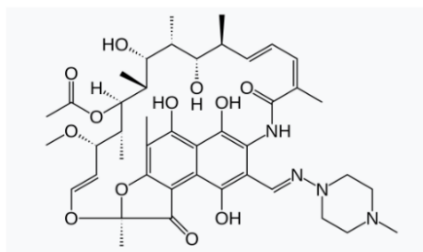
**Клопидогрел**



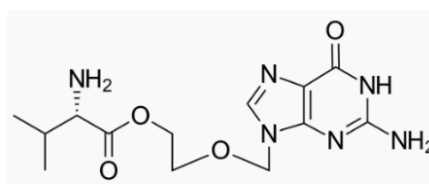
**Иринотекан**



**Пилокарпин**



**Рифампицин**



**Валацикловир**

*Рисунок 19. Некоторые эстеразо-чувствительные препараты.*



### 1.5.1 Альдегиддегидрогеназы

Суперсеме́йство альдегиддегидрогеназ включает в себя  $\text{NAD(P)}^+$ -зависимые ферменты, играющие решающую роль в окислении эндогенных и экзогенных альдегидов до карбоновых кислот. Ферменты ALDH участвуют в метаболизме алкоголя (рисунок 20), синтезе ретиноевой кислоты и защите от окислительного стресса путем нейтрализации образующихся во время перекисного окисления липидов альдегидов, таких как 4-гидроксиноненаль (4-HNE) и малоновый диальдегид (MDA) [62], [63]. Так, ALDH2 — митохондриальная изоформа фермента, ответственная за детоксикацию ацетальдегида в метаболизме этанола, предотвращает накопление токсичных веществ, связанных с такими состояниями, как фетальный алкогольный синдром и алкогольный абстинентный синдром [64]. Изоформы ALDH1, в частности ALDH1A1-1A3, необходимы для биосинтеза ретиноевой кислоты, влияя на эмбриональное развитие, дифференциацию стволовых клеток и прогрессирование рака [63], [64]. Кроме того, альдегиддегидрогеназы могут проявлять неферментативные функции, такие как защита от УФ-излучения в тканях глаза (ALDH3A1) и осморегуляция (ALDH7A1) [62], [64].

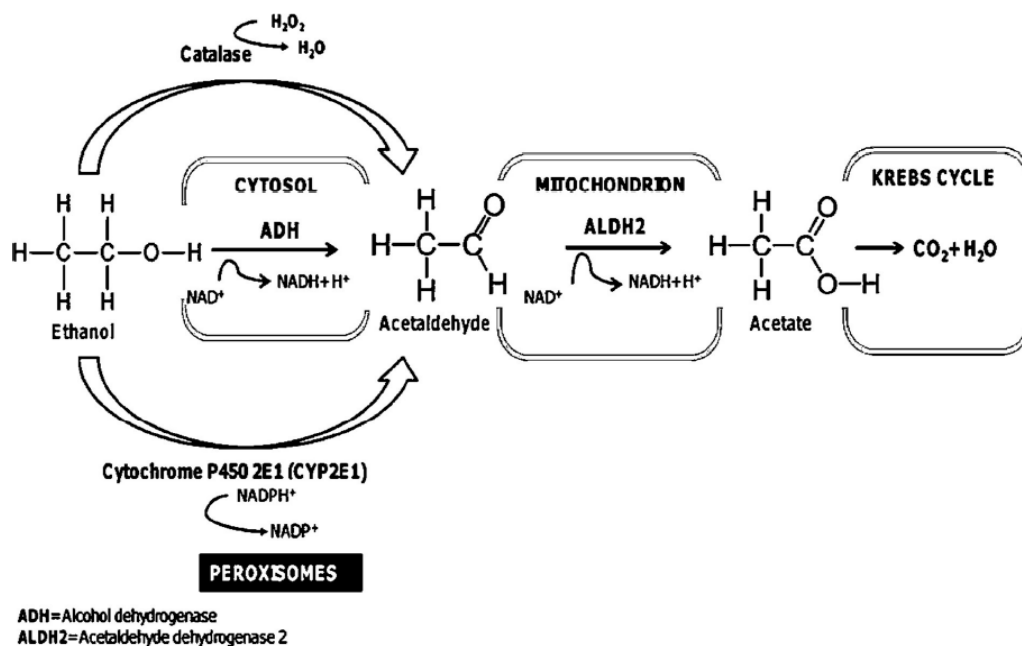


Рисунок 20. Метаболизм этанола в клетке.

Изоформы ALDH1 преимущественно цитозольные и проявляют тканеспецифичную экспрессию. Так, ALDH1A1 представлена в клетках печени, двенадцатиперстной кишки и стволовых клетках, где служит маркером раковых стволовых клеток при злокачественных новообразованиях, таких как рак молочной железы [63], [64]. ALDH1A2 выделяется в яйцках и эндометрии, в то время как ALDH1A3 локализуется в предстательной железе, мочевом пузыре,

способствуя, кроме того, передаче сигналов ретиноевой кислоты в опухолях [63]. Исследования на мышах и людях подтверждают консервативное тканевое распределение, при этом митохондриальная ALDH2 обнаружена в печени, легких и желудочно-кишечном тракте, что подчеркивает её роль в системной альдегидной детоксикации [62], [65]. Изоформы ALDH3, такие как ALDH3A1, экспрессируются в желудке, роговице и коже, где они защищают от окислительного повреждения и УФ-излучения [62], [63].

ALDH2, митохондриальный фермент, представляет собой тетрамерный белок, каждая субъединица которого содержит три домена: домен связывания NAD(P)<sup>+</sup>, каталитический домен и домен олигомеризации. Его активный сайт характеризуется консервативной каталитической триадой, включающей Cys302, Glu268 и Asn169 (для человеческой изоформы), которые имеют решающее значение для активности как дегидрогеназы, так и эстеразы. Механизм ферментативного окисления (рисунок 21) включает нуклеофильную атаку Cys302 на альдегидный субстрат с образованием промежуточного тиогемиацетала, в то время как Asn169 стабилизирует переходное состояние оксианиона во время нуклеофильной атаки. Он окисляется до тиоэфира, а тот же Cys302 действует как нуклеофил, атакуя карбоксильный углерод эфира с образованием промежуточного ацилфермента. Затем Glu268 в ALDH2 активирует молекулу воды для гидролиза промежуточного ацил-фермента до карбоновой кислоты и спирта. Примечательно, что эстеразная активность ALDH2 не требует NAD(P)<sup>+</sup>, что отличает ее от основной функции дегидрогеназы [62]. Другие члены семейства ALDH1A1 и ALDH3A1 также проявляют эстеразную активность, хотя и с различными предпочтениями в отношении субстрата. Например, узкий канал ALDH2 благоприятствует небольшим альдегидам, таким как ацетальдегид, в то время как более широкий канал ALDH1A1 вмещает более крупные субстраты, такие как ретинальдегид. Гидрофобность и электростатические свойства этих каналов дополнительно модулируют эффективность гидролиза соединений со сложноэфирной связью [66], [67].

Хотя функция ALDH2 сохраняется у разных видов, между крысиным и человеческим ALDH2 белком существуют небольшие структурные различия. У крыс есть два аллеля ALDH2 (ALDH2R и ALDH2Q), но полиморфизмы в этих аллелях не коррелируют с поведенческими различиями в потреблении алкоголя или накоплении ацетальдегида, в отличие от людей [68]. Вариант человеческого ALDH2\*2 (Glu487Lys), распространенный в популяциях Восточной Азии, снижает ферментативную активность примерно на 60–80% у гетерозигот, что приводит к высокой токсичности ацетальдегида и непереносимости алкоголя у этих людей [69]. Такая мутация отсутствует у крыс, и исследования мышей с делецией ALDH2 подчеркивают

расходящиеся регуляторные механизмы: дефицит ALDH2 у мышей повышает регуляцию CYP2E1, фермента, метаболизирующего этанол посредством реакции, не наблюдаемой у людей [65], [68]. Структурный анализ также выявляет тонкие различия между видами в связывании кофакторов в субстратных каналах, влияющие на каталитическую эффективность [66], [70].

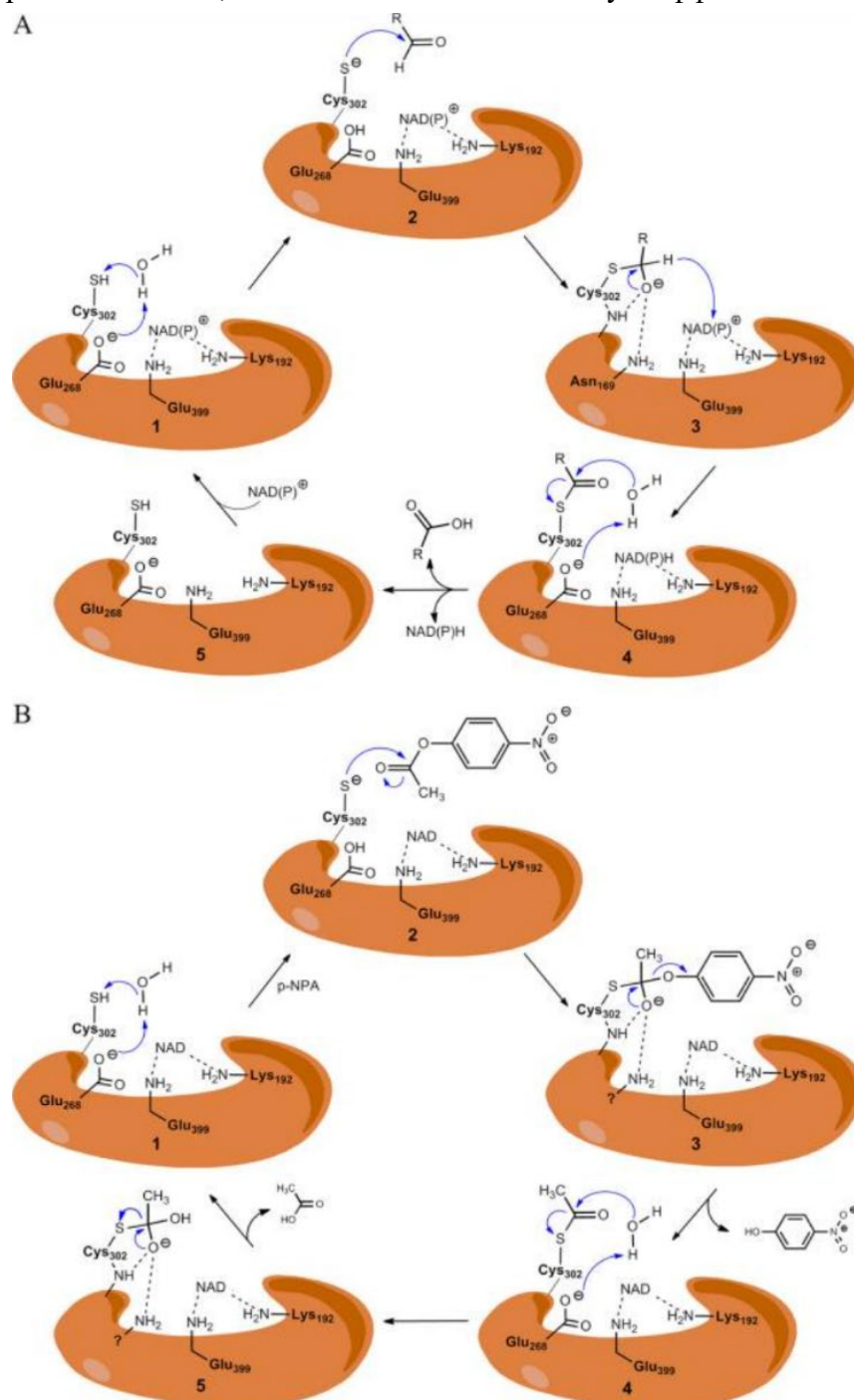


Рисунок 21. [64] А, механизм окисления альдегидов белком ALDH2. 1, активация каталитического Cys302 упорядоченной молекулой воды и депротонирование Glu268. 2, нуклеофильная атака на карбонильный углерод альдегида тиолатной группой каталитического Cys302. 3, образование тетраэдрического тиогемиацетального интермедиата (деацилирование) и перенос гидрида к пиридиновому кольцу NAD<sup>+</sup>. 4, гидролиз полученного тиоэфирного интермедиата. 5, диссоциация восстановленного кофактора NADH и последующая регенерация фермента путем связывания NAD<sup>+</sup>. В, предполагаемый аналогичный механизм гидролиза сложных эфиров белком ALDH2.

### 1.5.2 Структура ингибиторов ALDH2 и их терапевтические свойства

Ингибиторы альдегиддегидрогеназы 2 (ALDH2) имеют решающее значение для модуляции метаболизма ацетальдегида и применяются в терапии алкогольной зависимости, рака и нейродегенеративных заболеваний.

Дисульфирам (DSF) — хорошо известный бисдитиокарбаматный необратимый ингибитор ALDH2, используемый для вызывания отвращения к алкоголю. Он функционирует путем карбамоилирования каталитического остатка цистеина (Cys302) в ALDH2, что приводит к необратимой инактивации фермента. Модификация ALDH2 приводит к накоплению ацетальдегида при употреблении этилового спирта, вызывая неблагоприятные физиологические эффекты. Метаболиты дисульфирама, такие как S-метил-N,N-диэтилтиокарбамоилсульфоксид (MeDTC-SO), также способствуют ингибированию ALDH2 путем ковалентной модификации активного сайта [64], [71].

Дайдзин, природный изофлавоон, обратимо ингибирует ALDH2 с высокой селективностью в наномолярном диапазоне. Благодаря 7-гидроксиизофлавоновому ядру с глюкозным фрагментом, который повышает растворимость и целевое сродство, он конкурентно связывается в субстратном туннеле ALDH2, что подтверждено кристаллографическими исследованиями [64], [72], [73].

Синтетический аналог дайдзина, CVT-10216, проявляет более сильное обратимое ингибирование ( $IC_{50} \approx 0,029$  мкМ) с улучшенной аффинностью и фармакокинетикой, благодаря, в том числе, замене метоксигруппы в изофлавоновом каркасе [64], [73]. Другое синтетическое производное изофлавона ChEMBL114083 также демонстрирует исключительную эффективность с улучшенной метаболической стабильностью [73].

Ингибиторы класса Aldi (например, Aldi-2) после гидролиза альдегиддегидрогеназами превращаются в высокоактивный венилкетон, который ковалентно модифицирует Cys302 подобно дисульфираму. Ингибиторы Aldi исследуются на предмет их потенциала в воздействии на раковые стволовые клетки с высокой активностью ALDH2 [74], [75].

### 1.5.3 Ингибиторы ALDH2 на основе кумарина и умбеллиферона

В литературе есть несколько примеров производных кумарина, особенно 7-гидроксикумарина (умбеллиферона), как селективных ингибиторов ALDH2 [72]. Так, соединение 36 (1) включает кумариновое ядро (2H-хромен-2-он), замещенное бромидной и оксимвой группами для взаимодействия (посредством гидрофобных взаимодействий и водородных связей) с субстрат-связывающим карманом фермента. Другой пример — производное

псоралена соединение 2, как ингибитор всех изоформ ALDH. Структурный анализ показывает, что его лактонная группа, мимикрируя под альдегидную, взаимодействует с каталитическим цистеином, а фуранокумариновое ядро благодаря стэкингу удерживается четырьмя остатками фенилаланина. В данном исследовании проведена огромная работа по модификации псораленового и кумаринового остова для улучшения селективности и ингибиторной активности. Соединение 32 оказалось более селективно к ALDH1A1, что говорит об универсальности кумаринового каркаса [34], [72].

Ингибиторы ALDH2 (рисунок 22) стали перспективными терапевтическими средствами для различных патологий. Дисульфирам, неселективный ингибитор ALDH, клинически используется для лечения алкоголизма, индуцируя накопление ацетальдегида и вызывая отвращение к алкоголю [64], [76]. Недавние работы изучают селективные ингибиторы ALDH2 для терапии рака, поскольку сверхэкспрессия ALDH2 в раковых стволовых клетках способствует химиорезистентности и рецидиву опухоли [63], [70]. Например, было показано, что АТФ ингибирует ALDH1A3 в физиологических концентрациях, что предполагает метаболическую регуляцию активности ALDH в раковых клетках [70]. При нейродегенеративных заболеваниях ингибирование ALDH2 усугубляет накопление нейротоксичного альдегида, полученного из дофамина, что подразумевает его роль в патологии Паркинсона [62]. Наоборот, активаторы ALDH2, такие как Alda-1, исправляют структурные дефекты в варианте ALDH2\*2, смягчая болевую чувствительность в моделях грызунов и указывая на возможный путь неопиоидной анальгезии [62], [69]. В метаболизме костной ткани ингибирование ALDH2 с помощью дисульфирама нарушает функцию остеобластов, связывая активность ALDH2 с риском остеопороза [76].

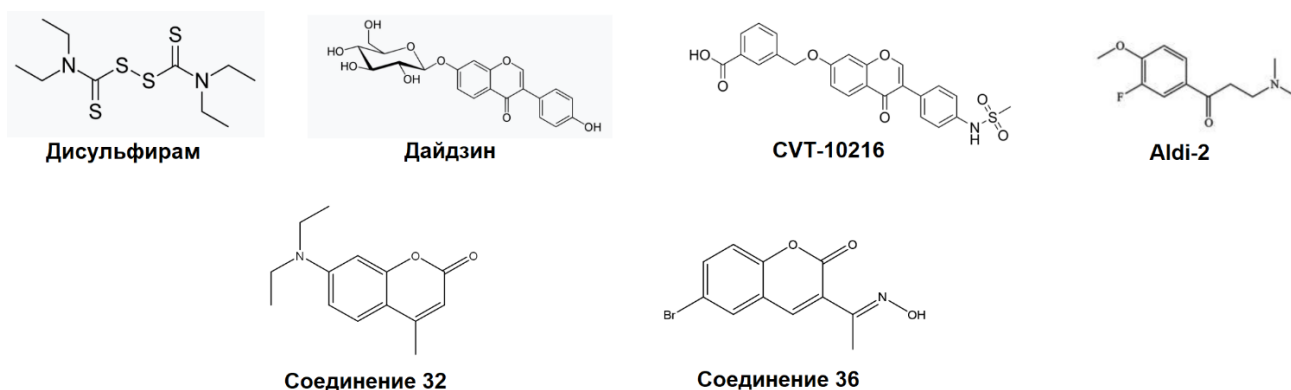


Рисунок 22. Структура ингибиторов ALDH2

### 1.5.4 Карбоксилэстеразы

Карбоксилэстеразы (CES) – это семейство сериновых гидролаз, катализирующих разрушение эфирных, амидных, тиоэфирных и карбаматных связей в эндогенных и экзогенных соединениях: они играют важную роль в метаболизме липидов, детоксикации и преобразовании ксенобиотиков [52], [77], [78]. CES катализируют гидролиз посредством двухэтапного механизма, общего для сериновых гидролаз (рисунок 23): на первом этапе — нуклеофильная атака остатка серина на карбонильный углерод субстрата с высвобождением спиртового продукта и образованием промежуточного ацилфермента. Затем – деацилирование: молекула воды его гидролизует, восстанавливая свободный фермент и высвобождая карбоновую кислоту [52], [79].

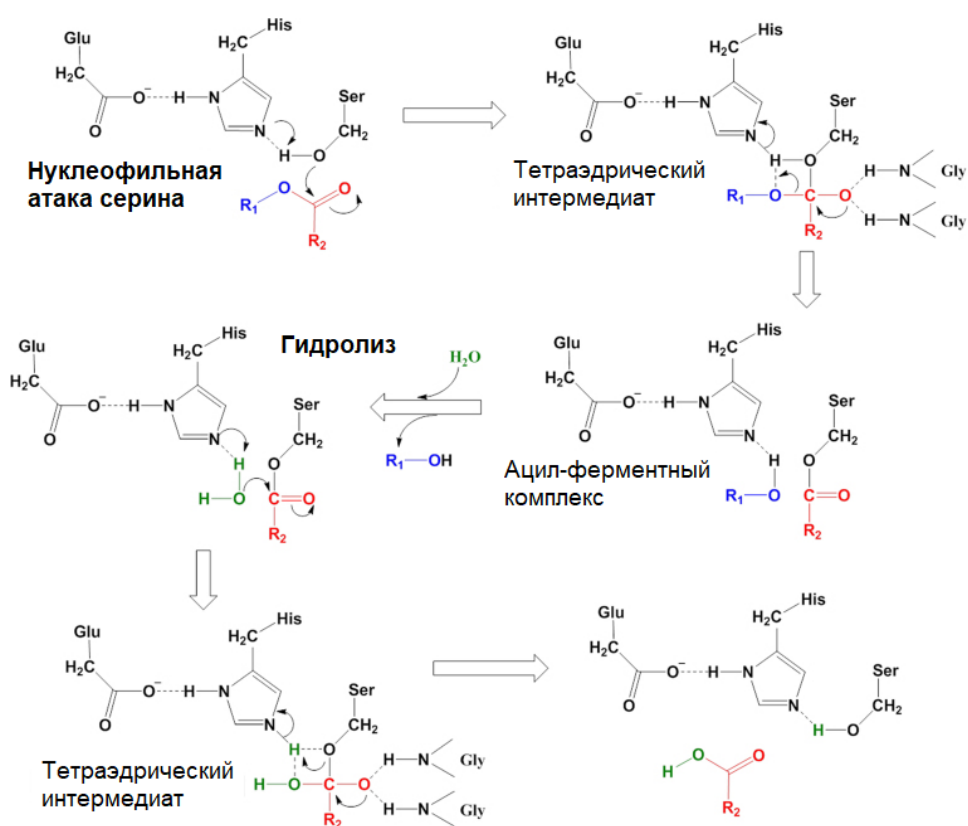


Рисунок 23. Двухстадийный механизм каталитического гидролиза сложных эфиров карбоксилэстеразами [52]

У людей есть шесть генов CES: CES1, CES2, CES3, CES4A, CES5A и CES1P1 (псевдоген), причем CES1 и CES2 являются наиболее изученными изоформами. Эти ферменты демонстрируют различные внутриклеточные и тканевые распределения, структурные особенности и каталитические механизмы, которые отличаются от их мышечных аналогов.

Человеческие ферменты CES в основном локализируются в просвете эндоплазматического ретикулума (ЭПР) из-за своих С-концевых мотивов HXEL (например, HIEL для CES1 и HTEL

для CES2), которые действуют как сигналы удержания ЭПР [52], [80]. Их распределение в тканях сильно варьирует.

CES1 преимущественно экспрессируется в печени (гепатоцитах) и жировой ткани, с более низкими уровнями в почках и легких. Этот фермент также обнаруживается в макрофагах и желудочно-кишечном тракте на минимальном уровне [52]. CES1 отвечает за ~80% активности печеночной карбоксилэстеразы и играет важную роль в метаболизме липидов, включая гидролиз эфиров холестерина [52], [77].

CES2 очень распространена в тонком кишечнике (энтероцитах) и умеренно экспрессируется в печени и почках. Это основная изоформа CES в кишечнике, которая опосредует пресистемный метаболизм лекарств (например, активацию иринотекана) и липидов [52], [78], [80].

CES3 экспрессируется на очень низком уровне в печени и желудочно-кишечном тракте с минимальной каталитической активностью по сравнению с CES1 и CES2. Физиологическая роль этой изоформы остается плохо изученной [52], [81].

О CES4A и CES5A существуют ограниченные данные по распределению в тканях. CES4A связан с мочевыделением у некоторых млекопитающих (например, кошек), но функция его человеческого гомолога неясна, а CES5A, как предполагается, участвует в липидном метаболизме [79], [81].

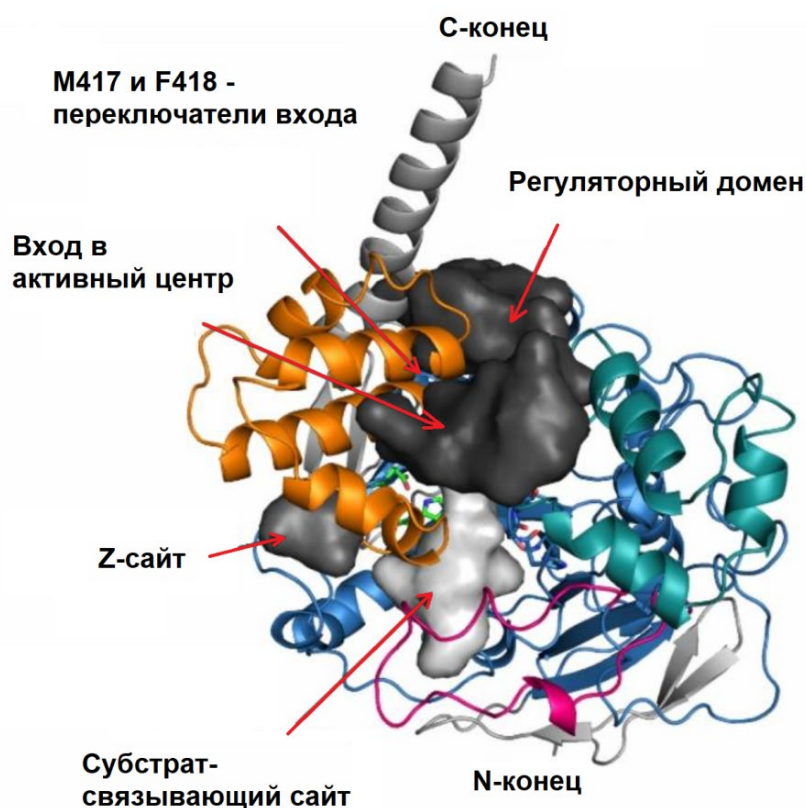


Рисунок 24. Доменная структура *ces2c* крысы.

### 1.5.5 Карбоксилэстераза 1

Человеческие CES имеют  $\alpha/\beta$ -гидролазную складку, характерную для суперсемейства сериновых гидролаз, а каталитическая триада включает Ser228, Glu345 и His457 (для примера даны номера аминокислот в CES2), расположенные на границе трех доменов: центрального каталитического, регуляторного и домена  $\alpha\beta$  [79]. CES1 образует олигомеры (тримеры/гексамеры) через Z-образный димерный интерфейс («Z-участок»), который действует как аллостерический регуляторный участок для доступа к субстрату [52], [82], [83]. Напротив, CES2 существует в виде мономера из-за вариаций последовательностей в аналогичных областях Z-участка [78], [82]. Активный сайт CES1 размещает субстраты с большими ацильными группами благодаря своему широкому и гибкому субстрат-связывающему карману [79]. Это контрастирует с жестким «кэп»-доменом сайта CES2, который стерически ограничивает доступ субстратов с объемными ацильными группами, способствуя гидролизу соединений с небольшими ацильными группами и большими спиртовыми фрагментами (например, иринотекан).

Генов карбоксилэстераз мыши [80] более 20, включая восемь паралогов *ces1* и восемь *ces2* (*ces2a–ces2h*), сгруппированных на хромосоме 8. Такое разнообразие сильно усложняет идентификацию ортологов. Например, мышинный *ces2c*, несмотря на  $\alpha/\beta$ -гидролазную складку и каталитическую триаду (S230, E347, H459), напоминающих человеческую CES1, предлагается рассматривать в качестве функционального аналога CES2 из-за схожих субстратной предпочтительности (например, гидролиз триглицеридов) и тканеспецифичной экспрессии [80]. Кроме того, мышинный *ces1d*, а не *ces1g*, является ортологом человеческой CES1, разделяя 78% аминокислотной идентичности и схожую роль в метаболизме липидов в печени. Напротив, функции человеческой CES2 могут быть аналогично распределены по нескольким изоформам мышинной *ces2*, таким как *ces2a* и *ces2c*.

Мышиная карбоксилэстераза 1 (*ces1*), в частности изоформа *ces1d* – ортолог человеческой CES1, имеет глобулярную структуру  $\alpha/\beta$ -гидролаз из 17  $\beta$ -нитей и 17  $\alpha$ -спиралей каталитического домена, окруженного регуляторными доменами для распознавания субстрата и олигомеризации [78], [79]. Активный центр состоит из консервативной триады сериновых гидролаз (Ser221, Glu353, His466) у основания субстратсвязывающего гидрофобного ущелья из двух отдельных карманов: большого и гибкого гидрофобного кармана, вмещающего объемные ацильные группы (например, длинноцепочечные жирные кислоты), и небольшого, жесткого кармана (прилегающего к оксианионному отверстию, образованному Gly142-Gly143), который



стабилизирует меньшие спиртовые фрагменты (например, холестерин или ретиноловые эфиры), объясняя предпочтение *ces1d* субстратам, таким как эфиры холестерина и триглицериды [52], [78], [79]. Анализ четвертичной структуры показывает, что *ces1*, благодаря взаимодействию регуляторных доменов, существует в динамическом равновесии между мономерными, тримерными и гексамерными состояниями, управляя доступом субстрата к активному центру [78], [84]. Метаболически *ces1* гидролизует эндогенные субстраты, включая триглицериды (мобилизуя печеночные запасы для сборки ЛПОНП), эфиры холестерина, эфиры ретинола и длинноцепочечные ацил-КоА-эфиры (поддерживая окисление жирных кислот в почках через *ces1f*), наряду с ксенобиотиками, такими как пролекарство иринотекан (превращается в активный SN-38) и пиретроидные инсектициды [77], [85], [86]. Анализ тканеспецифичной локализации показывает наибольшую экспрессию в печени (*ces1d* составляет ~ 1% протеома печени), жировой ткани (регулирует гидролиз триглицеридов и высвобождение жирных кислот), с более низкими уровнями в кишечнике и макрофагах [77], [85]. На клеточном уровне большинство изоформ *ces* локализуются в просвете эндоплазматического ретикулума через С-концевой мотив HXEL (аналогично человеческим CES), который связывается с рецепторами KDEL для удержания в ЭПР. Однако специфичная для грызунов изоформа *ces1g* не имеет этого сигнала и секретируется в плазму или липидные капли во время липолиза в виде мономера, гидролизуя циркулирующие эфиры, такие как пиретроидные инсектициды и героин [77], [79].

Другие изоформы *ces* образовались в результате генной дупликации и дивергенции [87]. Так, в кишечнике мышей для метаболизма ксенобиотиков (например, активации CPT-11) необходимы *ces2a* и *ces2c* [78]; в жировой ткани и почках экспрессируются *ces1d* и *ces1f*, регулируя липолиз и окисление жирных кислот (такая роль человеческой CES1 менее выражена [79], [87]); в мозге и лёгких человека и крысы локализуются CES4A/CES5A и *ces4a/ces5a* соответственно, но их физиологическая роль не определена [77], [82].

Что касается карбоксилэстеразы 2, *ces2c* предлагается в качестве основного ортолога человеческой CES2 на основании кишечной экспрессии и гидролиза иринотекана, хотя существуют функциональные совпадения с *ces2a* и *ces2e* [78]. Примечательно, что человеческая CES2 не имеет полного мышинового аналога в метаболизме липидов; вместо этого, несколько изоферментов *ces2* совместно повторяют её функции [78], [79]. Семейства *ces3–5*, представленные в меньшинстве у обоих видов, остаются плохо изученными: известно только, что *ces3* экспрессируется в толстой кишке и трахее, а *ces4a* – в мозге и коже [77], [82].

### 1.5.6 Ингибиторы карбоксилэстераз

Ингибиторы карбоксилэстеразы 1 человека и мыши (рисунок 25) нацелены на консервативную  $\alpha/\beta$ -гидролазную складку и каталитическую триаду (Ser-Glu-His) [77], [88]. Синтетические ингибиторы, такие как бензил (и его ароматические аналоги), связываются посредством гидрофобных взаимодействий и  $\pi$ - $\pi$  стекинга (с остатками Phe224, Leu255) в большом ацильном кармане, занимая активный сайт и стерически препятствуя доступу субстрата [79], [88], [89], в то время как органофосфаты, такие как бис(4-нитрофенил)фосфат, ковалентно модифицируют каталитический серин, необратимо инактивируя фермент посредством фосфорилирования [79], [88]. Селективность для CES1 по сравнению с CES2 возникает из-за большего гидрофобного ущелья CES1 по сравнению с более узким карманом CES2, что позволяет преимущественно связывать объемные ингибиторы. А специфический для мышей *ces1g* (секретируемый в плазму из-за отсутствия мотива удержания ER HXEL) ингибируется пиретроидами посредством гидрофобных взаимодействий, тогда как человеческий CES1 остается незатронутым из-за вариаций аминокислот вблизи оксианионной впадины [77], [79].

Фенилметилсульфонилфторид (PMSF) – широко используемый необратимый ингибитор сериновых гидролаз, включая карбоксилэстеразы. Механизм его действия основан на специфической ковалентной модификации остатка серина в активном центре с образованием стабильного сульфонилферментного комплекса [88].

Теноилтрифторацетон (TTFA) – известный ранее как ингибитор дыхательного комплекса II, также может неконкурентно замедлять работу CES1 в низкой концентрации, недостаточной для его первоначальной активности [90]. Такой неконкурентный характер ингибирования предполагает, что TTFA связывается с аллостерическим, а не с активным центром фермента CES1, однако точный сайт неизвестен. Примечательно, что DSF также подавляет эстеразную активность, опосредованную карбоксилэстеразами [91], [92].

С точки зрения терапевтического действия, ингибиторы CES1 смягчают токсичность лекарств (например, лоперамид снижает диарею, вызванную иринотеканом, ограничивая его гидролиз до SN-38), управляют метаболическими заболеваниями (например, олеаноловая кислота подавляет гидролиз триглицеридов в печени, уменьшая гиперлипидемию и жировую болезнь печени) и оптимизируют доставку пролекарств (например, BNPP стабилизирует пролекарства на основе эфиров в тканях с низким CES путем конкурентного ингибирования) [85], [88]. Ингибиторы, имитирующие полиморфизм G143E, являются перспективными для персонализированной медицины у пациентов с вариантами CES1, вызывающими накопление токсичных метаболитов таких препаратов, как метилфенидат или клопидогрель [85].

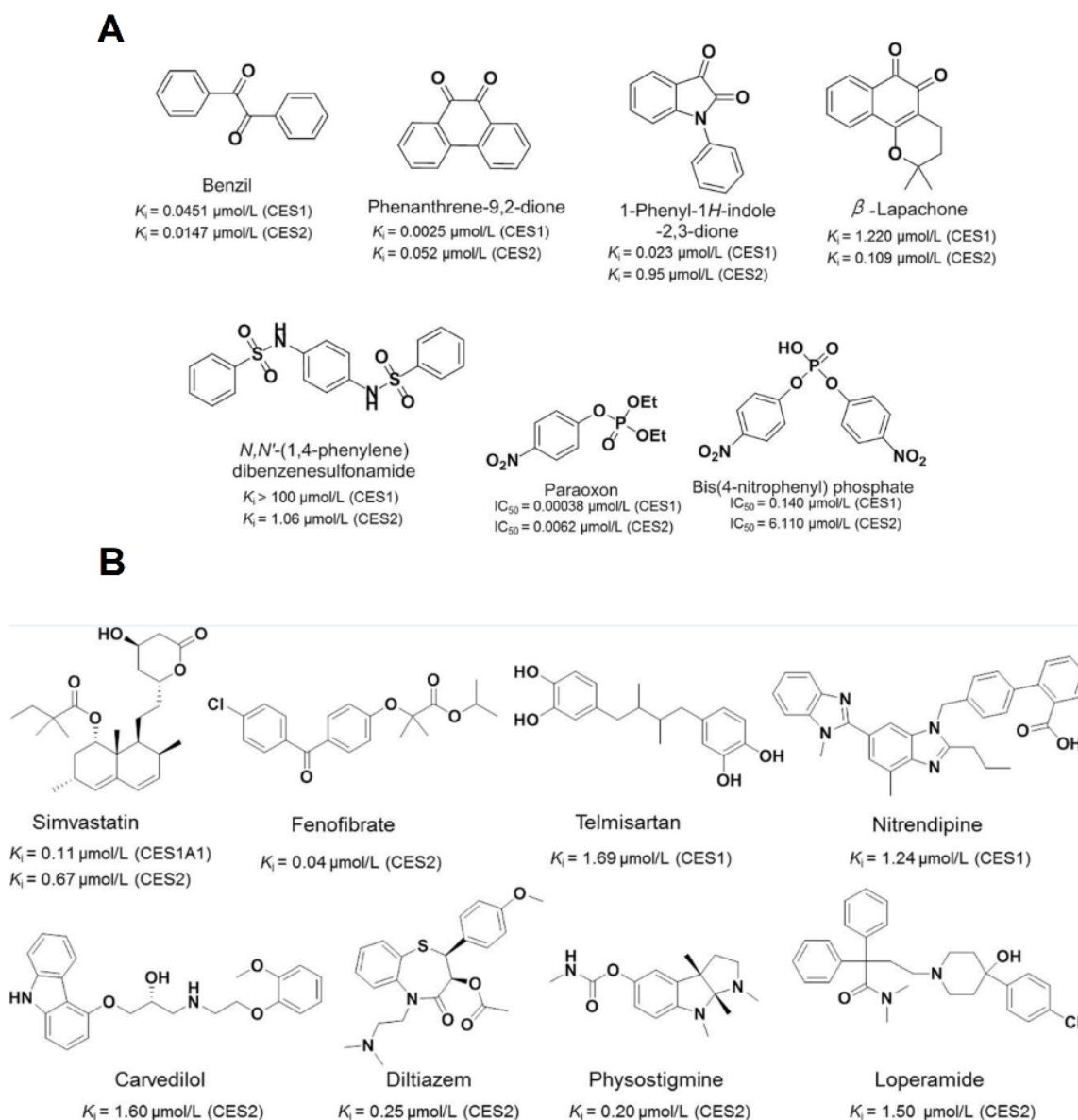


Рисунок 25. Некоторые синтетические (А) и применяемые в клинической практике (В) ингибиторы CES1 и CES2 [52].

## 1.6 Химическая модификация ксенобиотиков

Нейтрализация ксенобиотиков – лекарств, загрязнителей окружающей среды, контаминантов и других чужеродных для клеток соединений, в основном происходит посредством ферментативных процессов, классифицируемых на реакции фазы I, II и III. Эти метаболические пути направлены на повышение гидрофильности ксенобиотиков, облегчая их выведение из организма. Так, реакции фазы I включают функционализацию структуры ксенобиотика посредством окисления, восстановления или гидролиза, делая молекулы более реакционноспособными для последующей конъюгации. Ключевую роль в окислении играет семейство ферментов цитохрома P450, которое вводит полярные гидроксильные группы.

Например, окисление бензольных производных до фенольных с помощью CYP450 повышает их растворимость. В реакциях восстановления, хотя и менее распространенных, нитрогруппы преобразуются в амины, в то время как гидролитические ферменты – эстеразы расщепляют эфирные или амидные связи, к примеру, при гидролизе аспирина до салициловой и уксусной кислот [93], [94]. Примечательно, что в фазе I иногда могут образовываться сверхактивные промежуточные продукты, такие как эпоксиды, которые могут оказывать токсическое действие, если их эффективно не нейтрализовать.

Реакции фазы II включают каталитическую конъюгацию, когда водорастворимые фрагменты присоединяются к модифицированным в фазе I или исходным соединениям. В ходе глюкуронирования, катализируемого UDP-глюкуронозилтрансферазами (UGT), происходит присоединение глюкуроновой кислоты из UDP-глюкуроновой кислоты к субстратам, таким как морфин, с образованием выводимых легко растворимых глюкуронидов [95]. Сульфотрансферазы (SULT) переносят сульфатные группы из 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфата (PAPS) на фенолы или спирты, как это наблюдается при сульфатировании парацетамола [96]. Глутатион S-трансферазы (GST) связывают глутатион с электрофильными центрами, нейтрализуя метаболиты, образующиеся, например, при передозировке ацетаминофена [97]. Ацетилирование N-ацетилтрансферазами (NAT) изменяет ароматические амины с помощью ацетил-КоА, в то время как метилтрансферазы, такие как катехол-О-метилтрансфераза (COMT), переносят метильные группы с S-аденозилметионина (SAM) на субстраты, такие как катехоламины [98], [99]. Конъюгация с аминокислотами, хотя и менее распространенная, связывает ксенобиотики с глицином или таурином, примером чего является выведение бензойной кислоты с образованием гиппуровой кислоты.

### 1.6.1 Глутатион. Структура и роль в клетке

**Глутатион (GSH)**, трипептид, состоящий из глутамата, цистеина и глицина, связанных неканоничной  $\gamma$ -глутамильной связью, является наиболее распространенным небелковым тиолом в клетках млекопитающих и центральным игроком в клеточном окислительно-восстановительном гомеостазе. Его синтез происходит в два АТФ-зависимых этапа (рисунок 26): во-первых, глутамат-цистеинлигаза (GCL) катализирует образование  $\gamma$ -глутамилцистеина из глутамата и цистеина. Это лимитирующая стадия биосинтеза, которая регулируется доступностью цистеина и ингибируется по принципу обратной связи самим GSH. Второй этап включает глутатионсинтетазу (GS), которая добавляет глицин к  $\gamma$ -глутамилцистеину для завершения синтеза GSH [94], [100], [101]. Этот процесс строго регулируется на транскрипционном и посттрансляционном уровнях, при этом факторы транскрипции, такие как Nrf2, активируют механизмы антиоксидантного ответа (ARE) для повышения регуляции GCL и GS при окислительном стрессе [94], [100].

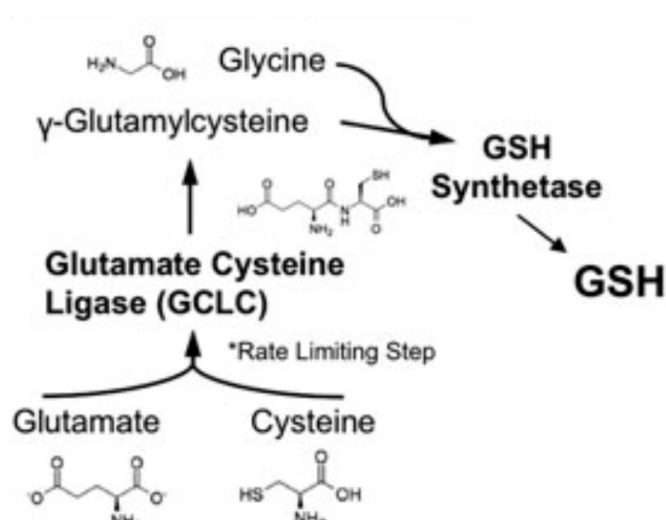


Рисунок 26. Схема биосинтеза глутатиона.

GSH выполняет в клетке несколько важных функций и является неотъемлемой частью множества метаболических путей (рисунок 27). Так, GSH нейтрализует активные формы кислорода (ROS) с помощью глутатионпероксидаз (GPx), восстанавливая перекись водорода и липидные пероксиды до воды или спиртов и образуя окисленный глутатион (GSSG). GSSG превращается обратно в GSH глутатионредуктазой (GR) с использованием NADPH из пентозофосфатного пути [93], [95], [100]. Кроме того, глутатион S-трансферазы (GST) связывают GSH с электрофильными группами ксенобиотиков (например, лекарственными средствами, токсинами из окружающей среды и пищи) и эндогенными токсичными метаболитами, способствуя их выведению из клетки и детоксикации [93], [95]. За счёт своих окислительно-восстановительных свойств GSH модулирует функции факторов транскрипции, киназ и

ферментов, участвующих в апоптозе и пролиферации, защищая остатки цистеина от необратимого окисления посредством обратимого глутатионилирования [94], [100]; а также участвует в синтезе дезоксирибонуклеотидов и сборке железо-серных кластеров: зависящие от GSH глутаредоксины (также известные как тиолтрансферазы) способствуют синтезу и переносу кластеров, критически важных для целого ряда митохондриальных и ядерных ферментов [93], [100].

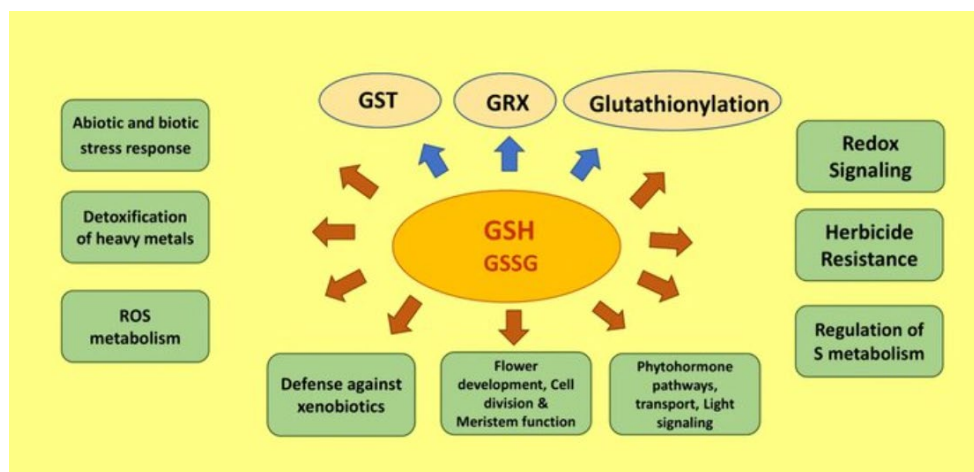


Рисунок 27. Роль глутатиона в клетке [102]

Более того, транспорт аминокислот тоже критически зависит от глутатиона:  $\gamma$ -глутамиловый цикл, инициируемый  $\gamma$ -глутамилтранспептидазой (GGT), расщепляет внеклеточный GSH на составляющие его аминокислоты для клеточного поглощения и повторного использования, обеспечивая доступность цистеина для ресинтеза GSH [94], [101]. По аналогичному механизму, предполагается, происходит транспорт нейтральных аминокислот: фермент  $\gamma$ -глутамилтрансфераза катализирует перенос  $\gamma$ -глутамильной группы глутатиона или другого  $\gamma$ -глутамильного пептида на транспортируемую аминокислоту. Комплекс  $\gamma$ -глутамил–аминокислота после переноса через биомембрану распадается внутри клетки под действием  $\gamma$ -глутамилциклотрансферазы на свободную аминокислоту и 5-оксопролин (пироглутаминовая кислота, циклическая форма глутатиона), образование которого почти целиком сдвигает реакцию расщепления комплекса вправо. Благодаря возможности внутриклеточного ресинтеза глутатиона, цикл может повторяться многократно, транспортируя значительные количества аминокислот (рисунок 28).

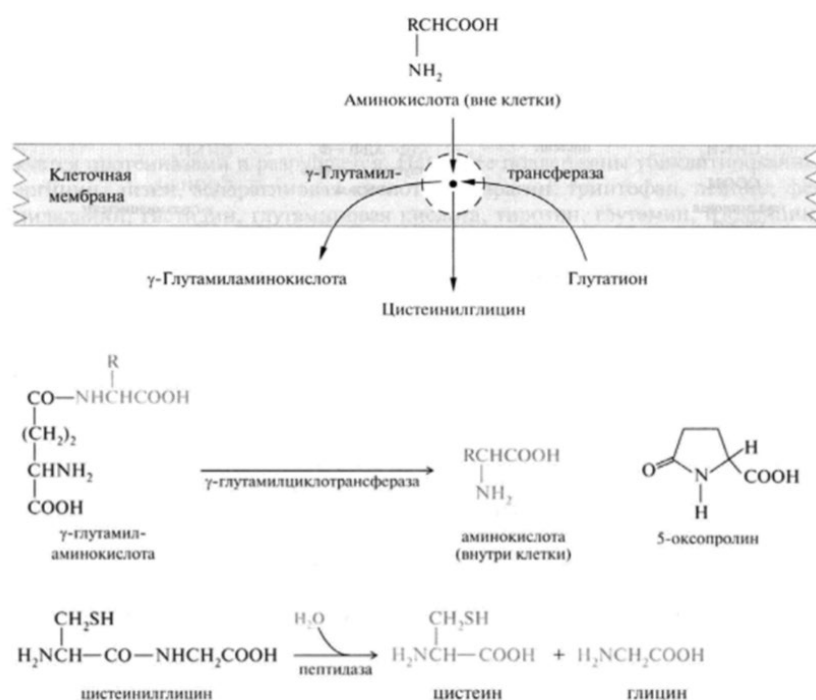


Рисунок 28. Схема 3х стадий  $\gamma$ -глутамилового цикла (GSH-зависимый транспорт аминокислот в клетку).

Концентрации GSH значительно различаются в разных клеточных компартментах и тканях.

Внутриклеточное распределение:

Цитозоль: 80–85% клеточного GSH (1–10 mM), основной резервуар для реакций антиоксидантной защиты и детоксикации [94].

Митохондрии: 10–15% (1–5 mM), критически важная роль в защите митохондриальной ДНК и ферментов от окислительного повреждения [94], [100].

Эндоплазматический ретикулум (ЭР): более низкие концентрации (соотношение GSH/GSSG 1:1–3:1), поддержка образования дисульфидных связей в секреторных белках [93], [100].

Тканеспецифичное распределение уровня глутатиона:

Печень: самые высокие уровни GSH (5–10 mM), что отражает его роль в детоксикации и экспорте в плазму и желчь [94].

Мозг: более низкие уровни (1–2 mM), причем с дефицитом связаны нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера [93], [103].

Легкие: эпителиальная выстилающая жидкость содержит высокий уровень GSH (10–100 мкМ) для нейтрализации вдыхаемых оксидантов [95].

Кровь: плазменный GSH поддерживается на уровне ~5 мкМ, в основном за счет экспорта из печени, в то время как эритроциты содержат 1–2 мМ для защиты от гемолитического стресса [100].

Патологические последствия сниженной концентрации или нарушения регуляции GSH связаны со старением, раком, диабетом и нейродегенеративными расстройствами. Например, в раковых клетках часто повышенная концентрация GSH, чтобы противодействовать окислительному стрессу и химиотерапии, в то время как заболевания печени, такие как цирроз, коррелируют с пониженным синтезом GSH в печени [93], [100], [104]. Терапевтические стратегии лечения метаболизма GSH включают N-ацетилцистеин (NAC) или синтетические аналоги (например, N-метилованный GSH) для повышения биодоступности цистеина [96], [101].



### 1.6.2 Глутатионилирование и глутатион-S-трансферазы

**Глутатионилирование** в контексте метаболизма ксенобиотиков представляет ферментативную конъюгацию глутатиона (GSH) с ксенобиотиками как механизм детоксикации, опосредованный глутатион-S-трансферазами (GST) (рисунок 29). Этот процесс нейтрализации вредных соединений облегчает их выведение через мочу или желчь, увеличивая их растворимость в воде [105]. Химическая реакция заключается в нуклеофильной атаке тиоловой группы в GSH на электрофильные центры ксенобиотиков с образованием глутатион-S-конъюгатов. Под действием  $\gamma$ -глутамилтрансфераз и дипептидаз они превращаются в S-конъюгаты цистеина, которые впоследствии ацетируются с образованием меркаптуровых кислот (конъюгатов N-ацетилцистеина) для элиминации [105].

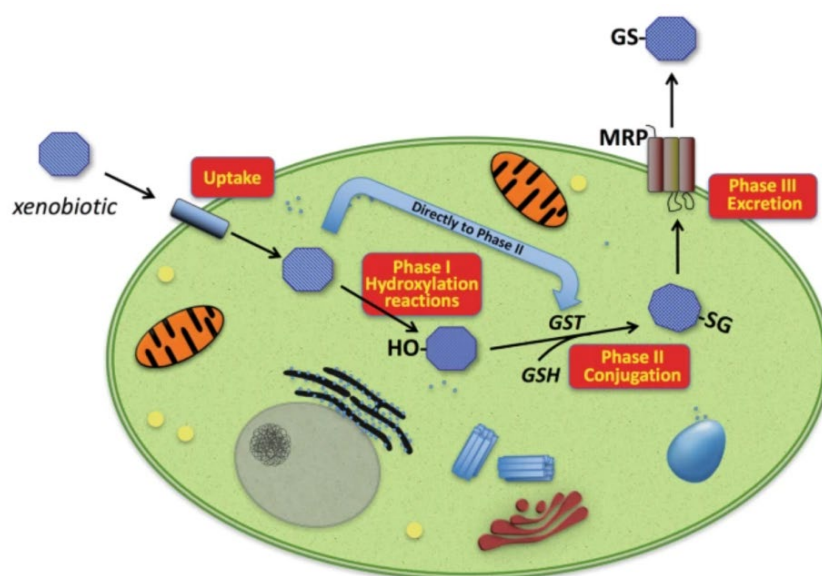


Рисунок 29. Схема глутатион-зависимого метаболизма ксенобиотиков [106].

Есть множество примеров ксенобиотиков, модифицируемых посредством глутатионилирования для дальнейшего выведения из клетки и организма (рисунок 30) [106]:

Афлатоксин В1 (AFB1) – нетоксичный поликетид, вырабатываемый видами *Aspergillus*, метаболизируется цитохромом P450 до канцерогенного эпоксидного производного (8,9-эпокси-AFB1). GST катализируют конъюгацию GSH с этим эпоксидом, образуя гидрофильный аддукт, который выводится через меркаптурный путь. Эта детоксикация имеет решающее значение для снижения гепатотоксичности и канцерогенности AFB1.

4-Гидроксинonenаль (4HNE) – продукт перекисного окисления липидов, реагирует с клеточными макромолекулами, вызывая окислительное повреждение и, как следствие, нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания. GST катализируют конъюгацию GSH с 4HNE, образуя GS-HNE, который транспортируется из клеток через белки, ассоциированные с

множественной лекарственной устойчивостью (MRPs), снижая токсичность 4-гидроксинафтола.

GS-конъюгат акролеина – токсичного альдегида табачного дыма, являющегося продуктом термического разложения липидов, перерабатывается в меркаптуровые кислоты, такие как 3-гидроксипропилмеркаптуровая кислота, которые выводятся с мочой.

Галогенированные алкены (например, 1,2-дихлорвинил) конденсируются с GSH с дальнейшим образованием цистеиновых S-конъюгатов. Хотя этот путь обычно способствует детоксикации, некоторые конъюгаты подвергаются расщеплению  $\beta$ -лиазами в почках с образованием реакционноспособных серосодержащих тиокетенов и тиранов, которые могут проявлять высокую нефротоксичность, иллюстрируя двойную роль глутатионилирования в детоксикации и биоактивации [105].

Кроме того, GSTs способствуют лекарственной устойчивости, конъюгируя химиотерапевтические препараты, такие как цисплатин, снижая их эффективность. Вследствие сверхэкспрессии GST в раковых клетках этот механизм усиливает детоксикацию терапевтических агентов, снижая эффективность антираковых лекарств.

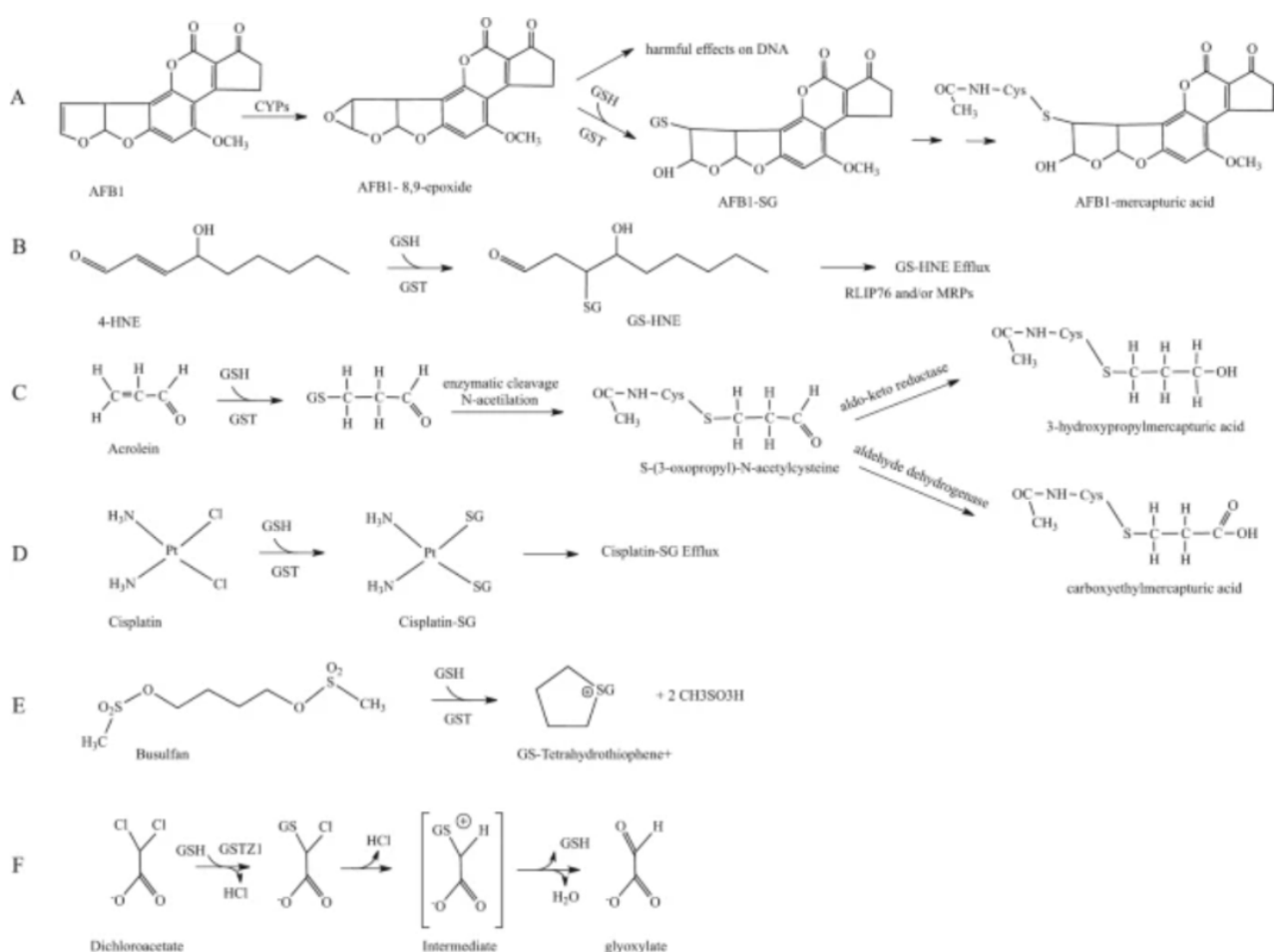


Рисунок 30. Примеры некоторых субстратов глутатион-S-трансферазы GST.

**Глутатион-S-трансферазы (GST)** представляют собой суперсемейство ферментов, играющих центральную роль в фазе II метаболизма экзогенных агентов путем конъюгации трипептида глутатиона (GSH;  $\gamma$ -глутамил-цистеинил-глицин) с электрофильными ксенобиотиками и эндогенными токсинами. Такая конъюгация повышает растворимость соединений, облегчая их выведение через транспортеры фазы III, такие как белки, ассоциированные с множественной лекарственной устойчивостью (MRP) [107], [108]. GST эволюционно консервативны среди прокариот и эукариот и подразделяются на три основных суперсемейства: цитозольные, митохондриальные (класс каппа) и микросомальные (семейство MAPEG). Наиболее изученные цитозольные GST далее делятся на классы, такие как Alpha, Mu, Pi, Theta и Omega, на основе гомологии последовательностей, субстратной специфичности и структурных особенностей [108], [109].

Цитозольные GST представляют собой димерные ферменты, каждая субъединица которых (~25 кДа) состоит из двух отдельных доменов. N-концевой домен содержит тиоредоксиноподобную складку, в которой находится консервативный сайт связывания глутатиона (G-сайт). Этот домен отвечает за активацию GSH путем стабилизации его тиолатного аниона ( $GS^-$ ) посредством водородной связи с каталитическими остатками тирозина, серина или цистеина в зависимости от класса GST. Классы Alpha, Mu и Pi используют остаток тирозина, тогда как классы Theta и Omega используют серин или цистеин [108], [110]. С-концевой  $\alpha$ -спиральный домен образует гидрофобный сайт (H-сайт), связывающий разнообразные электрофильные субстраты. Изменчивость H-сайта по размеру и гидрофобности лежит в основе широкой субстратной специфичности GST [107]. Митохондриальные GST (класс каппа) сохраняют тиоредоксиноподобную складку, подобно цитозольным GST, но содержат дополнительный DsbA-подобный домен, который облегчает взаимодействие с митохондриальными белками [111]. В отличие от цитозольных GST, которые образуют гомодимеры или гетеродимеры, митохондриальные GST в основном функционируют как мономеры, а их активные центры адаптированы для взаимодействия с активными формами кислорода (ROS) и побочными продуктами перекисного окисления липидов.

Основной стадией катализа GST является активация тиоловой группы GSH. В водном растворе  $pK_a$  тиола GSH составляет ~9.0, но GST снижают это значение в G-сайте до ~6,5, что позволяет образовывать реактивный тиолат-анион ( $GS^-$ ) при физиологическом значении pH [108]. Это достигается, как уже говорилось выше, за счет водородных связей между тиоловой группой и каталитическими остатками (например, Tyr-7 в человеческом GSTP1-1) и электростатических взаимодействий с соседними аминокислотами. Затем тиолат осуществляет

нуклеофильную атаку на электрофильные центры в субстратах, таких как афлатоксин В1-эпоксид, 4-гидроксиноненаль (4-HNE) или химиотерапевтические агенты, такие как цисплатин, образуя химические конъюгаты GSH [106], [108]. Реакция протекает либо через нуклеофильное замещение (например, с 1-хлор-2,4-динитробензолом), либо через сопряженное присоединение по Михаэлю (например, с  $\alpha$ ,  $\beta$ -ненасыщенными альдегидами, такими как акролеин) [106].

В Н-сайте происходит связывание гидрофобного субстрата для конъюгации, часто через  $\pi$ - $\pi$ -стекинг, ван-дер-ваальсовы взаимодействия или водородные связи. Например, при детоксикации побочного продукта перекисного окисления липидов 4-HNE, GSTA4-4 связывает альдегидную группу в Н-сайте, позволяя GSH атаковать электрофильный  $\beta$ -углерод [106], [107]. Полученный конъюгат, GS-HNE, экспортируется из клеток через MRP, иллюстрируя роль фермента в смягчении окислительного повреждения [106], [108]. Структурные исследования, включая рентгеновскую кристаллографию *Arabidopsis thaliana* GST (PDB: 1GNW), показали, как изменения в архитектуре Н-сайта обеспечивают субстратную вариабельность, позволяя GST адаптироваться к различным токсинам окружающей среды [108].

Помимо катализа, GST демонстрируют неферментативные функции, такие как модуляция сигнальных путей стресса. Например, GSTP1-1 ингибирует c-Jun N-терминальную киназу (JNK), образуя стабильный комплекс, который предотвращает JNK-опосредованный апоптоз – механизм, используемый раковыми клетками для избежания клеточной смерти [107], [108]. Кроме того, митохондриальная GST каппа участвует в окислительно-восстановительном гомеостазе, восстанавливая надкислоты липидов посредством своей глутатион-пероксидазной активности [108], [110].

Микросомальные GST принадлежат к суперсемейству мембранно-ассоциированных белков в метаболизме эйкозаноидов и глутатиона (MAPEG) [111], [112]. Эти ферменты являются интегральными мембранными белками, резко контрастируя с растворимыми димерами цитозольных GST. Так, MGST1 образует гомотример, встроенный в эндоплазматический ретикулум или митохондриальную внешнюю мембрану, причем каждая субъединица содержит по четыре трансмембранные спирали [111]. Каталитический сайт расположен на границе между субъединицами, где глутатион связывается в «расширенной» конформации, стабилизированной остатками аргинина (например, Arg130 в MGST1), для снижения  $pK_a$  тиоловой группы глутатиона и получения тиолят-аниона [110]. Такая структура позволяет ферментам MAPEG метаболизировать гидрофобные субстраты, такие как лейкотриены, простагландины и продукты перекисного окисления липидов, непосредственно из липидного бислоя [110]. Уникальной особенностью MGST1 является его активация сульфгидрильными реагентами (например, N-

этилмалеимидом), которые на порядок усиливают его активность за счет алкилирования чувствительного к стрессу остатка цистеина (Cys49).

Суперсемейство глутатион-S-трансфераз – пример конвергентной эволюции, когда белки самой разной локализации и функций приспособились использовать глутатион в качестве универсального кофактора. Полиморфизмы GST, в свою очередь, значительно влияют на индивидуальную восприимчивость к заболеваниям и лекарствам. Например, сверхэкспрессия MGST1 в опухолях способствует химиорезистентности путем конъюгации таких препаратов, как цисплатин [111]. Генотип GSTM1-null связан с повышенным риском расстройств, опосредованных окислительным стрессом, в то время как полиморфизмы GSTP1 влияют на ответы на химиотерапию [107], [108]. Повышенная экспрессия GST в опухолях способствует лекарственной устойчивости, стимулируя разработку ингибиторов GST, таких как производные этакриновой кислоты, для антираковой терапии [106], [108].

### 1.7 Флуазинам – синтетический фунгицид-протонофор

Флуазинам – 3-хлор-N-(3-хлор-2,6-динитро-4-трифторметилфенил)-5-трифторметил-2-пиридиламин – контактный фунгицид широкого спектра действия. Его структура включает пиридиновое кольцо, связанное через амидную связь с бензольным кольцом, с электронакцепторными заместителями: хлором, трифторметилом и нитрогруппами. Флуазинам проявляет сильную активность против сельскохозяйственно-значимых грибковых патогенов, таких как *Phytophthora infestans* (фитофтороз картофеля), *Botrytis cinerea* (серая гниль), *Sclerotinia sclerotiorum* (белая плесень) и семейства *Fusarium* (фузариоз). Препарат применяется в основном для обработки листьев в виде суспензий или смачивающихся порошков для таких культур, как картофель, томаты, перец и цитрусовые, где он оказывает защитное действие, подавляя прорастание спор и рост мицелия [113-116].

Фунгицидное действие флуазилама, по всей видимости, обусловлено его ролью протонофора, нарушающего митохондриальную выработку энергии. Он разобщает окислительное фосфорилирование, перемещая протоны напрямую через внутреннюю митохондриальную мембрану, рассеивая протонный градиент, необходимый для синтеза АТФ. Эта протонофорная активность осуществляется посредством циклического протонирования-депротонирования, аналогично другим анионным разобщителям [19], [117]

С точки зрения метаболизма, пути выведения флуазилама различаются в зависимости от вида (рисунок 31). У рыб (радужная форель и синежаберный солнечный окунь) он накапливается в виде всё еще активных АМРА и ДАРА (происходит восстановление одной или обеих нитрогрупп до амина) и токсичному воздействию на водные экосистемы [118]. В крысах флуазинам претерпевает более сложные метаболические превращения, включая конъюгацию с глюкуронидом (ДАРА-glucuronide), меркаптуратом (АМРА-mercapturate), цистеином (ДАРА-sulfamate) и глутатионом (GS-FZN) [112]. Ферментативная конъюгация флуазилама истощает клеточные запасы GSH, что может вызывать окислительный стресс и способствовать токсичности для некоторых нецелевых организмов [114], [118], [119].

Транскриптомные исследования красного цитрусового клеща (*Panonychus citri*) и колорадского картофельного жука (*Leptinotarsa decemlineata*) показывают, что сублетальное воздействие флуазилама повышает экспрессию ферментов ответа на окислительный стресс, таких как цитохром P450 (например, CYP9Z14v2), ацетилхолинэстеразы (Ldace1), Mn-супероксиддисмутаза и каталаза [114]. У безжалой пчелы *Partamona helleri* воздействие флуазилама снижает активность глутатион-S-трансферазы – он вызывает повреждение эпителия

средней кишки, несмотря на отсутствие высокой токсичности [116], [119]. В то время как у растений, таких как салат, он запускает антиоксидантные реакции, включая повышение активности каталазы и супероксиддисмутазы [120]. Устойчивость соединения варьирует: наблюдается длительное накопление в листовых овощах из-за высокого содержания липидов [120], в то время как в окружающей среде период полураспада составляет 1 день.

Несмотря на низкую токсичность флуазинама для человека, показаны некоторые примеры его негативного действия на модели человеческих клеток. Показано, что флуазином ингибирует комплекс I цепи переноса электронов (ЭТЦ) в нейрональных клетках (SH-SY5Y), разобщает окислительное фосфорилирование, снижает синтез АТФ и генерирует избыточное количество активных форм кислорода (ROS), что приводит к гибели дофаминергических клеток, указывая на потенциальную нейротоксичность флуазинама и паркинсоноподобные механизмы [121]. Трифторметильные группы соединения могут подвергаться частичному дефторированию, высвобождая ионы фтора, которые ингибируют критически важные  $Mg^{2+}$ -зависимые ферменты, такие как енолаза в гликолизе и  $Na^+/K^+$ -АТФаза в клеточном ионном гомеостазе, в то время как хроническое воздействие фтора связано с флюорозом скелета, дисфункцией щитовидной железы и когнитивными нарушениями [122].

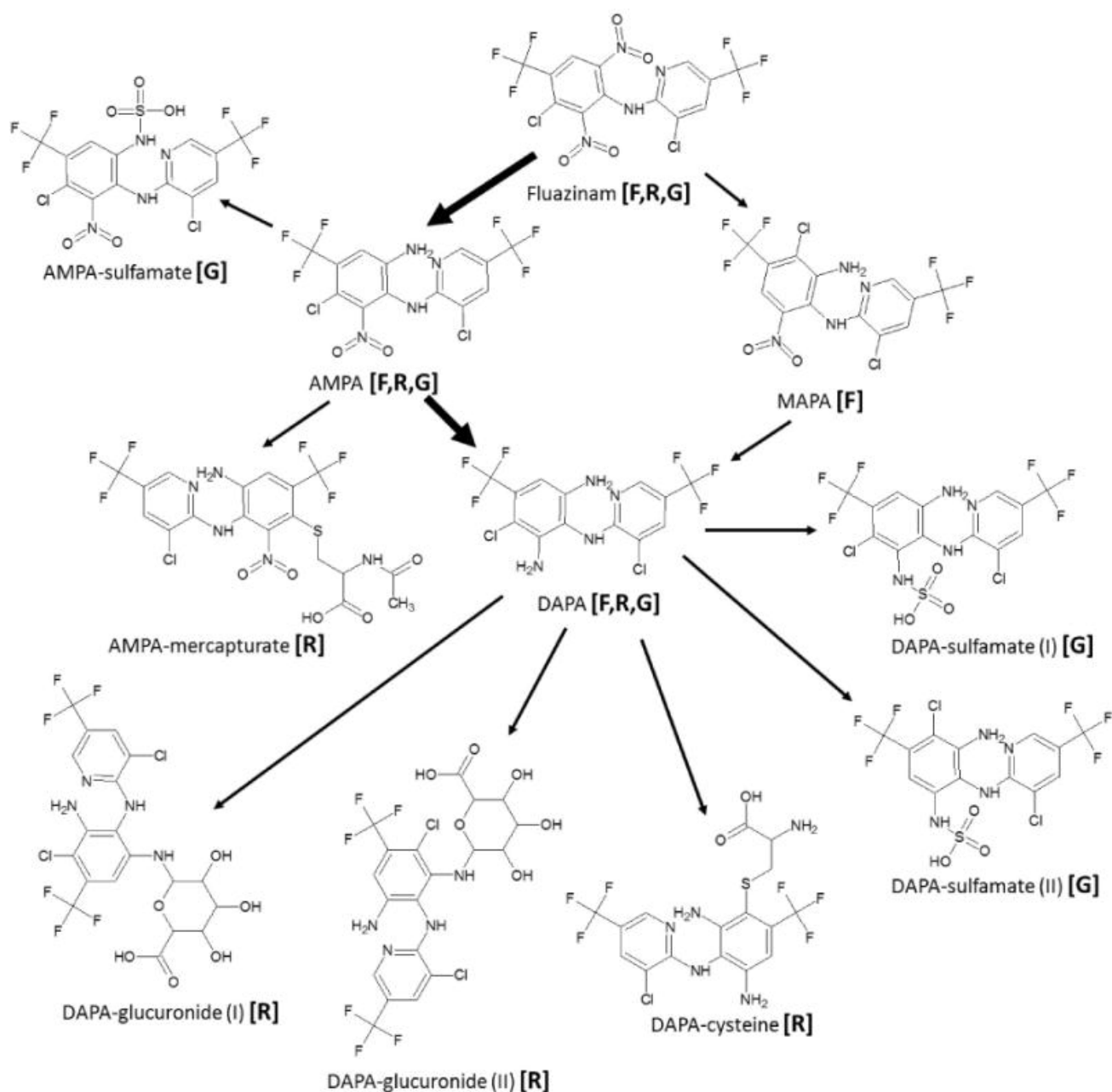


Рисунок 31. Метаболическая карта флуазинома для крысы (R), козы (G) и синезаберной рыбы (F). AMPA = 4-хлор-6-(3-хлор-5-трифторметил-2-пиридиламино)- $\alpha,\alpha,\alpha$ -трифтор-5-нитро-м-толуидин; MAPA = 2-хлор-6-(3-хлор-5-трифторметил-2-пиридиламино)- $\alpha,\alpha,\alpha$ -трифтор-5-нитро-м-толуидин; DAPA = 4-хлор-2-(3-хлор-5-трифторметил-2-пиридиламино)-5-трифторметил-м-фенилендиамин [118].



### 1.8 Производные анилинотиофена: терапевтические и протонаторные свойства

Фенилтиофенамины (анилинотиофена) представляют собой класс органических соединений, характеризующихся бензольным и тиофеновым кольцом (пятичленный ароматический гетероцикл, содержащий серу), связанными через аминогруппу. Эти соединения являются частью более широкого семейства производных тиофена, которые нашли широкое применение в медицинской химии из-за их структурной универсальности и разнообразной биологической активности. Производные тиофена, включая фенилтиофенамины, рассматриваются как потенциальные терапевтические средства с использованием модификации тиофенового ядра для улучшения фармакологических свойств: производные тиофена способны взаимодействовать с биологическими мишенями (такими как рецепторы серотонина, различные киназы и микробные ферменты) часто посредством  $\pi$ - $\pi$ -стекинга или водородных связей, благодаря электронной структуре тиофенового кольца.

Терапевтическое применение производных тиофена обширно (рисунок 32) [123]. Эти соединения проявляют противомикробные, противовоспалительные, антипсихотические, противораковые и широкие ингибирующие эффекты. Например, этил 2-амино-4-фенилтиофен-3-карбоксилат продемонстрировал высокую антимикробную активность против штаммов бактерий *E. coli* и *S. aureus*, а также грибковых патогенов, таких как *C. albicans*; типепидин используют в клинической практике из-за его противокашлевых и отхаркивающих свойств, потенциально модулируя моноаминергические системы в мозге. Кроме того, 2-бутилтиофен и 2-октилтиофен служат предшественниками для синтеза противораковых и антиатеросклеротических агентов, некоторые из них действуют как антимитотические агенты или ингибиторы пролиферации опухолевых клеток, а 1-[1-(2,5-диметилтиофен-3-ил)этил]-1-гидроксимочевина продемонстрировала эффективность в снижении воспаления и боли в доклинических моделях.

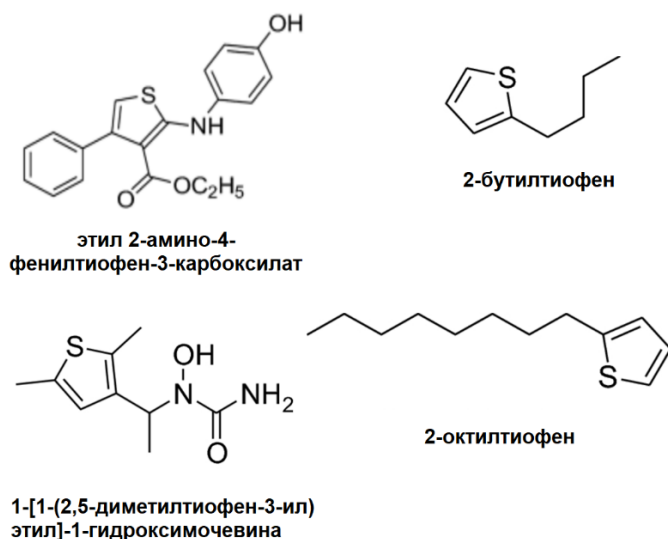


Рисунок 32. Некоторые терапевтические агенты на основе тиофена.

Разобшители на основе анилинотиофена описаны в статье 1970 года К. Х. Бюхеля и Г. Шефера [124]. Исследование сосредоточено на трех основных группах соединений: 2-анилино-3,5-динитротиофены (2х), 2-анилино-3,4-динитро-5-галотиофены (6х) и производные 3,5-динитро-2-гидрокситиофена (10х) (рисунок 33). Эти соединения были синтезированы путем нитрования галогенированных тиофенов (например, 2-хлор- или 2-бромтиофенов) с последующей конденсацией с замещенными анилинами, часто катализируемой третичными основаниями. Таким образом авторы получили большую серию производных анилинотиофена с разнообразными физическими (температура плавления) и химическими характеристиками (значения  $pK_a$ , липофильность и заместители различной природы).

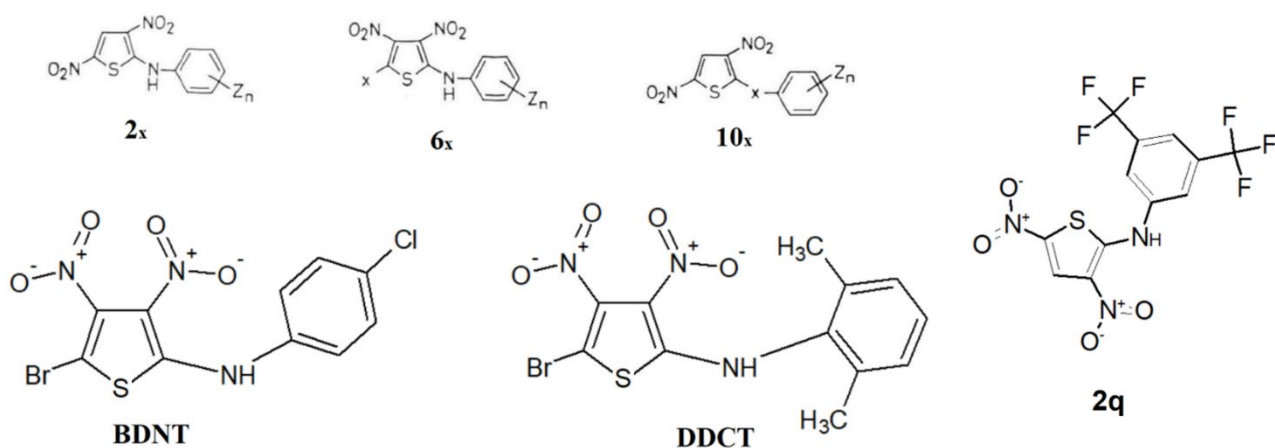


Рисунок 33. Производные фенил-тиофенамина, обладающие разобшающими свойствами.

Эксперименты по измерению скорости дыхания (рисунок 34) показали разобшающую активность производных II и VI в митохондриях печени крысы при концентрациях порядка десятков микромоль, причем зависимость скорости дыхания от концентрации разобшителя была колоколообразной (аналогично всем другим разобшителям). Самое активное соединение 6d (BDCT, 5-бром-3,4-динитро-N-(4-хлорфенил)-тиофен-2-амин) на 2,5 порядка превзошло классический разобшитель – 2,4-динитрофенол. Авторы показали связь структура-активность, подчеркивая необходимость кислотной группы NH для разобшения: её замена (в серии 10х) полностью лишала соединение активности. Электроакцепторные заместители, такие как нитро ( $-NO_2$ ), трифторметил ( $-CF_3$ ) и хлор, усиливали эффективность, вероятно, за счет снижения значений  $pK_a$ , хотя прямой такой корреляции обнаружено не было.

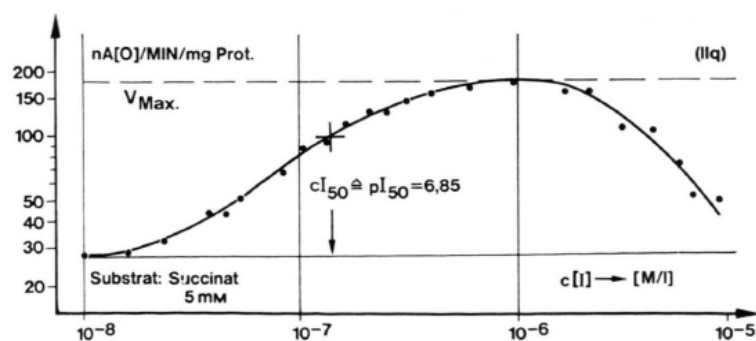


Рисунок 34. Колоколообразная зависимость скорости дыхания от концентрации соединения 2q.

Интересно, что некоторые производные, включая BDCT и 6k (DDCT, 3,4-динитро-N-(2,6-диметилфенил)-5-хлортиофен-2-амин), вызывали временное «циклическое» разобщение – явление, имитирующее обратимые циклы фосфорилирования, запускаемые АДФ (рисунок 35). Этот эффект зависел от концентрации и был связан со способностью соединения временно накапливаться в митохондриях перед тем, как быть вытесненным или инактивированным. Спектрофотометрический анализ окислительно-восстановительных состояний цитохрома (цитохрома с при 550–540 нм и цитохрома b при 430–410 нм) выявил динамические изменения мембранного потенциала, что согласовывалось с хемиосмотической теорией Митчелла (которая вышла всего на 4 года раньше) и предполагало, что соединения действуют как протонофоры, перемещая протоны напрямую через внутреннюю мембрану митохондрий. Однако аномалия исчезновения активности, впервые обнаруженная авторами, как им показалось, указывала на сложности, выходящие за рамки чисто протонофорного механизма.

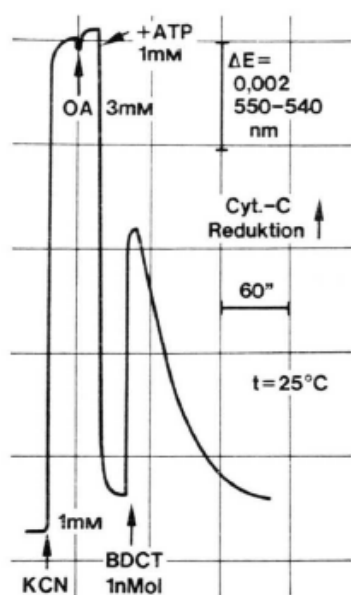
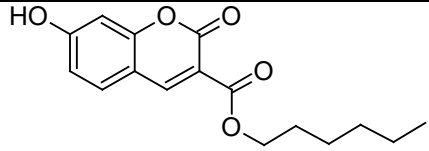
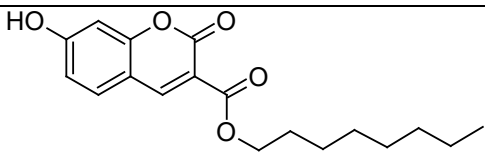
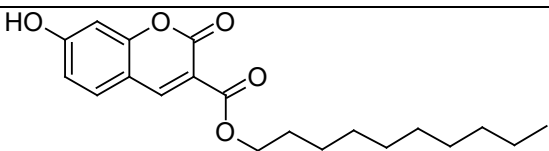
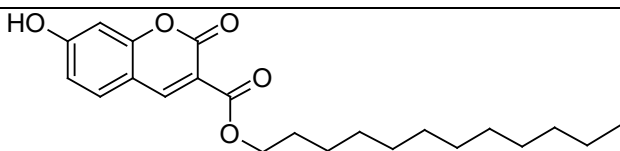
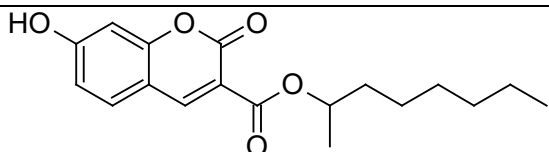
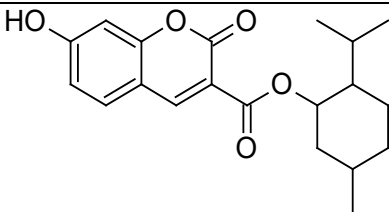
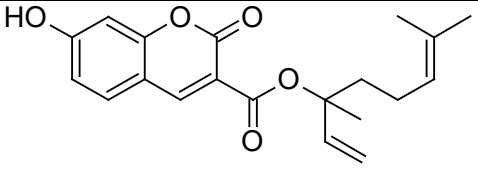
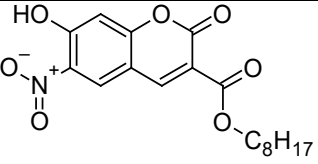
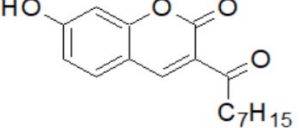
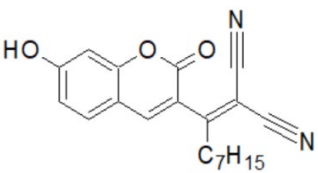
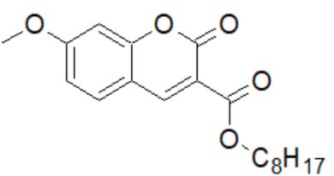


Рисунок 35. Исчезновение активности BDCT на митохондриях печени крысы, измеренной по окислительно-восстановительному состоянию цитохрома с.

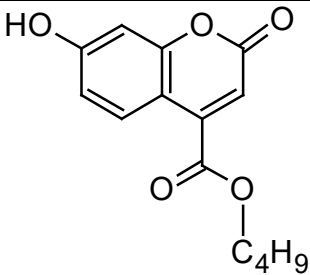
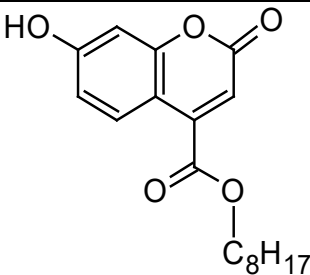
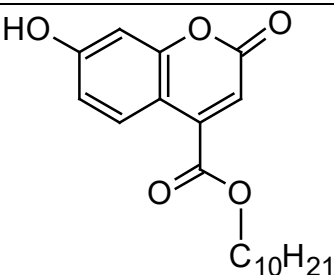
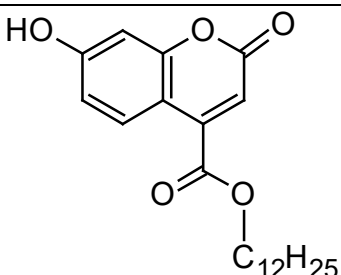
## 2.1 Таблица синтезированных соединений

## UB3-CR

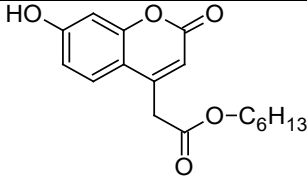
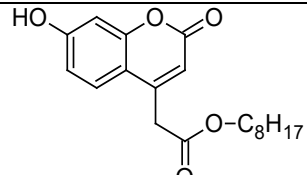
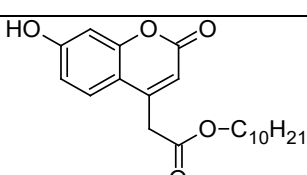
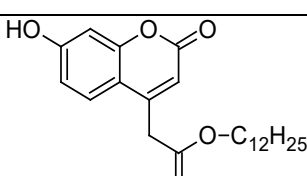
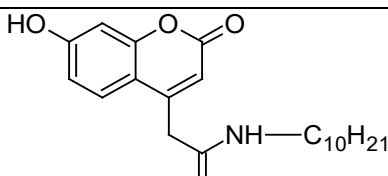
Структура соединения	Сокращение	спектры
	<b>UB3-C6</b>	LCMS $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ЯМР (не описан ранее)
	<b>UB3-C8</b>	LCMS $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ЯМР (описан ранее - Патент WO 2018/015788 A1)
	<b>UB3-C10</b>	LCMS $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ЯМР (описан ранее - Патент WO 2018/015788 A1)
	<b>UB3-C12</b>	LCMS $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ЯМР (не описан ранее)
	<b>UB3-2C8</b>	LCMS $^1\text{H}$ ЯМР (не описан ранее)
	<b>UB3-M (M=L-menthol)</b>	LCMS $^1\text{H}$ ЯМР (не описан ранее)

	<b>UB3-L</b> <b>(L=linalool)</b>	LCMS <sup>1</sup> H ЯМР (не описан ранее)
	<b>NO2-UB3-C8</b>	LCMS <sup>1</sup> H ЯМР (не описан ранее)
	<b>UB3-C-C7</b>	LCMS <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C ЯМР (не описан ранее)
	<b>UB3-CN-C7</b>	LCMS <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C ЯМР (не описан ранее)
	<b>Me-UB3-C8</b>	LCMS (не описан ранее)

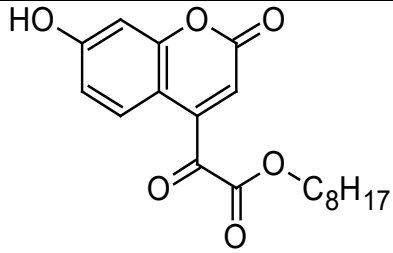
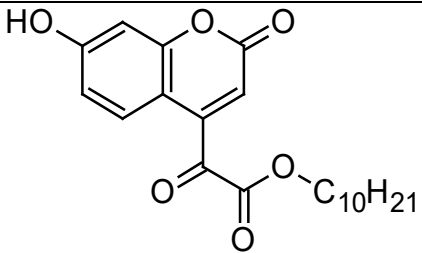
## UB\*4-CR

Структура соединения	сокращение	спектры
 <chem>CCCC(=O)Oc1cc(O)ccc2oc(=O)cc12</chem>	<b>UB*4-C4</b>	LCMS <sup>1</sup> H ЯМР (не описан ранее, описано О-метил производное)
 <chem>CCCCCCCC(=O)Oc1cc(O)ccc2oc(=O)cc12</chem>	<b>UB*4-C8</b>	LCMS <sup>1</sup> H ЯМР (не описан ранее)
 <chem>CCCCCCCCC(=O)Oc1cc(O)ccc2oc(=O)cc12</chem>	<b>UB*4-C10</b>	LCMS <sup>1</sup> H ЯМР (не описан ранее)
 <chem>CCCCCCCCCCC(=O)Oc1cc(O)ccc2oc(=O)cc12</chem>	<b>UB*4-C12</b>	LCMS <sup>1</sup> H ЯМР (не описан ранее)

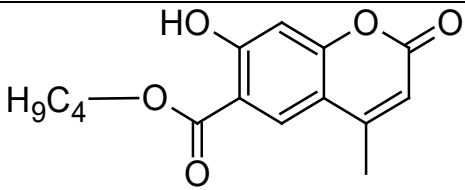
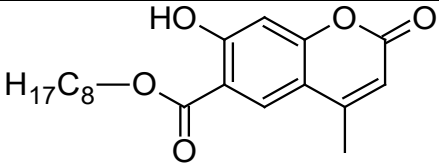
## UB4-CR

Структура соединения	Сокращение	спектры
 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)CC1=C(C(=O)O)C(=O)Oc2cc(O)ccc12</chem>	<b>UB4-C6</b>	LCMS $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ЯМР (не описан ранее)
 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)CC1=C(C(=O)O)C(=O)Oc2cc(O)ccc12</chem>	<b>UB4-C8</b>	LCMS $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ЯМР (не описан ранее)
 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)CC1=C(C(=O)O)C(=O)Oc2cc(O)ccc12</chem>	<b>UB4-C10</b>	LCMS $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ЯМР (не описан ранее)
 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)CC1=C(C(=O)O)C(=O)Oc2cc(O)ccc12</chem>	<b>UB4-C12</b>	LCMS $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ЯМР (не описан ранее)
 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)CC1=C(C(=O)O)C(=O)Oc2cc(O)ccc12</chem>	<b>UB4-N-C10</b>	LCMS (не описан ранее)

**UB4-COCR**

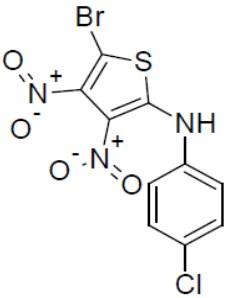
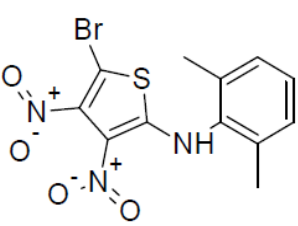
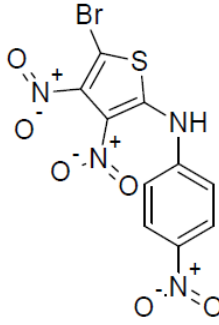
Структура соединения	Сокращение	спектры
	<b>UB4-COOC8</b>	LCMS $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ЯМР (не описан ранее)
	<b>UB4-COOC10</b>	LCMS $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ЯМР (не описан ранее)

**UB(4-Me)-6-CR**

Структура соединения	Сокращение	спектры
	<b>UB6-C4</b>	LCMS $^1\text{H}$ ЯМР (не описан ранее)
	<b>UB6-C8</b>	LCMS $^1\text{H}$ ЯМР (не описан ранее)



## Фенилтиофенамины

Структура соединения	Сокращение	спектры
	<b>BDCT</b>	LCMS $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ЯМР
	<b>BDDT</b>	LCMS $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ЯМР
	<b>BDNT</b>	LCMS $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ЯМР

## 2.2 Методы химического синтеза

### Реактивы для химического синтеза

Исходные соединения: большинство соединений было куплено в Sigma. 2,5-Дибром-3,4-динитрофен, 2,6-диметиланилин, 4-хлоранилин приобретены в Yuhao Chemical, КНР.

Растворители: хлороформ (Компонент-Реактив, Россия), метанол (J.T.Baker, Netherlands), ДМФА (PanReac&AppliChem), хлористый метилен (Компонент-Реактив, Россия), толуол (Компонент-Реактив, Россия), этилацетат (Компонент-Реактив, Россия), н-гексан (Компонент-Реактив, Россия), четыреххлористый углерод (ЭКОС-1, Россия), бутанол-1 (ЭКОС-1, Россия).

### Методы очистки и идентификации соединений

ТСХ-анализ: пластинки с силикагелем Silica gel 60 F254 (Merck, Германия).

Колоночная хроматография: силикагель MN Kieselgel 60 (Merck, Германия).

УФ лампа CAMAG с длинноволновым УФ излучением - 366 нм и коротковолновым УФ излучением - 254 нм.

LC-MS анализ: система UPLC/MS/MS, состоящая из хроматографа Acquity UPLC System (Waters, Milford, MA, USA) и квадрупольного масс-спектрометра TQD (Waters, Milford, MA, USA; регистрация сигналов масс-спектра с помощью метода ESI MS).

ЯМР спектроскопия:  $^1\text{H}$  спектры зарегистрированы на ЯМР спектрометрах Bruker Avance 300, Bruker Avance 400 и Bruker Avance IIIHD 500 на рабочих частотах 300.13 МГц, 400.13 МГц и 500.13 МГц, соответственно.  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектры были зарегистрированы на ЯМР спектрометрах Bruker Avance 400 и Bruker Avance IIIHD 500 на рабочих частотах 100.60 МГц и 125.78 МГц, соответственно.

## Получение эфиров 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты с линейными спиртами [125]

### Синтез 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты UB3-Acid

2,4-дигидроксибензальдегид (2.0 г, 14.5 ммоль), кислоту Мельдрума (2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-дион, 2.1 г, 14.5 ммоль) и  $K_2CO_3$  (0.4 г, 3 ммоль) растворили в дистиллированной воде (75 мл). Полученный желтый раствор оставили при перемешивании на 1 сутки при комнатной температуре. За полнотой протекания реакции следили по ТСХ в системе хлороформ:метанол 9:1 (исходный бензальдегид элюируется с  $R_f=0.51$ , а 7-гидроксикумарин-3-карбоновая кислота стоит на старте). Образовавшийся белый осадок отфильтровали, промыли подкисленной дистиллированной водой. Побочный продукт (вероятно, сложный эфир кислоты с  $R_f=0.45$ ) был полностью удалён при промывке этилацетатом. Выход: 2.9 г (97% от теоретического).

**LC-MS:** найдено:  $[M+H]^+$  207.00, рассчитано:  $[M+H]^+$  207.03

### Синтез гексилового эфира 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты (UB3-C6)

Смесь 7-Гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты (200 мг, 970 мкмоль), гексилового спирта (600 мг, 5.9 ммоль), концентрированной серной кислоты (75 мкл) и толуола (8 мл) кипятили в круглодонной колбе с насадкой Дина-Штарка и обратным холодильником в течение суток. Затем толуол упаривали, растворяли темный осадок в этилацетате и промывали его водой (4 раза по 5 мл  $H_2O$ ). Пятно с  $R_f = 0.64$  (по ТСХ) отделили на колонке с силикагелем в системе гексан-этилацетат 1:2 от исходной кислоты (которая в данной системе стоит на старте). Выход : 175 мг (62% от теоретического)

**$^1H$ -ЯМР** (400 МГц,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.54 (с, 1H), 7.49 (д,  $^3J_{HH} = 8.6$  Гц, 1H), 7.03 (д,  $^4J_{HH} = 1.6$  Гц, 1H), 6.94-6.96 (дд,  $^4J_{HH} = 1.6$  Гц,  $^3J_{HH} = 8.6$  Гц, 1H), 4.31 (т,  $^3J_{HH} = 6.8$  Гц, 2H), 1.74 (м, 2H), 1.40 (м, 2H), 1.3 (м, 4H), 0.87 (т, 3H);  **$^{13}C$ -ЯМР** (100 МГц,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  163.67, 163.62, 158.64, 157.31, 149.95, 131.30, 115.00, 112.60, 111.30, 103.18, 66.01 ( $OCH_2$ ), 31.39, 28.52, 25.55, 22.48, 13.96 ( $CH_3$ ). **LC-MS:** найдено  $[M+H]^+$  291.37,  $[M+Na]^+$  313.40,  $[M+Na+CH_3CN]^+$  354.42,  $[2M+Na]^+$  603.60; рассчитано  $[M+H]^+$  291.12 ( $C_{16}H_{19}O_5$ ),  $[M+Na]^+$  313.11 ( $C_{16}H_{18}NaO_5$ ),  $[M+Na+CH_3CN]^+$  354.13 ( $C_{18}H_{21}NNaO_5$ ),  $[2M+Na]^+$  603.22 ( $C_{32}H_{36}NaO_{10}$ ).

### Синтез октилового эфира 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты (UB3-C8)

Смесь концентрированной серной кислоты (75 мкл) и толуола (8 мл) кипятили в круглодонной колбе с насадкой Дина-Штарка и обратным холодильником в течение 4 часов, затем добавили 7-гидроксикумарин-3-карбоновую кислоту (200 мг, 970 мкмоль) и октиловый спирт (600 мг, 4.6 ммоль) и кипятили еще 4.5 часа. Затем толуол упарили, растворили темный остаток в этилацетате и промыли его водой (6 раз по 5 мл  $H_2O$ ). Органическую фазу высушили над сульфатом магния,

отфильтровали и упарили на роторном вакуум-испарителе. Остаток промыли горячим петролейным эфиром (три раза по 10 мл) декантациями и высушили в вакууме водоструйного насоса. Осадок, выпавший из маточного раствора, отделили декантацией и промыли петролейным эфиром. Выход: 102 мг (34% от теоретического).

**<sup>1</sup>H-ЯМР** (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 8.56 (s, 1H), 7.52 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.7 Гц, 1H), 7.05 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.8 Гц, 1H), 6.97-6.95 (dd, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.8 Гц, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.6 Гц, 1H), 4.35 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Гц, 2H), 1.81-1.76 (m, 2H), 1.47-1.41 (m, 2H), 1.38-1.29 (m, 8H), 0.90 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.6 Гц, 3H) **<sup>13</sup>C-ЯМР** (125 МГц, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 163.66, 163.61, 158.59, 157.35, 149.89, 131.34, 114.98, 112.73, 111.31, 103.12, 66.02, 31.80, 29.23, 29.18, 28.61, 25.94, 22.65, 14.10. **LC-MS**: найдено [M+H]<sup>+</sup> 319.39, [M+Na]<sup>+</sup> 341.41, [M+Na+CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup> 382.44, [2M+Na]<sup>+</sup> 659.69; рассчитано [M+H]<sup>+</sup> 319.15 (C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>O<sub>5</sub>), [M+Na]<sup>+</sup> 341.14 (C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>NaO<sub>5</sub>), [M+Na+CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup> 382.37 (C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>NNaO<sub>5</sub>), [2M+Na]<sup>+</sup> 659.28 (C<sub>36</sub>H<sub>44</sub>NaO<sub>10</sub>).

#### Синтез децилового эфира 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты (UB3-C10)

Смесь 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты (200 мг, 970 мкмоль), децилового спирта (600 мг, 3.8 ммоль), концентрированной серной кислоты (75 мкл) и толуола (8 мл) кипятили в круглодонной колбе с насадкой Дина-Штарка и обратным холодильником в течение суток. Затем толуол упаривали, растворяли темный осадок в этилацетате и промывали его водой (4 раза по 5 мл H<sub>2</sub>O). Пятно с R<sub>f</sub> = 0.76 (по ТСХ) отделили на колонке с силикагелем в системе гексан-этилацетат 1:2 от исходной кислоты (которая в данной системе стоит на старте). Выход: 108 мг (32% от теоретического).

**<sup>1</sup>H-ЯМР** (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 8.56 (s, 1H), 7.52 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.6 Гц, 1H), 7.05 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.2 Гц, 1H), 6.96-6.94 (dd, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.2 Гц, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.6 Гц, 1H), 4.35 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Гц, 2H), 1.82-1.76 (m, 2H), 1.47-1.41 (m, 2H), 1.38-1.28 (m, 12H), 0.89 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.0 Гц, 3H); **<sup>13</sup>C-ЯМР** (125 МГц, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 163.59, 163.43, 158.44, 157.36, 149.77, 131.33, 114.86, 112.95, 111.39, 103.11, 66.00, 31.89, 29.55, 29.52, 29.31, 29.27, 28.61, 25.94, 22.68, 14.12. **LC-MS**: найдено [M+H]<sup>+</sup> 347.34, [M+Na+CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup> 410.32, [2M+Na]<sup>+</sup> 715.72; рассчитано [M+H]<sup>+</sup> 347.19 (C<sub>20</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub>), [M+Na+CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup> 410.19 (C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>NNaO<sub>5</sub>), [2M+Na]<sup>+</sup> 715.35 (C<sub>40</sub>H<sub>52</sub>NaO<sub>10</sub>).

#### Синтез додецилового эфира 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты (UB3-C12)

Смесь 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты (160 мг, 0.8 ммоль), додецилового спирта (600 мг, 3.2 ммоль), концентрированной серной кислоты (75 мкл) и толуол (8 мл) кипятили в круглодонной колбе с насадкой Дина-Штарка и обратным холодильником в течение суток. Затем толуол упаривали, растворяли темный осадок в этилацетате и промывали его водой (4 раза по 5

мл H<sub>2</sub>O). Пятно с R<sub>f</sub> = 0.8 (по ТСХ) отделили на колонке с силикагелем в системе гексан-этилацетат 1:2 от исходной кислоты (которая в данной системе стоит на старте). Выход: 98мг (27% от теоретического).

**<sup>1</sup>H-ЯМР** (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 8.55 (s, 1H), 7.52 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.6 Гц, 1H), 7.04 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.2 Гц, 1H), 6.95-6.93 (dd, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.2 Гц, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.6 Гц, 1H), 4.35 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Гц, 2H), 1.82-1.76 (m, 2H), 1.47-1.41 (m, 2H), 1.37-1.28 (m, 12H), 0.90 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.9 Гц, 3H); **<sup>13</sup>C-ЯМР** (125 МГц, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 163.56, 163.24, 158.32, 157.35, 149.69, 131.32, 114.77, 113.10, 111.45, 103.12, 66.00, 31.92, 29.66, 29.64, 29.60, 29.53, 29.36, 29.28, 28.62, 25.94, 22.70, 14.13. **LC-MS**: найдено [M+H]<sup>+</sup> 375.48, [M+Na+CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup> 438.53, [2M+Na]<sup>+</sup> 771.82; рассчитано [M+H]<sup>+</sup> 375.22 (C<sub>22</sub>H<sub>31</sub>O<sub>5</sub>), [M+Na+CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup> 438.23 (C<sub>24</sub>H<sub>33</sub>NNaO<sub>5</sub>), [2M+Na]<sup>+</sup> 771.41 (C<sub>44</sub>H<sub>60</sub>NaO<sub>10</sub>).

## Получение эфиров 7-гидроксикумарин-4-уксусной кислоты с линейными спиртами

### Синтез гексилового эфира 7-гидроксикумарин-4-уксусной кислоты (UB4-C6)

7-гидроксикумарин-4-уксусная кислота (200 мг, 910 мкмоль), гексиловый спирт (150 мг, 1.5 ммоль), дициклогексилкарбодиимид (200 мг, 974 мкмоль) и 4-диметиламинопиридин (11 мг, 90 мкмоль) растворили в хлористом метиле (3 мл) и перемешивали при 0 °С 2 часа. Реакционную смесь промыли водой (4 раза по 5 мл H<sub>2</sub>O). Пятно с R<sub>f</sub> = 0.76 (по ТСХ) отделили на колонке с силикагелем в системе гексан-этилацетат 1:2 от исходной кислоты (которая в данной системе стоит на старте). Выход: 102 мг (37% от теоретического).

**<sup>1</sup>H-ЯМР** (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.43 (д, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.2 Гц, 1H), 6.83-6.85 (м, 2H), 6.22 (с, 1H), 4.12 (т, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Гц, 2H), 3.74 (с, 2H), 1.56-1.61 (м, 2H), 1.24 (м, 6H), 0.84 (т, 3H); **<sup>13</sup>C-ЯМР** (100 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 169.25 (CH<sub>2</sub>COO), 161.93, 160.42, 155.23, 149.02, 125.84, 113.75, 113.10, 112.18, 103.59, 66.16 (OCH<sub>2</sub>), 38.43 (CH<sub>2</sub>COO), 31.25, 28.34, 25.41, 22.45, 13.90 (CH<sub>3</sub>). **LC-MS**: найдено [M+H]<sup>+</sup> 305.35, [M+H+CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup> 346.44, [M+Na+CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup> 368.40, [2M+H]<sup>+</sup> 609.65, [2M+Na]<sup>+</sup> 631.61; рассчитано [M+H]<sup>+</sup> 304.14 (C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>O<sub>5</sub>), [M+H+CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup> 346.17 (C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>5</sub>), [M+Na+CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup> 368.15 (C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>NNaO<sub>5</sub>), [2M+H]<sup>+</sup> 609.27 (C<sub>34</sub>H<sub>41</sub>O<sub>10</sub>), [2M+Na]<sup>+</sup> 631.25 (C<sub>34</sub>H<sub>40</sub>NaO<sub>10</sub>).

### Синтез октилового эфира 7-гидроксикумарин-4-уксусной кислоты (UB4-C8)

7-гидроксикумарин-4-уксусная кислота (200 мг, 910 мкмоль), октиловый спирт (150 мг, 1.15 ммоль), дициклогексилкарбодиимид (200 мг, 974 мкмоль) и 4-диметиламинопиридин (11 мг, 90 мкмоль) растворили в хлористом метиле (3 мл) и перемешивали при 0 °С 2 часа. Реакционную смесь промыли водой (4 раза по 5 мл H<sub>2</sub>O). Пятно с R<sub>f</sub> = 0.79 (по ТСХ) отделили на колонке с силикагелем в системе гексан-этилацетат 1:2 от исходной кислоты (которая в данной системе стоит на старте). Выход: 81 мг (26.7% от теоретического).

**<sup>1</sup>H-ЯМР** (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.43 (д, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8 Гц, 1H), 6.83-6.85 (м, 2H), 6.21 (с, 1H), 4.11 (т, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.4 Гц, 2H), 3.74 (с, 2H), 1.57-1.61 (м, 2H), 1.22-1.26 (м, 10H), 0.85 (т, 3H); **<sup>13</sup>C-ЯМР** (100 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 169.22 (CH<sub>2</sub>COO), 161.86, 160.40, 155.25, 148.97, 125.84, 113.71, 113.11, 112.19, 103.59, 66.15 (OCH<sub>2</sub>), 38.31 (CH<sub>2</sub>COO), 31.68, 29.09, 29.05, 28.38, 25.41, 22.57, 14.03 (CH<sub>3</sub>). **LC-MS**: найдено [M+H]<sup>+</sup> 333.36, [M+H+CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup> 374.52, [M+Na+CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup> 396.28, [2M+H]<sup>+</sup> 665.68, [2M+Na]<sup>+</sup> 687.71; рассчитано [M+H]<sup>+</sup> 333.17 (C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>O<sub>5</sub>), [M+H+CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup> 374.20 (C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>5</sub>), [M+Na+CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup> 396.18 (C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>NNaO<sub>5</sub>), [2M+H]<sup>+</sup> 665.33 (C<sub>38</sub>H<sub>49</sub>O<sub>10</sub>), [2M+Na]<sup>+</sup> 687.31 (C<sub>38</sub>H<sub>48</sub>NaO<sub>10</sub>).

### Синтез децилового эфира 7-гидроксикумарин-4-уксусной кислоты (UB4-C10)

7-гидроксикумарин-4-уксусная кислота (200 мг, 910 мкмоль), дециловый спирт (150 мг, 950

мкмоль), дициклогексилкарбодиимид (200 мг, 974 мкмоль) и 4-диметиламинопиридин (11 мг, 90 мкмоль) растворили в хлористом метиле (3 мл) и перемешивали при 0 °С 2 часа. Реакционную смесь промыли водой (4 раза по 5 мл H<sub>2</sub>O). Пятно с R<sub>f</sub> = 0.82 (по ТСХ) отделили на колонке с силикагелем в системе гексан-этилацетат 1:2 от исходной кислоты (которая в данной системе стоит на старте). Выход: 110 мг (33.5% от теоретического).

**<sup>1</sup>H-ЯМР** (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.43 (д, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.4 Гц, 1H), 6.84-6.87 (м, 2H), 6.21 (с, 1H), 4.11 (т, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Гц, 2H), 3.73 (с, 2H), 1.56-1.61 (м, 2H), 1.22 (м, 14H), 0.85 (т, 3H); **<sup>13</sup>C-ЯМР** (100 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 169.19 (CH<sub>2</sub>COO), 161.88, 160.51, 155.25, 149.02, 125.82, 113.76, 113.03, 112.14, 103.58, 66.14 (OCH<sub>2</sub>), 38.31 (CH<sub>2</sub>COO), 31.83, 29.46, 29.24, 29.11, 28.38, 25.75, 22.64, 14.07 (CH<sub>3</sub>). **LC-MS**: найдено [M+H]<sup>+</sup> 361.38, [M+H+CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup> 402.47, [2M+H]<sup>+</sup> 721.71, [2M+Na]<sup>+</sup> 743.74; рассчитано [M+H]<sup>+</sup> 361.20 (C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>O<sub>5</sub>), [M+H+CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup> 402.23 (C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>5</sub>), [2M+H]<sup>+</sup> 721.40 (C<sub>42</sub>H<sub>57</sub>O<sub>10</sub>), [2M+Na]<sup>+</sup> 743.38 (C<sub>42</sub>H<sub>56</sub>NaO<sub>10</sub>).

#### Синтез додецилового эфира 7-гидроксикумарин-4-уксусной кислоты (UB4-C12)

Смесь 7-гидроксикумарин-4-уксусной кислоты (150 мг, 680 мкмоль), додецилового спирта (600 мг, 3.2 ммоль), концентрированной серной кислоты (75 мкл) и толуола (8 мл) кипятили в круглодонной колбе с насадкой Дина-Штарка и обратным холодильником в течение суток. Затем толуол упаривали, растворяли темный осадок в этилацетате и промывали его водой (4 раза по 5 мл H<sub>2</sub>O). Пятно с R<sub>f</sub> = 0.85 (по ТСХ) отделили на колонке с силикагелем в системе гексан-этилацетат 1:2 от исходной кислоты (которая в данной системе стоит на старте). Выход: 241 мг (91% от теоретического).

**<sup>1</sup>H-ЯМР** (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.48 (д, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.9 Гц, 1H), 6.90 (д, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.4 Гц, 1H), 6.86-6.88 (дд, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.9 Гц, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.4 Гц, 1H), 6.26 (с, 1H), 4.16 (т, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7 Гц, 2H), 3.77 (с, 2H), 1.61-1.67 (м, 2H), 1.27 (м, 14H), 0.9 (т, 3H); **<sup>13</sup>C-ЯМР** (125 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 169.28 (CH<sub>2</sub>COO), 161.84, 160.34, 155.29, 148.95, 125.89, 113.73, 113.24, 112.28, 103.63, 66.21 (OCH<sub>2</sub>), 38.36 (CH<sub>2</sub>COO), 31.93, 29.65, 29.56, 29.50, 29.36, 29.17, 28.43, 25.80, 22.71, 14.13 (CH<sub>3</sub>). **LC-MS**: найдено [M+H]<sup>+</sup> 389.46, [M+H+CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup> 430.61, [2M+H]<sup>+</sup> 777.94, [2M+Na]<sup>+</sup> 799.83; рассчитано [M+H]<sup>+</sup> 389.23 (C<sub>23</sub>H<sub>33</sub>O<sub>5</sub>), [M+H+CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup> 430.26 (C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>5</sub>), [2M+H]<sup>+</sup> 777.46 (C<sub>46</sub>H<sub>65</sub>O<sub>10</sub>), [2M+Na]<sup>+</sup> 799.344 (C<sub>46</sub>H<sub>64</sub>NaO<sub>10</sub>).

#### Получение N-децил-7-гидроксикумарин-4-ацетамида (4-N-C10)

7-гидроксикумарин-4-уксусная кислота (200 мг, 910 мкмоль), дециламин (150 мг, 955 мкмоль), дициклогексилкарбодиимид (200 мг, 974 мкмоль) и 4-диметиламинопиридин (11 мг, 90 мкмоль)

растворили в хлористом метиле (3 мл) и перемешивали при 0 °С 2 часа. Реакционную смесь промыли водой (4 раза по 5 мл H<sub>2</sub>O). По ТСХ в системе гексан-этилацетат 1:2 в реакционной смеси присутствует только пятно с R<sub>f</sub> = 0,71. Поэтому дополнительной очистки не проводилось. Выход: 250 мг (76% от теоретического).

**LC-MS:** найдено [M+H]<sup>+</sup> 360.48, [M+H+CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup> 401.63, [2M+H]<sup>+</sup> 719.85, [2M+Na]<sup>+</sup> 741.81; рассчитано [M+H]<sup>+</sup> 360.22 (C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>NO<sub>4</sub>), [M+H+CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup> 401.24 (C<sub>23</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), [2M+H]<sup>+</sup> 719.43 (C<sub>42</sub>H<sub>59</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), [2M+Na]<sup>+</sup> 741.41 (C<sub>42</sub>H<sub>58</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>8</sub>).

### Получение 3-октаноил-7-гидроксикумарина (UB3-C-C7)

Смесь метил-3-оксодеcanoата (423 мг, 2,11 ммоль), 2,4-дигидроксibenзальдегида (292 мг, 2,11 ммоль) и пиперидина (50 мкл) в этаноле (6 мл) нагревали при 75 °С в течение 18 ч. Объём реакционной смеси уменьшали до 3 мл, продукт осаждали добавлением воды (3 мл). Осадок отделяли центрифугированием, трижды промывали водой и высушивали в вакуум-эксикаторе над CaCl<sub>2</sub>. Выход: 261 мг (40%) светло-жёлтого порошка.

**<sup>1</sup>H NMR (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.51 (s, 1H, CH), 7.56 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.1 Гц, 1H, CH), 6.86-6.89 (m, 2H, CH), 3.13 (m, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3 Гц, 2H, COCH<sub>2</sub>), 1.70 (m, 2H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.30-1.35 (m, 8H, 4CH<sub>2</sub>), 0.90 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.4 Гц, 3H, CH<sub>3</sub>). **LC-MS (ESI):** найдено C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>O<sub>4</sub> ([M-H]<sup>-</sup>) 287.13, рассчитано 287.11.

### Получение [1-(7-гидрокси-2-оксо-2H-1-бензопиран-3-ил)октилиден]пропандинитрила (UB3-CN-C7)

120 мг UB3-C-C7, 92 мг малонитрила, 100 мг HMDS и 500 мкл уксусной кислоты нагревали при 80 °С 5 часов. Добавили этилацетат, промыли несколько раз водой, водным раствором гидрокарбоната натрия, высушили над сульфатом натрия и пропустили через силикагель. Дополнительно несколько раз растворяли в диэтиловом эфире и высаживали петролевым эфиром до получения светлого осадка. Выход составил 70% от теоретического.

**<sup>1</sup>H NMR (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>):** δ 7.87 (s, 1H, CH), 7.50 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.24 Гц, 1H, CH), 6.90-6.94 (m, 2H, CH), 3.09 (m, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.8 Гц, 2H, C(C(CN)<sub>2</sub>)CH<sub>2</sub>), 1.52 (m, 2H, C(C(CN)<sub>2</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.23-1.40 (m, 8H, 4CH<sub>2</sub>), 0.87 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.9 Гц, 3H, CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR (125 МГц, CDCl<sub>3</sub>):** δ 176.79, 162.36, 158.02, 156.52, 145.13, 130.92, 118.48, 114.70, 112.09, 111.66, 111.35, 103.29, 87.49, 35.84, 31.52, 29.17, 28.75, 28.32, 22.52, 14.02. **LC-MS (ESI):** найдено C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ([M-H]<sup>-</sup>) 335.14, рассчитано 335.13.

### Получение децилового эфира 7-метоксикумарин-3-карбоновой кислоты (Me-UB3-C10)

Смесь UB3-C10 (15 мг), (MeO)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (6,5 мг) и K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (25 мг) в 500 мкл ацетона перемешивали при комнатной температуре 2 часа. Затем добавили избыток воды и экстрагировали дихлорметаном.



Для дополнительной очистки от исходного соединения высаживали водой. Выход: 15 мг (96%) белого порошка.

**LC-MS:** найдено  $[M+H]^+$  361.07,  $[M+Na]^+$  383.28,  $[M+Na+CH_3CN]^+$  424.36,  $[2M+Na]^+$  743.16; рассчитано  $[M+H]^+$  361.20 ( $C_{21}H_{29}O_5$ ),  $[M+Na]^+$  383.44 ( $C_{21}H_{28}NaO_5$ ),  $[M+Na+CH_3CN]^+$  424.49 ( $C_{23}H_{31}NNaO_5$ ),  $[2M+Na]^+$  743.38 ( $C_{42}H_{56}NaO_{10}$ ).

## Получение эфиров 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты с 2-октанолом, L-ментолом и линалоолом

### Получение втор-октилового эфира 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты (UB3-2C8)

Метод А:

#### 1) Получение ди-втор-октилового эфира малоновой кислоты

К раствору 245 мг (2.35 ммоль, 2 экв.) малоновой кислоты, 552 мг (4.23 ммоль, 1.8 экв.) 2-октанола и 30 мг (~0.1 экв.) ДМАП в 8 мл ацетонитрила добавили раствор 970 мг (4.7 ммоль, 2 экв.) ДЦК в 5 мл ТГФ при охлаждении на ледяной бане. Оставили перемешиваться при комнатной температуре на ночь. Отфильтровали, осадок промыли хлористым метиленом и фильтрат упарили на роторном вакуум-испарителе. К остатку добавили 10 мл гексана и осадок отфильтровали. Раствор в гексане промыли 1 М соляной кислотой (2 раза по 4 мл), водой (8 мл), 2% водным раствором гидрокарбоната калия (3 раза по 5 мл), водой (8 мл), насыщенным водным раствором хлорида натрия (5 мл) и высушили над сульфатом натрия. Пропустили через толстый слой силикагеля, элюируя смесью гексан-этилацетат (5:1). Упарили на роторном вакуум-испарителе. Получили 450 мг ди-втор-октилового эфира малоновой кислоты в виде бесцветного масла. Выход составил 65% от теоретического.  $^1\text{H ЯМР}$  (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  4.93-4.99 (м, 2H,  $\text{CHCH}_3$ ), 3.31 (с, 2H,  $\text{COCH}_2$ ), 1.46-1.65 (м, 4H,  $\text{CHCH}_2$ ), 1.29 (м, 16H,  $\text{CH}_2$ ), 1.23-1.25 (д,  $^3J_{\text{HH}}=6.4$  Гц, 6H,  $\text{CHCH}_3$ ), 0.89 (т,  $^3J_{\text{HH}}=6.2$  Гц, 6H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ).

#### 2) Получение втор-октилового эфира 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты

Смесь 77 мг (0.5575 ммоль) 2,4-дигидроксибензальдегида, 221 мг (0.672 ммоль, 1.2 экв) ди-втор-октилового эфира малоновой кислоты и 50 мкл пиперидина в 4 мл изопропанола нагревали при 85 °С 24 часа. Реакционную смесь упарили на роторном вакуум-испарителе и поделили на колонке с силикагелем, сначала элюируя смесью гексан-этилацетат (3:1), затем смесью гексан-этилацетат (1:1). Чистые по ТСХ фракции объединили и упарили на роторном вакуум-испарителе. В результате выделено 60 мг целевого соединения. Выход составил 34% от теоретического.

Метод Б:

#### 1) Получение моно-втор-октилового эфира малоновой кислоты

К раствору 990 мг (9.51 ммоль, 2 экв.) малоновой кислоты, 619 мг (4.75 ммоль, 1 экв) 2-октанола и 50 мг ДМАП в 8 мл ацетонитрила добавили раствор 980 мг (4.75 ммоль, 1 экв.) ДЦК в 2 мл ТГФ при охлаждении на ледяной бане. Быстро выпал осадок. Оставили перемешиваться при комнатной температуре три часа, отфильтровали, разбавили хлороформом (10 мл) и промыли водой несколько раз. Высушили над сульфатом натрия, отфильтровали и упарили. Остаток растворили в 10 мл гексана и отфильтровали. Из гексанового раствора провели экстракцию 5%-

ным водным раствором карбоната калия (2 раза по 10 мл). К водной фазе добавили 2М серную кислоту до кислой реакции и продукт проэкстрагировали хлороформом (2 раза по 8 мл). Объединенные органические вытяжки промыли водой (2 раза по 5 мл), высушили над сульфатом натрия, отфильтровали и упарили на роторном вакуум-испарителе. Было получено 580 мг моно-втор-октилового эфира малоновой кислоты в виде бесцветного масла. Использовали без дополнительной очистки.

*2) Получение смешанного метил-втор-октилового эфира малоновой кислоты*

345 мг (1.595 ммоль) моно-втор-октилового эфира малоновой кислоты растворили в метаноле (3 мл), охладили до -12 °С, и прибавили раствор 345 мг ДЦК (1.675 ммоль, 1.05 экв.) в 1 мл ТГФ, предварительно охлажденный до -12 °С. Быстро выпал осадок, перемешивали при комнатной температуре полтора часа. Добавили несколько капель уксусной кислоты для удаления диимида и перемешивали еще 15 минут. Реакционную смесь отфильтровали и упарили. К остатку добавили 5 мл гексана, отфильтровали, раствор промыли насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия (2 раза по 4 мл), высушили над сульфатом натрия, отфильтровали и упарили. Получили 372 мг смешанного метил-втор-октилового эфира малоновой кислоты в виде бесцветного масла. Использовали без дополнительной очистки.

*3) Получение втор-октилового эфира 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты*

Смесь 357 мг (1.55 ммоль) метил-втор-октилового эфира малоновой кислоты, 214 мг (1.55 ммоль) 2,4-дигидроксибензальдегида и 50 мкл пиперидина в 3 мл этанола нагревали при 85 °С 18 часов. Добавили 10 мл воды и провели экстракцию этилацетатом (2 раза по 7 мл). Объединенные экстракты промыли 0.1 М соляной кислотой, водой (2 раза по 6 мл), насыщенным водным раствором хлорида натрия и высушили над сульфатом натрия. К раствору в этилацетате прибавили 4 мл гексана и пропустили через силикагель. Силикагель промыли смесью гексан-этилацетат (1:2). Объединенные органические фракции упарили на роторном вакуум-испарителе и почистили на колонке с силикагелем, элюируя смесью этилацетат-гексан (3:2). Чистые по ТСХ фракции объединили и упарили на роторном вакуум-испарителе. Остаток растворили в минимальном количестве метанола и высадили трехкратным количеством воды. Выпавшее масло отделили центрифугированием (11500 оборотов в течение 7 минут), растворили в 2 мл метил трет-бутилового эфира и высушили над сульфатом натрия. Осушитель отделили центрифугированием и раствор сконцентрировали на воздухе до ~200 мкл. Добавили 1.5 мл гексана. Выпавший осадок отделили фугованием (10000 оборотов в течение 2 минут), промыли гексаном и высушили в вакууме. В результате было получено 115 мг целевого вещества в виде желтоватого порошка. Суммарный выход в пересчете на 2-октанол составил ~13% от теоретического.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.54 (с, 1H, CH), ~8.3 (уш.с, 1H, OH), 7.52-7.54 (д, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=8.5 Гц, 1H, CH), 7.06-7.07 (д, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub>=1.8 Гц, 1H, CH), 6.96-6.99 (дд, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub>=2.0 Гц, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=8.5 Гц, 1H, CH), 5.15-5.22 (м, 1H, OCHCH<sub>3</sub>), 1.73-1.81 (м, 1H, CHCHH), 1.58-1.65 (м, 1H, CHCHH), 1.30-1.45 (м, 11H, 4CH<sub>2</sub>+CH<sub>3</sub>), 0.89 (м, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=6.5 Гц, 3H, CH<sub>3</sub>). **LC-MS**: рассчитано для C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>O<sub>5</sub> ([M-H]<sup>-</sup>) 317.14, найдено 317.04.

### **Получение (5R)-метил-(2S)-(2-изопропил)-(1R)-циклогексил 7-гидроксикумарин-3-карбоксилата (UB3-M)**

Метод А:

#### *3) Получение ди-L-ментолового эфира малоновой кислоты*

К суспензии 408 мг (3.92 ммоль) малоновой кислоты, 1.226 г (7.84 ммоль, 2 экв.) L-ментола и 50 мг (~0.1 экв.) ДМАП в 25 мл ТГФ добавили раствор 1.699 г (8.232 ммоль, 2.1 экв.) ДЦК в 8 мл ТГФ при охлаждении на ледяной бане. Перемешивали при комнатной температуре 5 часов. Отфильтровали, осадок промыли хлористым метиленом и фильтрат упарили на роторном вакуум-испарителе. К остатку добавили 20 мл гексана и сдкантировали с осадка. Раствор в гексане промыли 1 М соляной кислотой (2 раза по 10 мл), водой (20 мл), 2% водным раствором гидрокарбоната калия (2 раза по 10 мл), водой (20 мл), насыщенным водным раствором хлорида натрия (10 мл) и высушили над сульфатом натрия. Пропустили через толстый слой силикагеля, элюируя смесью гексан-этилацетат (3:1). Упарили на роторном вакуум-испарителе. Получили 1.250 г белого твердого вещества. Перекристаллизовали из метанола. В результате было получено 851 мг ди-L-ментолового эфира малоновой кислоты в виде белого порошка. Выход составил 57% от теоретического.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 4.70-4.79 (тд, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=11.0 Гц, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=4.3 Гц, OCH), 3.34 (с, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 2.02-2.06 (м, 2H), 1.87-1.97 (м, 2H), 1.67-1.71 (м, 4H), 1.35-1.51 (м, 4H), 0.86-1.12 (м, 18H), 0.77-0.79 (д, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=6.9 Гц, 6H, CH<sub>3</sub>).

#### *4) Получение L-ментолового эфира 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты*

Смесь 67 мг (0.485 ммоль) 2,4-дигидроксibenзальдегида, 228 мг (0.525 ммоль, 1.24 экв) ди-L-ментолового эфира малоновой кислоты и 30 мкл пиперидина в 3 мл изопропанола нагревали при 85 °C 24 часа. Реакционную смесь упарили на роторном вакуум-испарителе и поделили на колонке с силикагелем, сначала элюируя смесью гексан-этилацетат (3:1), затем смесью гексан-этилацетат (1:1). Чистые по ТСХ фракции объединили и упарили на роторном вакуум-испарителе. В результате выделено 60 мг целевого соединения. Выход составил 36% от теоретического.

Метод Б:

*1) Получение моно-L-ментолового эфира малоновой кислоты*

К раствору 984 мг (9.46 ммоль, 2.03 экв.) малоновой кислоты, 727 mg (4.65 ммоль, 1 экв.) L-ментола и 50 мг ДМАП в 8 мл ацетонитрила добавили раствор 960 мг (4.65 ммоль, 1 экв.) ДЦК в 2 мл ТГФ при охлаждении на ледяной бане. Быстро выпал осадок. Оставили перемешиваться при комнатной температуре на ночь, отфильтровали, разбавили хлороформом (10 мл) и промыли водой несколько раз. Высушили над сульфатом натрия, отфильтровали и упарили. Остаток растворили в 7 мл гексана и отфильтровали. Из гексанового раствора провели экстракцию 5%-ным водным раствором карбоната калия (2 раза по 10 мл). К водной фазе добавили 2М серную кислоту до кислой реакции и продукт проэкстрагировали хлороформом (2 раза по 8 мл). Объединенные органические вытяжки промыли водой (2 по 5 мл), высушили над сульфатом натрия, отфильтровали и упарили. Было получено 770 мг моно-L-ментолового эфира малоновой кислоты в виде бесцветного масла. Использовали без дополнительной очистки.

*2) Получение смешанного метил-L-ментолового эфира малоновой кислоты*

463 mg (1.911 ммоль) моно-L-ментолового эфира малоновой кислоты растворили в метаноле (3 мл), охладили до -12 °С, и прибавили раствор 434 мг ДЦК (2.1 ммоль, 1.1 экв.) в 1 мл ТГФ, предварительно охлажденный в морозилке до -12 °С. Быстро выпал осадок, перемешивали при комнатной температуре 3.5 часа. Добавили несколько капель уксусной кислоты для удаления диимида и перемешивали еще 15 минут. Реакционную смесь отфильтровали и упарили. К остатку добавили 10 мл гексана, отфильтровали, промыли 5%-ным водным раствором гидрокарбоната калия (3 раза по 3 мл), высушили над сульфатом натрия, отфильтровали и упарили. Получили 452 мг смешанного метил-L-ментилового эфира малоновой кислоты в виде бесцветного масла. Использовали без дополнительной очистки.

*3) Получение L-ментолового эфира 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты*

К раствору 221 мг (0.862 ммоль) метил-L-ментилового эфира малоновой кислоты и 125 мг (0.905 ммоль, 1.05 экв.) 2,4-дигидроксибензальдегида в 4 мл изопропанола прибавили 50 мкл пиперидина и реакционную смесь оставили в темноте при комнатной температуре на 4 суток. Добавили 10 мл этилацетата, 10 мл насыщенного водного раствора хлористого натрия и 2 мл 1М соляной кислоты и перемешивали несколько минут. Отделили органический слой, из водной фазы провели экстракцию этилацетатом (3 мл). Объединенные органические фазы промыли водой (три раза по 5 мл) и насыщенным водным раствором хлористого натрия. Высушили над сульфатом натрия и отфильтровали. К фильтрату добавили половину объема гексана и раствор пропустили через силикагель. Силикагель промыли смесью гексан:этилацетат (1:2). Объединенные органические фракции упарили. Остаток в виде темного масла растворили в 1 мл метанола и высадили 4.5 мл воды. Маслянистый осадок отделили фугованием (11500 оборотов в течение 7 минут) и повторили процедуру переосаждения водой из метанола еще раз.

Маслянистый осадок растворили в 7 мл этилацетата, раствор высушили над сульфатом натрия, отфильтровали и упарили на роторном вакуум-испарителе. Поделили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле, элюируя смесью гексан:этилацетат:CF<sub>3</sub>COOH (3:2:0.1%). Чистые по ТСХ фракции объединили и упарили на роторном вакуум-испарителе. Остаток растворили в 400 мкл метил-трет-бутилового эфира и высадили добавлением 1.5 мл гексана. Отфуговали (10000 оборотов в течение 2 минут), отделили осадок и промыли гексаном. Высушили в вакууме. 140 мг целевого продукта в виде аморфного порошка кремового цвета. Суммарный выход в пересчете на L-ментол составил 30% от теоретического.

<sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.54 (с, 1H, CH), 7.52-7.54 (д, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=8.5 Гц, 1H, CH), 7.07 (д, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub>=2.0 Гц, 1H, CH), 6.96-6.99 (дд, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub>=2.2 Гц, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=8.5 Гц, 1H, CH), 4.93-5.02 (дт, 1H, OCH), 1.09-2.15 (м, 9H), 0.92-0.95 (м, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.79-0.81 (д, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=6.9 Гц, 3H, CHCH<sub>3</sub>). LC-MS: рассчитано для C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>O<sub>5</sub> ([M-H]<sup>-</sup>) 343.15, найдено 343.11.

### Получение 3,7-диметил-1,6-октадиен-3-ил 7-гидроксикумарин-3-карбоксилата (UB3-L)

#### 1) Получение моно-линалоового эфира малоновой кислоты

К раствору 984 мг (9.46 ммоль, 2.03 экв.) малоновой кислоты, 727 mg (4.65 ммоль, 1 экв) L-ментола и 50 мг ДМАП в 6 мл ТГФ добавили раствор 972 мг (4.71 ммоль, 1.01 экв.) ДЦК в 2 мл ТГФ при охлаждении на ледяной бане. Быстро выпал осадок. Оставили перемешиваться при комнатной температуре на ночь, отфильтровали, разбавили хлороформом (10 мл) и промыли водой несколько раз. Высушили над сульфатом натрия, отфильтровали и упарили. Остаток растворили в 5 мл гексана и отфильтровали. Из гексанового раствора провели экстракцию 5%-ным водным раствором карбоната калия (2 раза по 10 мл). К водной фазе добавили 2М серную кислоту до кислой реакции и продукт проэкстрагировали хлороформом (2 раза по 8 мл). Объединенные органические вытяжки промыли водой (2 по 5 мл), высушили над сульфатом натрия, отфильтровали и упарили на роторном вакуум-испарителе. Было получено 588 мг моно-линалоового эфира малоновой кислоты в виде бесцветного масла. Использовали без дополнительной очистки.

#### 2) Получение смешанного метил-линалоового эфира малоновой кислоты

588 mg (2.45 ммоль) моно-линалоового эфира малоновой кислоты растворили в метаноле (3 мл), охладили до -12 °С, и прибавили раствор 540 мг ДЦК (2.62 ммоль, 1.07 экв.) в 1.5 мл ТГФ, предварительно охлажденный до -12 °С. Быстро выпал осадок, перемешивали при комнатной температуре 3 часа. Добавили несколько капель уксусной кислоты для удаления диимида и перемешивали еще 15 минут. Реакционную смесь отфильтровали и упарили. К остатку добавили 7 мл гексана, отфильтровали, раствор промыли 5%-ным водным раствором гидрокарбоната калия (2 раза по 3 мл), высушили над сульфатом натрия, отфильтровали и упарили на роторном вакуум-

испарителе. Получили 600 мг смешанного метил-линалоолового эфира малоновой кислоты в виде бесцветного масла. Использовали без дополнительной очистки.

### 3) *Получение линалоолового эфира 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты*

К раствору 336 мг (1.32 ммоль) метил-L-ментилового эфира малоновой кислоты и 182 мг (1.32 ммоль, 1 экв.) 2,4-дигидроксibenзальдегида в 4 мл изопропанола прибавили 100 мкл пиперидина и реакционную смесь оставили в темноте при комнатной температуре на 3 суток. Добавили 10 мл этилацетата, 10 мл насыщенного водного раствора хлористого натрия и 2 мл 1М соляной кислоты и перемешивали несколько минут. Отделили органический слой, из водной фазы провели экстракцию этилацетатом (5 мл). Объединенные органические фазы промыли водой (три раза по 8 мл) и насыщенным водным раствором хлористого натрия. Высушили над сульфатом натрия и отфильтровали. К фильтрату добавили половину объема гексана и раствор пропустили через силикагель. Силикагель промыли смесью гексан-этилацетат (1:2). Объединенные органические фракции упарили. Остаток в виде темного масла растворили в 1.5 мл метанола и высадили 6 мл воды. Маслянистый осадок отделили фугованием (11500 оборотов в течение 7 минут) и повторили процедуру переосаждения водой из метанола еще раз. Маслянистый осадок растворили в 7 мл ЭА и раствор высушили над сульфатом натрия, отфильтровали и упарили на роторном вакуум-испарителе. Поделили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле, элюируя смесью гексан:этилацетат (3:2). Чистые по ТСХ фракции объединили и упарили на роторном вакуум-испарителе. Остаток растворили в 300 мкл метил-трет-бутилового эфира и добавили 1.5 мл гексана. Убрали в морозилку при -12 °C на ночь. Отфуговали (10000 оборотов в течение 2 минут), отделили осадок и промыли гексаном. Высушили в вакууме. 125 мг линалоолового эфира 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты в виде желтого порошка. Суммарный выход в пересчете на линалоол составил 14% от теоретического.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.45 (р, 1H, CH), 7.49-7.51 (д, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=8.5 Гц, 1H, CH), 7.02 (с, 1H, CH), 6.92-6.94 (д, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=8.5 Гц, 1H, CH), 6.06-6.13 (дд, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=11.0 Гц, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=17.5 Гц, 1H, CH=CH<sub>2</sub>), 5.32-5.37 (д, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=17.2 Гц, 1H, CH=CHH), 5.21-5.24 (д, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=10.8 Гц, 1H, CH=CHH), 5.12-5.15 (т, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C=CH), 1.89-2.14 (м, 4H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 1.72 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.68 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.62 (с, 3H, CH<sub>3</sub>). **LC-MS**: рассчитано для C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>O<sub>5</sub> ([M-H]<sup>-</sup>) 341.14, найдено 341.05.

## Получение сложных эфиров 7-гидроксикумарин-4-карбоновой кислоты

### Получение бутилового эфира 7-гидроксикумарин-4-карбоновой кислоты (UB\*4-C4)

#### 1) *Получение дибутилмалата*

Смесь 4.2 г (0.0313 моль) яблочной кислоты, 8.5 г (0.0616 моль, 2 экв.) карбоната калия и 14 г (0.102 моль, 3.3 экв.) бутил бромиды нагревали в 40 мл ДМСО при 70-80 °С три часа и оставили на ночь при комнатной температуре. На следующий день реакционную смесь разбавили 50 мл воды и провели экстракцию метиленом (3 раза по 30 мл). Объединенные экстракты промыли водой пять раз, высушили над сульфатом магния и упарили на роторном вакуум-испарителе. В результате было получено 5.79 г дибутилового эфира яблочной кислоты в виде бесцветного масла. Использовали без дополнительной очистки.

#### 2) *Получение дибутилового эфира щавелевоуксусной кислоты.*

Приготовили реактив Джонса из 4.2 г дихромата аммония, 6.3 г воды и 4 мл серной кислоты. К раствору дибутилмалата в 30 мл ацетона добавляли реактив Джонса порциями по 200 мкл до устойчивой желтой окраски (периодически добавляли несколько капель серной кислоты). Реакционная смесь при этом разогревается, поэтому ее температуру поддерживали около 25 °С с помощью водяной бани. Прибавили 1 мл изопропанола для удаления окислителя. Добавили 30 мл воды и провели экстракцию петролейным эфиром (3 раза по 20 мл). Объединенные экстракты промыли водой три раза и высушили над сульфатом магния, отфильтровали и упарили на роторном вакуум-испарителе. В результате было получено 4.6 г дибутилового эфира щавелевоуксусной кислоты в виде желтоватого масла. Использовали без дополнительной очистки.

#### 3) *Получение бутилового эфира умбеллиферон-4-карбоновой кислоты*

В 1.8 г сухого бутанола растворили 140 мг (6.09 ммоль) натрия при нагревании до 70 °С. Раствор бутилата натрия охладили до комнатной температуры и прибавили раствор 1.0 г (4.1 ммоль) дибутил оксосукцината и 700 мг (6.36 моль) резорцина в 7 мл бутанола. Смесь нагревали час при 80 °С. К реакционной смеси добавили 1М серную кислоту до слабокислой реакции и провели экстракцию хлористым метиленом, содержащим 10% этилацетата (3 раза по 5 мл). Объединенные экстракты промыли водой (4 раза по 7 мл), высушили над сульфатом магния и отфильтровали. Упарили на роторном вакуум-испарителе при нагревании до 60 °С для удаления бутанола. Остаток в виде 1.3 г оранжевого масла промыли гексаном и растворили в минимальном количестве эфира. Добавили 3-хкратный объем гексана и оставили при -12 °С на ночь. Сдекантировали раствор и осадок растворили в 5 мл хлороформа. Промыли водой для удаления резорцина (3 раза по 5 мл) и высушили над сульфатом магния. Отфильтровали, добавили пол-объема этилацетата и пропустили через силикагель. Упарили, промыли гексаном и высушили в



вакууме. В результате было выделено 465 мг бутилового эфира 7-гидроксикумарин-4-карбоновой кислоты в виде желтого порошка. Суммарный выход в пересчете на яблочную кислоту составил 26%.

**$^1\text{H}$  ЯМР** (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.19-8.21 (д,  $^3J_{\text{HH}}=8.9$  Гц, 1H, CH), 7.31 (с, 1H, OH), 7.04-7.05 (д,  $^4J_{\text{HH}}=1.9$  Гц, 1H, CH), 6.92-6.94 (д,  $^3J_{\text{HH}}=8.9$  Гц, 1H, CH), 6.80 (с, 1H, CH), 4.42 (т,  $^3J_{\text{HH}}=6.4$  Гц, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 1.76-1.83 (м, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 1.45-1.55 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.01 (т,  $^3J_{\text{HH}}=7.3$  Гц, 3H,  $\text{CH}_3$ ). **LC-MS**: рассчитано для  $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_5$  ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ) 261.08, найдено 260.84.

### Получение 7-гидроксикумарин-4-карбоновой кислоты (UB\*-4-COOH)

224 мг (0.854 ммоль) бутилового эфира 7-гидроксикумарин-4-карбоновой кислоты растворили в избытке 5% водного раствор KOH (5 экв.). Через 5 мин по ТСХ реакция полностью прошла. Реакционную смесь оставили при комнатной температуре еще на 10 минут и добавили 1М серную кислоту до слабокислой реакции. Провели экстракцию этилацетатом (3 раза по 3 мл). Объединенные экстракты промыли насыщенным раствором хлористого натрия (2 раза по 5 мл), высушили над сульфатом магния, отфильтровали и сконцентрировали на ротормном вакуум-испарителе до 2 мл. Прибавили 10 мл гексана, дали отстояться и сдантировали. Осадок промыли гексаном и высушили в вакууме. В результате было получено 130 мг (74%) 7-гидроксикумарин-4-карбоновой кислоты в виде желтого порошка.  **$^1\text{H}$  ЯМР** (300 МГц,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  7.96-7.99 (д,  $^3J_{\text{HH}}=8.7$  Гц, 1H, CH), 6.82-6.85 (д,  $^3J_{\text{HH}}=8.7$  Гц, 1H, CH), 6.76 (с, 1H, CH), 6.54 (с, 1H, CH) (т,  $^3J_{\text{HH}}=6.6$  Гц, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

### Получение октилового эфира 7-гидроксикумарин-4-карбоновой кислоты (UB\*4-C8)

К 32 мг (0.155 ммоль) 7-гидроксикумарин-4-карбоновой кислоты прибавили 100 мг (0.77 ммоль) октанола и 100 мкл серной кислоты и нагревали 70 °C два часа при интенсивном перемешивании. Реакционную смесь охладили до комнатной температуры, добавили 5 мл этилацетата, промыли водой (2 раза по 3 мл), насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия (3 раза по 3 мл) и водой (2 раза по 3 мл) и насыщенным водным раствором хлористого натрия (2 мл). Высушили над сульфатом магния, сдантировали, пропустили через слой силикагеля и упарили на ротормном вакуум-испарителе. Растворили при слабом нагревании в 0.4 мл диэтилового эфира и добавили 1.5 мл гексана. Осадок отфуговали (10000 оборотов в течение 2 минут), суспендировали в гексане и снова отфуговали. Повторили процедуру переосаждения из диэтилового эфира еще раз. Растворили в 400 мкл хлористого метилена и добавили 1.5 мл гексана. Осадок отфуговали (10000 оборотов в течение 2 минут), суспендировали в гексане и снова отфуговали. В результате было выделено 21 мг целевого соединения в виде желтого порошка. Выход составил 43% от теоретического.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.20-8.22 (д, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=8.9 Гц, 1H, CH), 6.97-6.98 (д, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub>=2.5 Гц, 1H, CH), 6.92-6.94 (дд, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=8.9 Гц, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub>=2.5 Гц, 1H, CH), 6.81 (с, 1H, CH), 6.37 (уш.с, 1H, OH), 4.40 (т, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=6.7 Гц, 2H, OCH<sub>2</sub>), 1.76-1.84 (м, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.31-1.46 (м, 10H, 5CH<sub>2</sub>), 0.91 (т, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=6.4 Гц, 3H, CH<sub>3</sub>). **LC-MS**: рассчитано для C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>O<sub>5</sub> ([M-H]<sup>-</sup>) 317.14, найдено 317.10.

#### Получение децилового эфира 7-гидроксикумарин-4-карбоновой кислоты (UB\*4-C10)

Смесь 240 мг (1.52 ммоль) деканола и 240 мг гидрата толуолсульфокислоты нагревали в вакууме водоструйного насоса полчаса при 70 °С. При этом суспензия превратилась в гомогенное масло. Добавили 2 мл дихлорэтана и 44 мг (0.213 ммоль) 7-гидроксикумарин-4-карбоновой кислоты и нагревали при 70 °С два часа. Образовался гомогенный раствор. Реакционную смесь охладили до комнатной температуры, добавили 5 мл этилацетата, промыли водой (2 раза по 3 мл), насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия (3 раза по 3 мл) и водой (2 раза по 3 мл), насыщенным водным раствором хлористого натрия (2 мл) и высушили над сульфатом магния. Пропустили через слой силикагеля и упарили на роторном вакуум-испарителе. Остаток растворили в 400 мкл хлористого метилена, добавили 1.5 мл гексана и оставили в морозилке (-12 °С) на ночь. Осадок отфуговали (10000 оборотов в течение 2 минут), суспендировали в 1.5 мл гексана и снова отфуговали. Процедуру переосаждения и промывания повторили еще раз. В результате было выделено 36 mg целевого соединения в виде желтого порошка. Выход составил 49% от теоретического.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.20-8.22 (д, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=8.9 Гц, 1H, CH), 6.98-6.99 (д, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub>=2.5 Гц, 1H, CH), 6.88-6.91 (дд, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=8.9 Гц, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub>=1.9 Гц, 1H, CH), 6.81 (с, 1H, CH), 6.49 (уш.с, 1H, OH), 4.40 (т, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=6.7 Гц, 2H, OCH<sub>2</sub>), 1.77-1.84 (м, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.30-1.47 (м, 14H, 7CH<sub>2</sub>), 0.90 (т, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=6.7 Гц, 3H, CH<sub>3</sub>). **LC-MS**: рассчитано для C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>O<sub>5</sub> ([M-H]<sup>-</sup>) 345.17, найдено 345.08.

#### Получение додецилового эфира 7-гидроксикумарин-4-карбоновой кислоты (UB\*4-C12)

Смесь 200 мг (1.07 ммоль) деканола и 200 мг гидрата толуолсульфокислоты нагревали в вакууме водоструйного насоса полчаса при 70 °С. При этом суспензия превратилась в гомогенное масло. Добавили 2 мл дихлорэтана и 38 мг (0.184 ммоль) 7-гидроксикумарин-4-карбоновой кислоты и нагревали при 70 °С два часа. Образовался гомогенный раствор. Реакционную смесь охладили до комнатной температуры, добавили 5 мл этилацетата, промыли водой (2 раза по 3 мл), насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия (3 раза по 3 мл) и водой (2 раза по 3 мл), насыщенным водным раствором хлористого натрия (2 мл) и высушили над сульфатом магния. Пропустили через слой силикагеля и упарили на роторном вакуум-испарителе. Остаток растворили в 400 мкл хлористого метилена, добавили 1.5 мл гексана и оставили в морозилке (-

12 °C) на ночь. Осадок выделили фугованием (10000 оборотов в течение 2 минут), суспендировали в 1.5 мл гексана и снова отфуговали. Процедуру переосаждения и промывания повторили еще два раза. В результате было выделено 43 mg целевого соединения в виде желтого порошка. Выход составил 62% от теоретического.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.20-8.22 (д, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=8.9 Гц, 1H, CH), 7.00-7.01 (д, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub>=2.5 Гц, 1H, CH), 6.89-6.92 (дд, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=8.9 Гц, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub>=2.5 Гц, 1H, CH), 6.81 (с, 1H, CH), 6.65 (уш.с, 1H, OH), 4.40 (т, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=6.7 Гц, 2H, OCH<sub>2</sub>), 1.77-1.86 (м, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.28-1.47 (м, 18H, 9CH<sub>2</sub>), 0.90 (т, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=6.7 Гц, 3H, CH<sub>3</sub>). **LC-MS**: рассчитано для C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>O<sub>5</sub> ([M-H]<sup>-</sup>) 373.20, найдено 373.14.

## Получение сложных эфиров 7-гидроксикумарин-4-глиоксалевой кислоты

### Получение децилового эфира 7-гидроксикумарин-4-глиоксалевой кислоты (UB4-SOC10)

Нагревали смесь 100 мг (0.277 ммоль) децилового эфира 7-гидроксикумарин-4-уксусной кислоты и 740 мг (5.74 ммоль, >20 экв) селенистой кислоты в 4 мл амилацетата при 130 град в открытой виале в течение 2.5 часов. Реакционную смесь охладили до комнатной температуры. Осадок отфуговали, суспендировали в этилацетате и снова отфуговали. Маточные растворы объединили и сконцентрировали на роторном вакуум-испарителе. К остатку добавили равный объем гексана и нанесли на колонку с силикагелем. Сначала элюировали гексаном, чтобы смыть амилацетат, и затем элюировали смесью этилацетат-гексан (2:1). Чистые по ТСХ фракции объединили и упарили на роторном вакуум-испарителе. К остатку добавили 2 мл гексана и оставили на несколько часов для кристаллизации. Осадок отфуговали (10000 оборотов в течение 2 минут), промыли гексаном и высушили в вакууме. В результате было получено 90 мг целевого продукта в виде желтого порошка. Выход составил 87% от теоретического.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.90-7.91 (д, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=8.9 Гц, 1H, CH), 7.79 (уш.с, 1H, OH), 6.97-6.98 (д, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub>=1.8 Гц, 1H, CH), 6.89-6.91 (дд, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=8.9 Гц, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub>=2.1 Гц, 1H, CH), 6.66 (с, 1H, CH), 4.40 (т, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=7.0 Гц, 2H, OCH<sub>2</sub>), 1.76-1.82 (м, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.28-1.42 (м, 14H, 7CH<sub>2</sub>), 0.90 (т, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=6.8 Гц, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C ЯМР (125 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 185.74, 161.22, 160.99, 160.78, 156.09, 144.37, 127.67, 116.57, 114.32, 108.21, 103.75, 67.68 (OCH<sub>2</sub>), 31.87, 29.49, 29.44, 29.28, 29.13, 28.33, 25.72, 22.68, 14.12 (CH<sub>3</sub>). LC-MS: рассчитано для C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>O<sub>6</sub> ([M-H]<sup>-</sup>) 373.17, C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>O<sub>7</sub> ([M+H<sub>2</sub>O-H]<sup>-</sup>) 391.18, найдено 373.18, 391.20.

### Получение октилового эфира 7-гидроксикумарин-4-глиоксалевой кислоты (UB4-SOC8)

Нагревали смесь 117 мг (0.352 ммоль) октилового эфира 7-гидроксикумарин-4-уксусной кислоты и 740 мг (5.74 ммоль, >16 экв) селенистой кислоты в 4 мл амилацетата при 130 град в открытой виале в течение 2.5 часов. Реакционную смесь охладили до комнатной температуры. Осадок отфуговали, суспендировали в этилацетате и снова отфуговали. Маточные растворы объединили и сконцентрировали на роторном вакуум-испарителе. К остатку добавили равный объем гексана и нанесли на колонку с силикагелем. Сначала элюировали гексаном, чтобы смыть амилацетат, и затем элюировали смесью этилацетат-гексан (2:1). Чистые по ТСХ фракции объединили и упарили на роторном вакуум-испарителе. К остатку добавили 2 мл гексана и оставили на несколько часов для кристаллизации. Осадок отфуговали (10000 оборотов в течение 2 минут), промыли гексаном и высушили в вакууме. В результате было получено 90 мг целевого продукта в виде желтого порошка. Выход составил 74% от теоретического.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.95 (уш.с, 1H, OH), 7.88-7.89 (д, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=9.2 Гц, 1H, CH), 6.99 (д, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub>=2.1 Гц, 1H, CH), 6.90-6.92 (дд, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=9.2 Гц, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub>=2.4 Гц, 1H, CH), 6.66 (с, 1H, CH), 4.40 (т, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=6.8 Гц, 2H, OCH<sub>2</sub>), 1.76-1.81 (м, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.28-1.43 (м, 10H, 5CH<sub>2</sub>), 0.89 (т, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=6.8 Гц, 3H, CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C ЯМР** (125 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 185.63, 161.17, 161.09, 161.06, 156.03, 144.60, 127.67, 116.34, 114.44, 108.23, 103.75, 67.73 (OCH<sub>2</sub>), 31.73, 29.09, 29.08, 28.32, 25.71, 22.62, 14.08 (CH<sub>3</sub>). **LC-MS**: рассчитано для C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>O<sub>6</sub> ([M-H]<sup>-</sup>) 345.13, C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>O<sub>7</sub> ([M+H<sub>2</sub>O-H]<sup>-</sup>) 363.14, найдено 345.14, 363.17

## Получение сложных эфиров 7-гидрокси-4-метилкумарин-6-карбоновой кислоты

### Получение 7-гидрокси-4-метилкумарин-6-карбоновой кислоты

Сделано по методике [126] с некоторыми изменениями.

К смеси 1.0 г (7.24 ммоль) 2,4-дигидроксibenзойной кислоты и 4.0 г (30.07 ммоль, >4 экв.) ацетоуксусного эфира медленно добавили 5 мл серной кислоты при интенсивном перемешивании и охлаждении на ледяной бане. Смесь перемешивали 30 минут при комнатной температуре и 8 часов при 40 °С. Оставили на ночь при комнатной температуре. Охладили до комнатной температуры, добавили к 50 мл охлажденной воды и перемешивали 15 минут. Выпавший осадок отфильтровали, промыли водой. Суспендировали в ацетоне и отфуговали (10000 оборотов в течение 1.5 минут). Процедуру промывания ацетоном повторили еще два раза и один раз промыли диэтиловым эфиром и высушили в вакууме. В результате было выделено 740 мг целевого соединения в виде белого порошка. Выход составил 46% от теоретического. <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.13 (с, 1H, CH), 6.92 (с, 1H, CH), 6.27 (с, 1H, CH), 2.42 (с, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H ЯМР спектр совпадает с литературным [126]. LC-MS: рассчитано для C<sub>11</sub>H<sub>7</sub>O<sub>5</sub> ([M-H]<sup>-</sup>) 219.03, найдено 218.88.

### Получение бутилового эфира 7-гидрокси-4-метилкумарин-6-карбоновой кислоты (UB6-C4)

Нагревали смесь 60 мг (0.273 ммоль) 7-гидрокси-4-метилкумарин-6-карбоновой кислоты и 50 мкл серной кислоты в бутаноле (1 мл) при 100 °С в течение 5 часов. Реакционную смесь охладили до комнатной температуры и разбавили хлористым метиленом (3 мл). Промыли водой (2 раза по 2 мл), 2% водным раствором карбоната калия (2 раза по 2 мл) и снова водой (2 раза по 2 мл) и насыщенным водным раствором хлористого натрия (1 мл). Высушили над сульфатом натрия, отфильтровали и упарили на роторном вакуум-испарителе. Остаток суспендировали в гексане, отфуговали и высушили в вакууме. В результате было получено 45 мг целевого соединения. Выход составил 60% от теоретического.

<sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 11.28 (с, 1H, OH), 8.11 (с, 1H, CH), 6.90 (с, 1H, CH), 6.18 (с, 1H, CH), 4.43 (т, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=6.6 Гц, 2H, OCH<sub>2</sub>), 2.44 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.78-1.88 (м, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.44-1.57 (м, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.03 (т, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=7.3 Гц, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). LC-MS: рассчитано для C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>O<sub>5</sub> ([M-H]<sup>-</sup>) 275.09, найдено 274.94.

### Получение октилового эфира 7-гидрокси-4-метилкумарин-6-карбоновой кислоты (UB6-C8)

Нагревали смесь 100 мг (0.454 ммоль) 7-гидрокси-4-метилкумарин-6-карбоновой кислоты, 148 мг (0.455 ммоль, 1 экв.) карбоната цезия и 88 мг (0.454 ммоль, 1 экв) н-октилбромида в 2 мл

ДМФА при 75 °C в течение 12 часов. Реакционную смесь отфуговали и добавили 4 мл этилацетата. Промыли водой (5 раз по 4 мл), высушили над сульфатом магния и отфильтровали. Раствор пропустили через силикагель и упарили на роторном вакуум-испарителе. Остаток суспендировали в гексане, убрали в морозилку (-12 °C) на ночь, отфуговали и высушили в вакууме. В результате было получено 82 мг целевого соединения. Выход составил 53% от теоретического. По данным ЯМР спектроскопии есть около 12 моль% примеси диоктильного производного. **<sup>1</sup>H ЯМР** (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 11.28 (с, 1H, OH), 8.11 (с, 1H, CH), 6.89 (с, 1H, CH), 6.19 (с, 1H, CH), 4.42 (т, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=6.6 Гц, 2H, OCH<sub>2</sub>), 2.44 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.79-1.88 (м, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.31-1.46 (м, 10H, 5CH<sub>2</sub>), 0.90 (уш.с, 3H, CH<sub>3</sub>). **LC-MS**: рассчитано для C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>O<sub>5</sub> ([M-H]<sup>-</sup>) 331.15, найдено 331.07.

## Получение октилового эфира 7-гидрокси-6-нитрокумарин-3-карбоновой кислоты (NO2-UV3-C8)

### *1) Получение 2,4-дигидрокси-5-нитробензальдегида*

К раствору 710 мг (5.14 ммоль) 2,4-дигидроксиальдегида в 3 мл уксусной кислоты добавили смесь 3.3 г 56% азотной кислоты и 2 мл уксусной кислоты при охлаждении льдом в течение 15 минут. Охлаждение убрали и перемешивали при комнатной 5 часов. Вылили в 20 мл воды. Охладили суспензию на ледяной бане и осадок отфильтровали. Отфильтрованный осадок растворили в хлористом метиле, высушили над сульфатом натрия и пропустили через силикагель, элюируя хлористым метилом. Упарили на роторном-вакуум-испарителе. В результате было получено 415 мг 2,4-дигидрокси-5-нитробензальдегида в виде белого порошка. Выход составил 44% от теоретического.

### *2) Получение 7-гидрокси-6-нитрокумарин-3-карбоновой кислоты [127].*

Смесь 183 мг 2,4-дигидрокси-5-нитробензальдегида и 165 мг кислоты Мельдрума в 6 мл воды перемешивали при комнатной температуре в течение суток. Осадок отфуговали (11000 оборотов в течение 2 минут) и маточный раствор сдкантировали. Осадок промыли водой: для этого его суспендировали в 4 мл воды, отфуговали и маточный раствор сдкантировали. Процедуру промывания водой повторили еще два раза. Продукт высушили в вакуумном эксикаторе над хлористым кальцием. В результате было выделено 200 мг 7-гидрокси-6-нитрокумарин-3-карбоновой кислоты в виде оранжевого порошка. Выход составил 80% от теоретического.

### *3) Получение октилового эфира 7-гидрокси-6-нитрокумарин-3-карбоновой кислоты*

Смесь 100 мг (0.4 ммоль) 7-гидрокси-6-нитрокумарин-3-карбоновой кислоты, 260 мг (5 экв.) октанола и 100 мг моногидрата толуолсульфокислоты в 3 мл толуола нагревали при 115-120 град в закрытой виале в течение 1 часа. Охладили до комнатной температуры и добавили 7 мл ЭА и 7 мл воды. Органический слой отделили, промыли водой (5 мл), 2% водным раствором гидрокарбоната калия (3 раза по 5 мл), водой (5 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (5 мл). Высушили над сульфатом натрия, отфильтровали, добавили равный объем хлористого метилена и пропустили через силикагель, элюируя смесью хлористый метилен-этилацетат (1:1). Упарили на роторном вакуум-испарителе. К остатку добавили 10 мл гексана и оставили на два часа при -12 °C. Раствор сдкантировали, к осадку добавили 5 мл гексана, дали отстояться и раствор сдкантировали. Продукт растворили в 300 мкл хлороформа при слабом нагревании и добавили 1.5 мл гексана. Осадок отфуговали (10000 оборотов в течение 2 минут) и раствор сдкантировали. Осадок суспендировали в 1.5 мл гексана, отфуговали (10000 оборотов в течение 2 минут) и раствор сдкантировали. Продукт высушили в вакууме. В результате было выделено 102 мг целевого продукта в виде желтого порошка. Выход составил 71% от теоретического.



**<sup>1</sup>H ЯМР** (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 11.05 (с, 1H, OH), 8.51 (с, 1H, CH), 8.50 (с, 1H, CH), 7.07 (с, 1H, CH), 4.36 (т, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=6.9 Гц, 2H, OCH<sub>2</sub>), 1.74-1.83 (м, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.30-1.45 (м, 10H, 5CH<sub>2</sub>), 0.90 (т, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=6.6 Гц, 3H, CH<sub>3</sub>). **LC-MS**: рассчитано для C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>7</sub> ([M-H]<sup>-</sup>) 362.12, найдено 362.10.

## Получение производных фенилтиофенамина

### Получение 5-бром-N-(4-хлорфенил)-3,4-динитро-2-тиофенамина (BDCT).

Суспензию 332 мг (1,00 ммоль) 2,5-дибром-3,4-динитротииофена в 3 мл этанола нагревали до кипения и по каплям добавляли раствор 255 мг (2,00 ммоль) 4-хлоранилина в 0,8 мл этанола. Реакционную смесь кипятили в течение часа, охлаждали до комнатной температуры и разбавляли 10 мл воды. Продукт экстрагировали метилендихлоридом (3 мл × 3). Объединенные экстракты промывали 2 М HCl (5 мл × 2), затем водой (5 мл × 4) и сушили над сульфатом магния. Раствор метилендихлорида пропускали через силикагель и упаривали в вакууме. Остаток перекристаллизовывали из этанола. 180 мг оранжевого порошка (48%).

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  10.05 (s, 1H, NH), 7.50-7.52 (d,  $^3J_{\text{HH}}=8.8$  Гц, 2H, CH), 7.33-7.34 (d,  $^3J_{\text{HH}}=8.5$  Гц, 2H, CH).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  156.35.02, 135.79, 133.96, 130.75, 124.11, 94.09. LC-MS (ESI $^-$ ): рассчитано для  $\text{C}_{10}\text{H}_4^{79}\text{Br}^{35}\text{ClN}_3\text{O}_4\text{S}$  ([M-H] $^-$ ) 375.88,  $\text{C}_{10}\text{H}_4^{81}\text{Br}^{35}\text{ClN}_3\text{O}_4\text{S}$  ([M-H] $^-$ ) 377.88, найдено 375.82, 377.88.

### Получение 5-бром-N-(2,6-диметилфенил)-3,4-динитро-2-тиофенамина (BDDT):

Смесь 119 мг (0,358 ммоль) 2,5-дибром-3,4-динитротииофена и 87 мг (0,718 ммоль) 2,6-диметиланилина в 3 мл этанола нагревали при 80 °C в течение 5 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли 6 мл метилендихлорида, промывали 2 М HCl (5 мл × 3), водой (5 мл × 2) и сушили над сульфатом натрия. Раствор метилендихлорида пропускали через силикагель и упаривали в вакууме. Остаток перекристаллизовывали из этанола. Получили 94 мг (70%) оранжево-желтого порошка.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.45 (s, 1H, NH), 7.31-7.34 (t,  $^3J_{\text{HH}}=7.6$  Гц, 1H, CH), 7.24-7.25 (d,  $^3J_{\text{HH}}=7.3$  Гц, 2H, CH), 2.33 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  160.41, 135.91, 134.78, 130.22, 129.68, 94.16, 17.88. LC-MS (ESI $^-$ ): рассчитано для  $\text{C}_{12}\text{H}_9^{79}\text{BrN}_3\text{O}_4\text{S}$  ([M-H] $^-$ ) 369.95,  $\text{C}_{12}\text{H}_9^{81}\text{BrN}_3\text{O}_4\text{S}$  ([M-H] $^-$ ) 371.95, найдено 369.99, 371.92.

### Получение 5-бром-3,4-динитро-N-(4-нитрофенил)-2-тиофенамина (BDNT):

Суспензию 101 мг (0,304 ммоль) 2,5-дибром-3,4-динитротииофена и 84 мг (0,608 ммоль, 2 экв.) 4-нитроанилина в 2 мл бутанола нагревали при 80 °C в течение 3 суток. После охлаждения до комнатной температуры осадок отделяли центрифугированием и промывали этанолом и эфиром. Целевой продукт очищали методом колоночной хроматографии, используя смесь  $\text{CHCl}_3$ -этилацетат (7:1) в качестве подвижной фазы. Получено 60 мг (51%) оранжевого порошка.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  11.11 (br s, 1H, NH), 8.31-8.33 (d,  $^3J_{\text{HH}}=9.2$  Гц, 2H, CH), 7.76- 7.78 (d,  $^3J_{\text{HH}}=8.9$  Гц, 2H, CH).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  154.98, 145.67, 145.09, 140.23, 126.00,

123.12, 122.00, 98.34. **LC-MS** (ESI<sup>-</sup>): рассчитано для  $\text{C}_{10}\text{H}_4^{79}\text{BrN}_4\text{O}_6\text{S}$  ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ) 386.90,  $\text{C}_{10}\text{H}_4^{81}\text{BrN}_4\text{O}_6\text{S}$  ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ) 388.90, найдено 386.98, 388.91.

## 2.3 Методы биофизического анализа

**Выделение митохондрий крыс.** Митохондрии крысы выделяли из печени, сердца или почек 21-недельным самцов *Rattus Norvegicus* линии Wistar по методике [128]. Выделение и очистка проводились в среде 250 мМ сахарозы, 20 мМ MOPS, 1 мМ ЭДТА, pH = 7.4 дифференциальным центрифугированием. Дополнительную очистку проводили в той же среде в присутствии бычьего сывороточного альбумина (0,1 мг/мл). Концентрацию полученных митохондрий оценивали по содержанию общего белка по методу Биурета: среднее значение составляло 0.6-0.9 мг белка/мл. Стандартные названия фракций: RLM (rat liver mitochondria), RHM (rat heart mitochondria), RKM (rat kidney mitochondria).

**Получение митохондриальных матриксов.** Суспензия изолированных митохондрий крысы была обработана ультразвуком в течение 5 минут и отцентрифугирована сначала на 5000g, затем на 50000g для отделения мембранных белков. Стандартные названия фракций: RLMm (rat liver mitochondria matrix), RHMm (rat heart mitochondria matrix).

**Измерения мембранного потенциала** проводили с помощью регистрации разности оптического поглощения красителя сафранина О при 555 нм и при 523 нм на спектрофотометре Aminco DW-2 в двуволновом режиме при температуре 24°. В среду измерения, которая содержала 250 мМ сахарозы, 1 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 мМ MOPS-KOH (pH 7.4) и 1 мМ EGTA, добавляли 7 мкг митохондриального белка/мл и 15 мкМ сафранина О.

**Измерение набухания митохондрий.** Аликвоту митохондрий добавляли к 1 мл среды (145 мМ АсК, 5 мМ Трис, 0.2 мМ ЭДТА, 0.5 мкМ валиномицина, 1 мкМ ротенона при pH 7.4). Набухание митохондрий регистрировали как уменьшение оптической плотности суспензии при 550 нм.

**Измерение митохондриального дыхания.** Скорость потребления кислорода выделенными митохондриями крысы измеряли полярографическим кислородным электродом Кларка на респирометре Strathkelvin Instruments 782. Среда измерения содержала 250 мМ сахарозы, 20 мМ MOPS, 1 мМ ЭДТА, pH=7,4. Конечная концентрация митохондрий (общего митохондриального белка) в ячейке составляла 1,0 мг/мл.

**Измерение проводимости на бислойной липидной мембране.** Бислойную плоскую липидную мембрану (БЛМ) формировали на 0.6-мм отверстии измерительной ячейки из тефлона

(рисунок 36). Для этого 2% раствор DPhPC в декане сначала наносили на отверстие, простукивали и высушивали для удаления спирта и формирования более стабильной мембраны. Затем отсеки ячейки заполняли буфером (100 мМ KCl, 10 мМ Tris, 10 мМ MES, pH 7.4), а саму мембрану формировали с помощью пузырька воздуха.

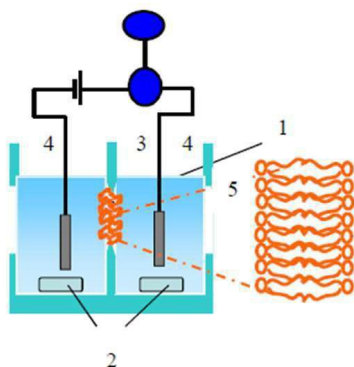


Рисунок 36. Схема прибора измерения электрического тока через БЛМ. 1- ячейки, заполненные буфером; 2 – магнитные мешалки; 3 – тefлоновая перегородка с отверстием; 4 – хлорсеребряные электроды; 5 – прозрачное окошко для визуального наблюдения.

**Опыты с использованием тонкослойной хроматографии (ТСХ).** В 500мкл сахарозного буфера (250 мМ сахарозы, 5 мМ Tris, 0.2 мМ ЭДТА, pH=7.4) добавляли 1мкл 10мМ UB3-C10 и 10 мкл суспензии митохондрий. После инкубации определенное время (по умолчанию – 10 минут) смесь центрифугировали при 500g на настольной центрифуге Eppendorf MiniSpin и супернатант наносили на пластину ТСХ. Визуализация проводилась в УФ-кабинете при возбуждении УФ светом с длиной волны 365 нм. В системе гексан:этилацетат 1:2 сложный эфир UB3-C10 имеет  $R_f=0.82$ , а кислота UB3-Acid  $R_f=0$ . Для дополнительного подтверждения гидролиза супернатант в моменты времени 2 и 8 отдавали на LC-MS анализ.

**Молекулярный докинг.** Теоретический расчёт возможности гидролиза сложных эфиров умбеллиферона проводили на ALDH2 (PDB 3inj; структура человеческой альдегиддегидрогеназы 2 с агонистом Alda-1c разрешением 1.69 Å) и CES1 (PDB 1ya4; структура человеческой карбоксилэстеразы CES1 в комплексе с тамоксифеном с разрешением 3.20 Å). На первой стадии структуры белков были подготовлены в программе BUILD MODEL (BioMolTech Corp., Revision 20211224). Расчёт проводился в программе Lead Finder (BioMolTech Corp., Revision 20211224), а визуализация результатов докинга – в программе PyMOL. Каталитические аминокислотные остатки в обоих случаях окрашивали в оранжевый цвет, остальные – в белый, а мешающие обзору и неформирующие субстрат-связывающий карман удаляли.

#### **Аффинное выделение ALDH2.**

Буфер №1: 50 mM NaCl / 2 mM бензамидин / 1 mM EDTA / 0.1 mM дитиотреитол / 20 mM Mops-NaOH буфер pH=7.4, 15 мл

Буфер №2: 50 mM NaCl / 2 mM бензамидин / 1 mM EDTA / 0.1 mM дитиотреитол / 500 mM 4-гидрокси- $\alpha$ -цианокоричная кислота / 20 mM Mops-NaOH буфер pH=7.4, 15 мл

Буфер №3: 50 mM NaCl / 2 mM бензамидин / 1 mM EDTA / 0.1 mM дитиотреитол / 500 mM 4-гидрокси- $\alpha$ -цианокоричная кислота / 1M NaCl / 20 mM Mops-NaOH буфер pH=7.4

### **Модификация сефарозы-4В [129], [130]**

5 мл раствора Sepharose-4В промыли водой на стеклянном фильтре, перенесли в виалку, добавили 1,9 мл 70% диглицидилового эфира 1,4-бутандиола и 1,9 мл 0,6 М NaOH с 2 мг/мл NaBH<sub>4</sub>. Перемешивали при комнатной температуре на лабораторном шейкере в течение ночи. Отфильтровали и промыли сорбент 200мл воды. Переместили в виалку, добавили 5 мл буфера №1 и оставили на шейкере на сутки. Промыли сорбент водой, добавили 10 мл буфера №2, оставили на шейкере на 2 часа и ещё раз промыли 200мл воды. Структура полученного сорбента изображена на рисунке 47.

### **Аффинная хроматография в batch-версии [130]**

В эппендорфе на 2 мл промыли 100 мкл сорбента буфером №1 (3 раза добавляли 500 мкл буфера, перемешивали, центрифугировали при 500 g на Eppendorf MiniSpin). Добавили 200 мкл матрикса RLM, перемешали, осадили сорбент и отобрали супернатант – «проскок». По три раза промыли колонку 300мкл буфера №1 – раунд «промывка», буфером №2 – «элюция-1», буфером №3 – «элюция-2».

Раствор после первой и второй промывки буфером №2 (фракция «элюция-1») отдали на масс-спектрометрический анализ. Результаты представлены в таблице 1 – 46% фракции составил целевой белок ALDH2.

Его активность была проверена по гидролизу пара-нитрофенил ацетата (pNPA): в кювете к 950мкл PBS буфера и 50мкл раствору ALDH2 после аффинной хроматографии добавлялся 1мкл 10мМ pNPA. Вследствие отщепления ацетатой защиты оптическое поглощение раствора при 400нм росло. Этот процесс чувствителен к DSF и UB4-COC8. Однако, гидролитической активности по отношению к UB3-C10 методом TCX обнаружено не было.

Peptide Coverage (%)	Peptide Area	Peptide Area %	Avg. Mass	Protein Name
57	6,17E+08	46,41	56517	Aldehyde dehydrogenase mitochondrial OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Aldh2 PE=1 SV=2
66	8,25E+07	6,21	35684	Malate dehydrogenase mitochondrial OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Mdh2 PE=1 SV=2
45	3,09E+07	2,32	56345	ATP synthase subunit beta OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Atp5f1b PE=1 SV=1
45	3,09E+07	2,32	56354	ATP synthase subunit beta mitochondrial OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Atp5f1b PE=1 SV=2
33	2,20E+07	1,66	164579	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia] mitochondrial OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Cps1 PE=1 SV=1
3	2,17E+07	1,63	111388	Protein phosphatase 1 regulatory subunit OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Ppp1r12b PE=1 SV=1
45	2,04E+07	1,53	39201	Hydroxyacid oxidase 2 OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Hao2 PE=1 SV=2
1	1,65E+07	1,24	201924	Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 1 OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Sipa1l1 PE=1 SV=1
41	1,64E+07	1,23	57659	Aldehyde dehydrogenase X mitochondrial OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Aldh1b1 PE=1 SV=1
45	1,37E+07	1,03	47873	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase mitochondrial OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Acadl PE=1 SV=1
20	1,23E+07	0,93	56813	Keratin type I cytoskeletal 10 OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Krt10 PE=1 SV=1
19	1,23E+07	0,93	56505	Keratin type I cytoskeletal 10 OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Krt10 PE=3 SV=1
35	1,09E+07	0,82	59754	ATP synthase subunit alpha mitochondrial OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Atp5f1a PE=1 SV=2
35	1,09E+07	0,82	59813	ATP synthase subunit alpha OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Atp5f1a PE=1 SV=1
13	9,80E+06	0,74	12382	Prothymosin alpha OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Ptma PE=1 SV=2
37	8,17E+06	0,61	36172	Delta(3 5)-Delta(2 4)-dienoyl-CoA isomerase mitochondrial OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Ech1 PE=1 SV=2
15	7,96E+06	0,60	64831	Keratin type II cytoskeletal 1 OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Krt1 PE=2 SV=1
15	7,96E+06	0,60	64757	Keratin type II cytoskeletal 1 OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Krt1 PE=1 SV=1
42	7,73E+06	0,58	55765	Serine hydroxymethyltransferase OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Shmt2 PE=1 SV=1
53	7,57E+06	0,57	41885	3-ketoacyl-CoA thiolase mitochondrial OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Acaa2 PE=1 SV=3
46	7,56E+06	0,57	59757	Catalase OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Cat PE=1 SV=3
23	7,03E+06	0,53	59249	Keratin type II cytoskeletal 6A OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Krt6a PE=1 SV=1
60	6,25E+06	0,47	10902	10 kDa heat shock protein mitochondrial OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Hspe1 PE=1 SV=3
22	6,14E+06	0,46	39886	Ornithine carbamoyltransferase mitochondrial OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Otc PE=1 SV=1
1	6,08E+06	0,46	164127	Nestin OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Nes PE=1 SV=3
0	6,08E+06	0,46	198621	Isoform 2 of Nestin OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Nes
0	6,08E+06	0,46	208911	Nestin OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Nes PE=1 SV=1
0	6,08E+06	0,46	208795	Nestin OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Nes PE=1 SV=2
20	5,68E+06	0,43	13422	Histone H2A OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=H2afz PE=3 SV=1
20	5,68E+06	0,43	13553	Histone H2A.Z OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=H2az1 PE=1 SV=2
20	5,68E+06	0,43	13509	Histone H2A OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=H2afv PE=3 SV=1
1	5,56E+06	0,42	94323	ArfGAP with SH3 domain ankyrin repeat and PH domain 2 OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Asap2 PE=1 SV=1
2	5,15E+06	0,39	47024	Serpin A11 OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Serpina11 PE=2 SV=2
2	5,15E+06	0,39	51494	Isoform 2 of Serpin A11 OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Serpina11
1	4,61E+06	0,35	551766	Isoform 3 of Protein piccolo OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Pclo
1	4,61E+06	0,35	552723	Protein piccolo OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Pclo PE=1 SV=1
46	4,22E+06	0,32	68759	Serum albumin OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Alb PE=1 SV=1

Таблица 1. Результаты масс-спектрометрического анализа итогов аффинной хроматографии, отсортированные по убыванию количественного содержания.

**Ингибиторный анализ методом ТСХ.** Качественный анализ влияния различных метаболитов, ингибиторов и синтезированных соединений на скорость гидролиза децилового эфира 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты (UB3-C10) проводился аналогично другим опытам на ТСХ. В 300мкл буфера (250 мМ сахараза, 5 мМ Tris, 0.2 мМ ЭДТА, pH=7.4) добавлялось 10мкл 1мМ UB3-C10 и исследуемый ингибитор. Далее добавляли 10мкл суспензии митохондрий или  $\epsilon$ 2884 (~130 нг/мл), перемешивали и после инкубации определенное время (по умолчанию – 10 минут) смесь центрифугировалась при 500g на настольной центрифуге Eppendorf MiniSpin, а супернатант наносили на пластину ТСХ. Параллельно проводилось 5-10 опытов, а также контрольный без ингибитора. Визуализация проводилась в УФ-кабинете при возбуждении УФ светом с длиной волны 365 нм после ТСХ в системе гексан:этилацетат 1:2 (сложный эфир UB3-C10 имеет  $R_f=0.82$ , а кислота UB3-Acid имеет  $R_f=0$ ). Сравнение проводилось визуально: если пятно кислоты светилось тусклее, чем в контрольном опыте (а пятно сложного эфира ярче), то делался вывод об ингибиторной активности соответствующей добавки. Добавки: PMSF 200мкМ, TTFA 8мкМ, все производные умбеллиферона - 20 мкМ,  $\alpha$ -кетоглутарат 0.1М, малат 0.1М, оксалоацетат 1М, сукцинат 1М, глутамат 1М, оксалат 1М, CDNB 2 мкМ, 2-HQ 100 мкМ, лоперамид 2 мкМ, DSF 12 мкМ, дайдин 10 мкМ, Triton X-100 1 мкМ, CATR 1 мкМ, СССР 100 нМ,  $NAD^+$  1 мкМ, ацетозоламид 1 мкМ.

**Гель-фильтрация.** Выделение ses проводили по методике [131]. Стеклянная колонка (30 см х 1 см) с sephadex g-100 была уравновешена MOPS буфером с pH=7.4. Разделение 20 мкл матриксов RLM и RHM проходило в том же буфере, фракции по 500мкл собирали в эппендорфы. Для проверки гидролитической активности в каждый эппендорф добавляли по 1 мкл 10 mM UB3-S10. После инкубации в течение ночи по 1 капле каждой фракции наносили на ТСХ пластинку. Интенсивность синего канала на фотографии пятен фракции (см. рисунок 52) пропорциональна скорости гидролиза в ней (так как UB3-Acid флуоресцирует значительно сильнее). Далее был проведён масс-спектрометрический анализ фракций RLMm №№ 8, 11, 13, 14, 15, 17, 20, охватывающих весь пик активности. Полученные результаты сочли удовлетворительными, поэтому дальнейшего выделения ses не проводили.



### 3.1 Сложные эфиры 7-гидроксикумарин-3-карбоновой и 7-гидроксикумарин-4-уксусной кислот. Методики химического синтеза

Как указывалось выше, разобщители переносят протоны из межмембранного пространства в матрикс, для чего им необходимо обладать достаточной липофильностью.

Как было сказано в обзоре литературы, умбеллиферон имеет гидроксильную группу в 7-ом положении с рКа близким к физиологическим значениям [132], однако его разобщающая активность очень слабая в силу низкой гидрофобности. Следуя результатам работ нашей лаборатории по разобщающей активности производных флуоресцеина [133], 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-CH<sub>2</sub>COOH). Они являются коммерчески доступными соединениями, однако UB-3-COOH является весьма дорогим веществом, что побудило нас получить её в лаборатории. Требуемая кислота была синтезирована по известной методике, основанной на реакции 2,4-дигидроксibenзальдегида с кислотой Мельдрума (рисунок 37) [134].

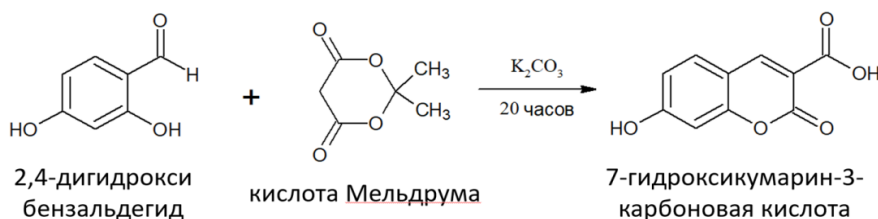


Рисунок 37. Методика синтеза умбеллиферон-3-карбоновой кислоты.

В литературе [135-137] представлено множество методик синтеза сложных эфиров вообще, и сложных эфиров 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты в частности [136], [138-140]. Однако, из-за плохой растворимости исходных кислот большинство оказались неэффективными.

Итоговая методика получения производных 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты – прямая этерификация с пара-толуолсульфоновой кислотой; а 7-гидроксикумарин-4-уксусной кислоты – синтез с применением дициклогексилкарбодиимида [141-143] или прямая этерификация кислоты спиртом в присутствии серной кислоты в случае UB4-C12 (рисунок 38).

Здесь и далее, все целевые соединения были получены в чистом виде и охарактеризованы методами ВЭЖХ-масс-спектрометрии (LC-MS), ЯМР и УФ спектроскопии.

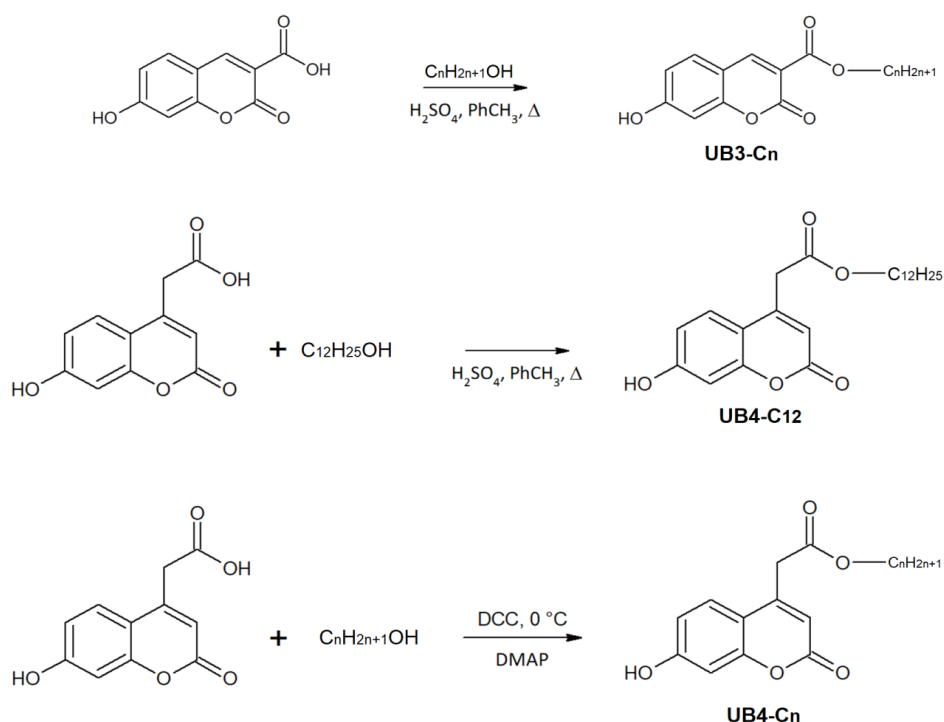


Рисунок 38. Подобранные методики синтеза сложных эфиров умбеллиферон-3-карбоновой и -4-уксусной кислот. Для UB3-C<sub>n</sub> – прямая этерификация с пара-толуолсульфоновой кислотой в кипящем толуоле, для UB4-C<sub>n</sub> – этерификация с 1,3-дициклогексилкарбодиимидом (DCC) в присутствии 4-диметиламинопиридина (DMAP) в дихлорметане, а для UB4-C<sub>12</sub> – прямая этерификация с серной кислотой в кипящем толуоле.

### 3.2 Биофизические эксперименты по измерению активности разобщителей окислительного фосфорилирования

Биофизические исследования разобщающей способности новых соединений были выполнены несколькими методами: измерения мембранного потенциала, скорости дыхания и набухания изолированных митохондрий, а также опыты на бислойной липидной мембране.

#### 3.2.1. Измерения мембранного потенциала выделенных митохондрий.

В наших экспериментах мы используем митохондрии, выделенные из различных тканей крыс *Rattus Norvegicus* линии Wistar дифференциальным центрифугированием [128]. Для их энергизации используют сукцинат – субстрат комплекса II дыхательной цепи – в присутствии олигомицина А, ингибитора АТФ-синтазы, и ротенона, ингибитора комплекса I. В таких условиях перенос электронов с сукцината на кислород через комплексы 2-4 приводит к генерации разности электрохимических потенциалов ионов водорода на внутренней мембране митохондрий, которая при этом не расходуется на фосфорилирование АДФ (так как АТФ-синтаза заингибирована), а также не происходит обратный транспорт электронов через 1 комплекс из-за присутствия ротенона. Другим субстратом дыхания может служить смесь глутамата и малата. В этом случае запускается цикл Кребса и комплекс 1 [144]: малат ингибирует комплекс 2, а также окисляется до оксалоацетата (ОАА) с помощью малатдегидрогеназы (MDH), генерируя NADH в

процессе. Глутамат, с другой стороны, может быть преобразован в б-кетоглутарат (бКГ) трансаминированием с ОАА через аспаратаминотрансферазу (AST). Такой путь сдвигает равновесие малатдегидрогеназной реакции, а бКГ входит в цикл трикарбоновых кислот, дополнительно стимулируя производство NADH и FADH<sub>2</sub>. Однако, величина достигаемого мембранного потенциала при такой энергизации ниже, поэтому субстратом «по умолчанию» является сукцинат.

Для оценки изменений мембранного потенциала энергизованных митохондрий использовали сафранин О. Этот потенциал-зависимый краситель накапливается в отрицательно заряженных митохондриях и образует агрегаты, при этом разность величин оптического поглощения ( $A_{523} - A_{555}$ ) пропорциональна величине мембранного потенциала и будет тем меньше, чем эффективнее разобщитель переносит протоны сквозь мембрану.

В опытах по измерению мембранного потенциала в присутствии синтезированных сложноэфирных производных умбеллиферона на митохондриях печени крысы (RLM) (которые в нашей лаборатории, как это принято в биоэнергетике, всегда использовались «по умолчанию» для исследования разобщителей) была обнаружена выраженная разобщающая активность этих соединений, которая, однако, исчезала в минутной шкале (рисунок 39).

В серии эфиров 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты самым сильным разобщителем оказался дециловый эфир 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 с другими соединениями полученных серий.

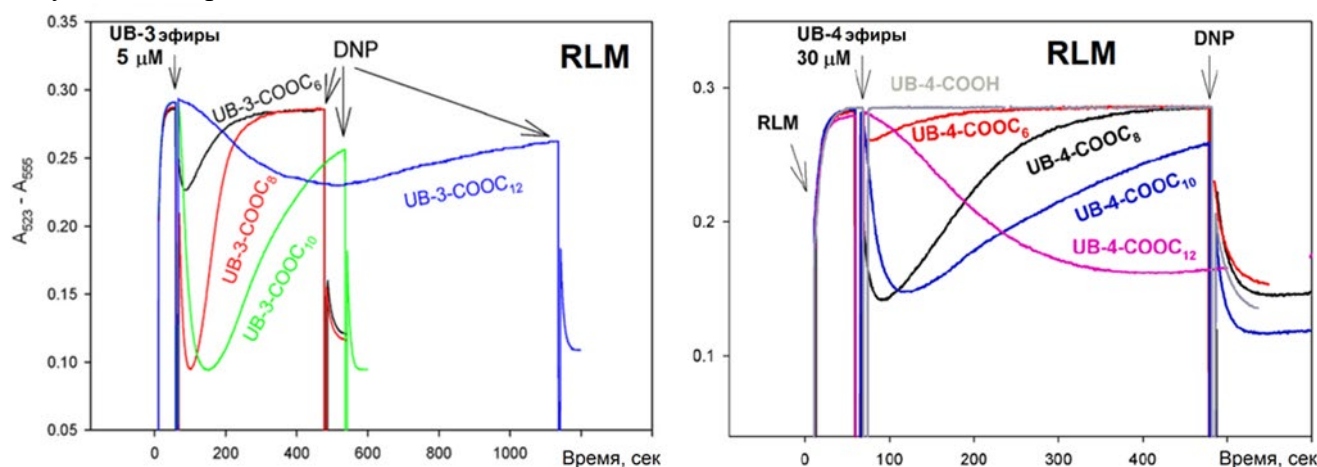
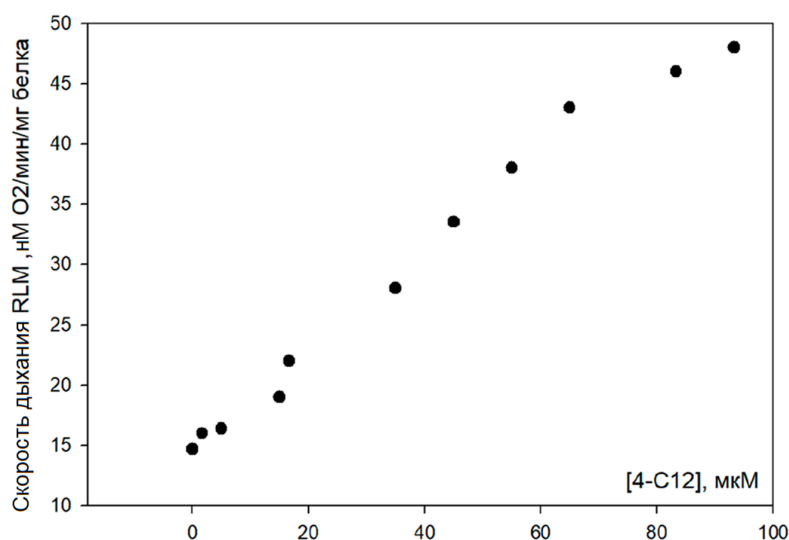


Рисунок 39. Эффект сложных эфиров умбеллиферон-3-карбоновой кислоты (UB3-Сп, 5 мкМ) и умбеллиферон-4-уксусной кислоты (UB4-Сп, 30 мкМ) на мембранный потенциал изолированных митохондрий печени крысы, измеренный с помощью потенциал-чувствительного красителя сафранина О. По оси ординат – разность величин оптического поглощения ( $A_{523} - A_{555}$ ), которая пропорциональна величине мембранного потенциала. В обеих сериях наиболее активными оказались дециловые и октиловые эфиры, но в концентрациях почти на порядок выше в случае UB4-производных. Обнаружено полное исчезновение их разобщающей активности в минутной шкале – очень редкое свойство разобщителей. Стрелками показывается момент добавки.

### 3.2.2. Измерения дыхания выделенных митохондрий.

Наблюдаемый сброс мембранного потенциала может происходить по двум причинам: протонофорной активности или ингибирования дыхания. В первом случае (при истинном разобщении) происходит ускорение дыхания, так как снимается торможение процесса переноса электрона по дыхательной цепи мембранным потенциалом. Поэтому необходимо проверить эффект добавления разобщителей на скорость дыхания энергизированных митохондрий (концентрация кислорода измеряется полярографическим кислородным электродом Кларка). Важно отметить, 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 всегда наблюдалось его ингибирование при больших концентрациях разобщителей.

Опыты по дыханию на RLM (рисунок 40) показали ускорение дыхания UB4-C12 – самым медленно гидролизуемым сложным эфиром.



*Рисунок 40. Стимулирование дыхания додециловым эфиром умбеллиферон-4-уксусной кислоты UB4-C12. Зависимость скорости поглощения кислорода (в мкМ O<sub>2</sub>/мин/мг белка) от концентрации разобщителя. Ингибирования в разобщающих концентрациях не происходит.*

### 3.2.3. Измерения набухания выделенных митохондрий.

Для измерения протонофорной активности соединений в дезэнергизованных митохондриях проводили эксперимент по набуханию митохондрий в калий-ацетатной среде в присутствии валиномицина [145]. Валиномицин – селективный переносчик калия – переносит его из диссоциированного ацетата внутрь митохондрий, в то время как ацетатный ион не может пройти через внутреннюю мембрану, поэтому процесс лимитирован законом сохранения заряда. Однако протонофор снижает pH снаружи (перетаскивая протоны напрямую через внутреннюю мембрану), тем самым запуская процесс образования недиссоциированных молекул уксусной кислоты. В таком виде ацетат-ионы могут проникнуть через внутреннюю мембрану, что

вызывает накопление ацетата калия в матриксе. При этом митохондрии набухают, а оптическая плотность раствора уменьшается. Результаты измерения набухания митохондрий в присутствии UB3-C8 представлены на рисунке 41.

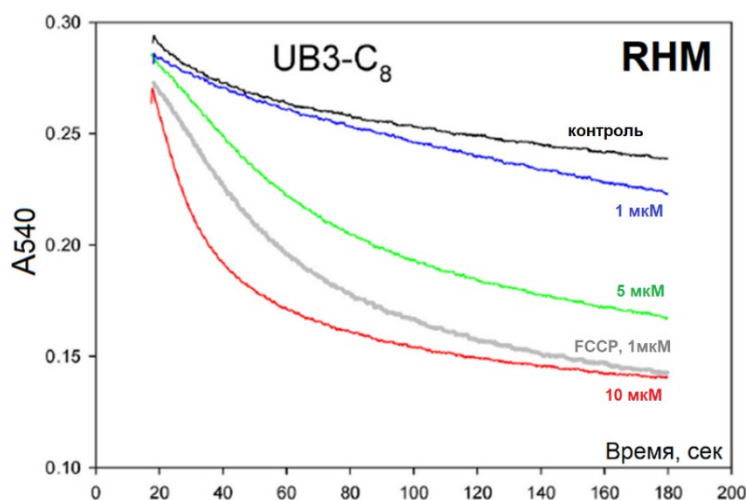


Рисунок 41. Набухание изолированных митохондрий сердца крысы (RHM) в калий-ацетатном буфере в присутствии 1 мкМ валиномицина и 1 мкМ ротенона и UB3-C8 в различной концентрации подтверждает протонофорную природу разобщающего действия синтезированных соединений.

### 3.2.4. Измерения индукции электрического тока через искусственную БЛМ.

Вольтамперные характеристики протонофорной активности исследовались на искусственной плоской бислойной липидной мембране (БЛМ) по зависимости величины электрического тока от приложенного напряжения. В ходе эксперимента по определению ионной селективности [146] напряжение менялось от +50 мВ до -50 мВ с шагом в 10 мВ и величина сдвига потенциала нулевого тока сравнивается с теоретической величиной: так как распределение ионов по обе стороны мембраны описывается уравнением Нернста:  $RT \ln c_1 + zF\varphi_1 = RT \ln c_2 + zF\varphi_2$ . Следовательно:

$$\varphi = \varphi_1 - \varphi_2 = \frac{RT}{zF} \ln \frac{c_2}{c_1}.$$

При нормальных условиях для одновалентных ионов  $\Delta\varphi = 0,059 \lg \frac{c_2}{c_1}$ , что в отсутствие и при наличии градиента pH в двух отсеках измерительной ячейки составляет около 74 мВ. Величина сдвига потенциала нулевого тока для UB4-C10 при pH1=8,11 и pH2=9,36 составила 50 мВ (рисунок 42, А). Тот факт, что полученное в эксперименте значение оказалось ниже, свидетельствует о неидеальной протонной селективности такого ионофора. Для подтверждения анионной природы разобщителя изучается эффект флоретина – ток через плоскую липидную мембрану при его добавлении уменьшается (рисунок 42, В), что можно объяснить снижением проницаемости мембраны для анионной формы разобщителя

(флоретин обладает большим дипольным моментом, встраивается в мембрану и снижает её дипольный потенциал).

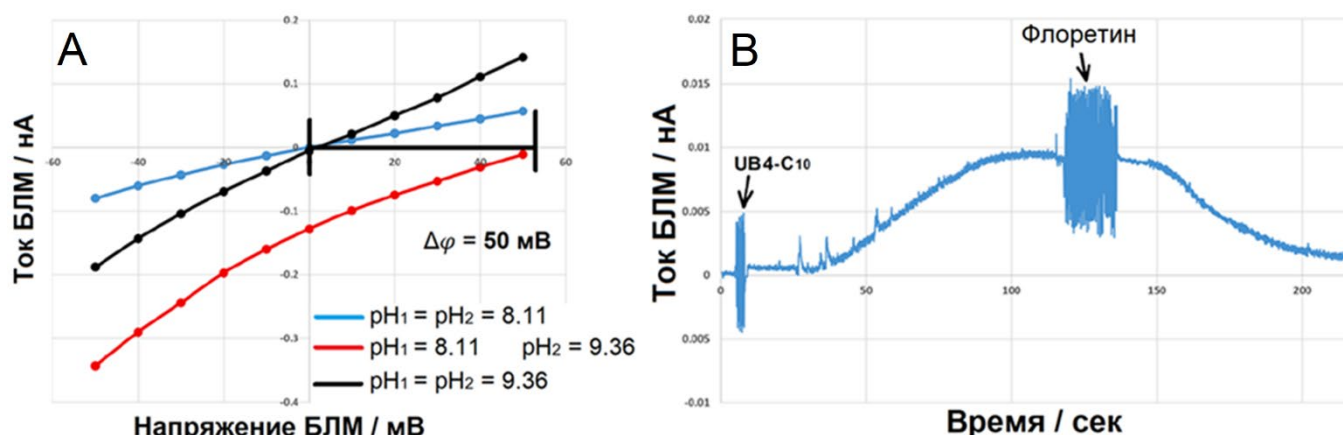


Рисунок 42. **А.** Вольтамперная характеристика 15 мкМ UB4-C10 в отсутствие (чёрная и синяя линии) и при наличии градиента pH (красная линия) в двух отсеках измерительной ячейки от приложенного напряжения. Величина сдвига потенциала нулевого тока составила 50 мВ, что ниже теоретического значения (71 мВ) и свидетельствует о неидеальной протонной селективности таких ионофоров. **В.** Электрический ток через искусственную плоскую бислойную липидную мембрану из дифитаноилфосфатидилхолина, индуцированный 50 мкМ UB4-C10. Показан эффект добавления 50 мкМ флоретина, доказывающий анионную природу разобщающего действия.

### 3,2,5, Визуализация гидролиза децилового эфира умбеллиферона

Результат эксперимента по инкубации митохондрий со сложными эфирами умбеллиферона методами тонкослойной хроматографии и LC-MS (рисунок 43) показал ферментативный гидролиз соединений до исходной карбоновой кислоты и спирта для обеих серий соединений. Так, в 500 мкл сахарозного буфера (250 мМ сахарозы, 5 мМ Tris, 0.2 мМ ЭДТА, pH=7.4) добавляли 1 мкл 1 мМ UB3-C10 и 10 мкл суспензии митохондрий. После инкубации определенное время смесь центрифугировали и супернатант наносили на пластину ТСХ. Были проведены дополнительные биофизические эксперименты, доказывающие, что все умбеллиферон-карбоновые кислоты не обладают разобщающей активностью (данные не приведены). Этот механизм дезактивации отличается от флуазинома [117] и анилинотиофенов [124], где, как мы покажем далее, происходит их конъюгация с глутатионом.



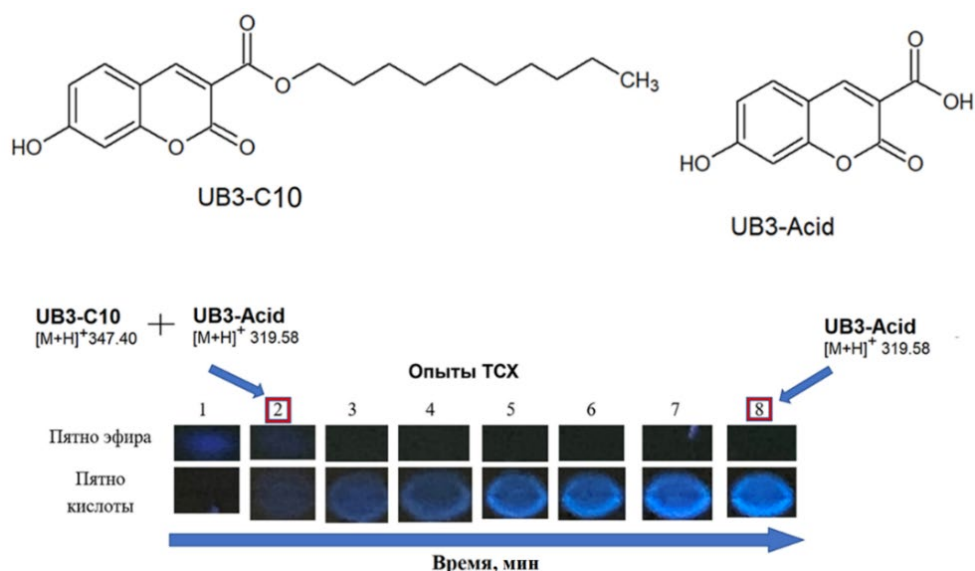


Рисунок 43. Визуализация гидролиза децилового эфира умбеллиферона UB3-C10 изолированными митохондриями печени крысы во времени с помощью метода тонкослойной хроматографии (ТСХ) и ВЭЖХ-масс-спектрометрии (LC-MS). Визуализация проводилась в УФ-кабинете при возбуждении светом с длиной волны 365 нм. В системе гексан:этилацетат 1:2 сложный эфир UB3-C10 имеет  $R_f=0.82$ , а кислота UB3-Acid имеет  $R_f=0$ . Для подтверждения гидролиза супернатант через 2 и 8 минут отдавали на LC-MS анализ.

### 3.3 Предположительное участие ALDH2 в тканеспецифичном гидролизе производных 7-гидроксикумарина

На основании анализа литературы мы предположили, что эстераза, гидролизующая сложноэфирные производные умбеллиферона – митохондриальная альдегиддегидрогеназа ALDH2. Это предположение подтверждалось результатами проведенного нами ингибиторного анализа исчезновения разобщающего действия этих соединений, а также соответствовало полученной нами зависимости эффекта от тканевой принадлежности выделенных митохондрий. Так, мы показали замедление исчезновения разобщающей активности при прединкубации митохондрий с дисульфидом (DSF) и дайdziном (DZ) – ингибиторами ALDH2 (рисунок 44, А, В); а также поставили опыты на изолированных митохондриях сердца (RHM) и почек (RKM) крысы, где этого фермента значительно меньше (рисунок 44, С, D). Действительно оказалось, что на RHM и RKM сложные эфиры умбеллиферона не гидролизуются (по результатам измерения мембранного потенциала, а также LC-MS и ТСХ анализов) – можно говорить о тканеспецифичности их активности. Кроме того, на RHM было исследовано ускорение дыхания всеми синтезированными эфирами 7-гидроксикумарин-3-карбоновой и 4-уксусной кислот (рисунок 45).

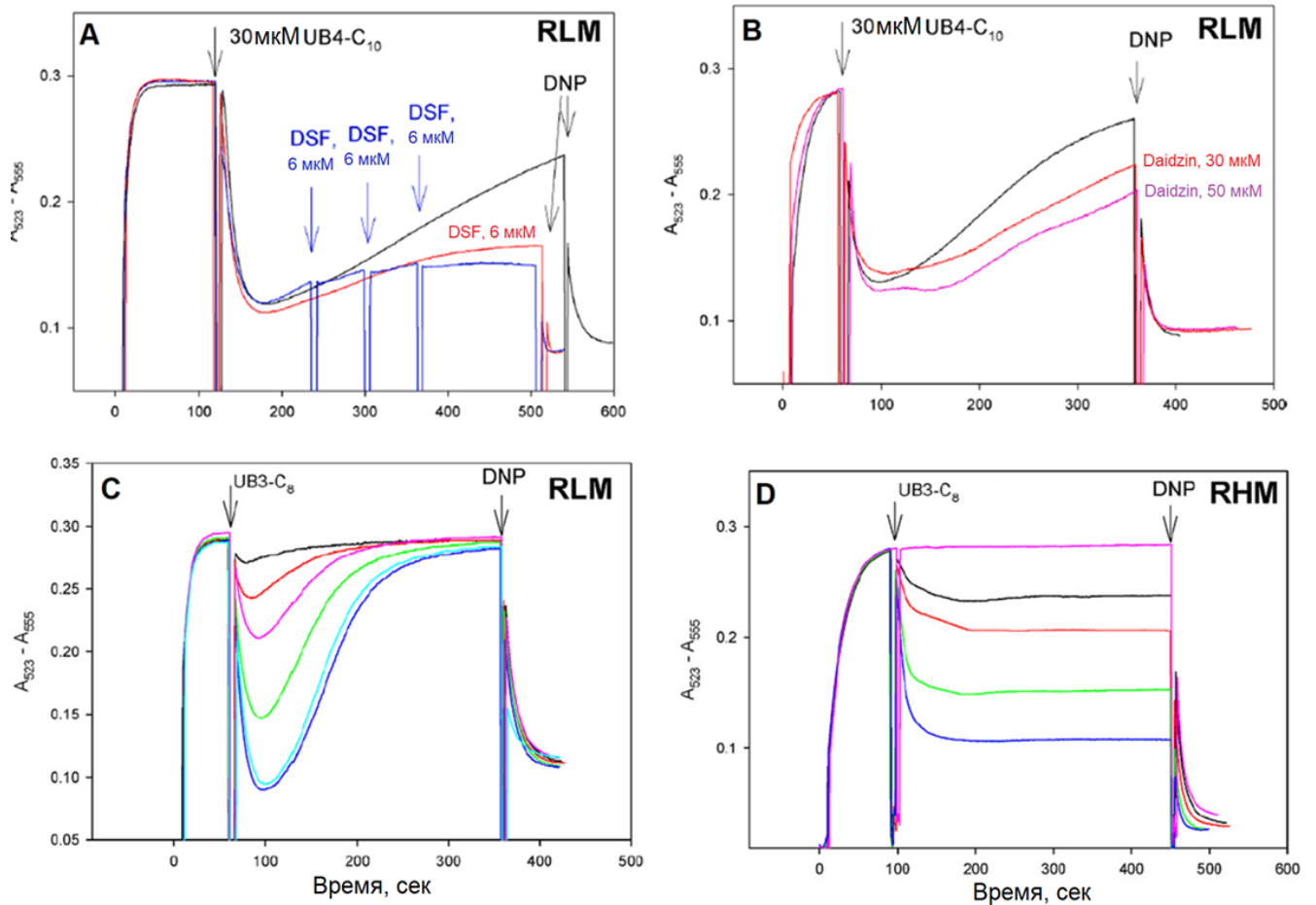


Рисунок 44. **A, B.** Влияние ингибиторов ALDH2 дисульфирама (**A**; DSF) и дайдзина (**B**) на сброс мембранного потенциала изолированных митохондрий печени крысы (RLM) под действием сложного эфира умбеллиферона UB4-C<sub>10</sub> – наблюдается дозозависимое замедление скорости их гидролиза. **C, D.** Сравнение действия октилового эфира умбеллиферон-3-карбоновой кислоты на изолированные митохондрии печени (**C**; RLM; 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 3.5 мМ, 4 мМ, 5 мМ) и сердца (**D**; RHM; 0 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ) крысы – в последнем случае исчезновение активности не наблюдается. Можно говорить о тканеспецифичном действии разоблицителей на основе 7-гидроксикумарина.

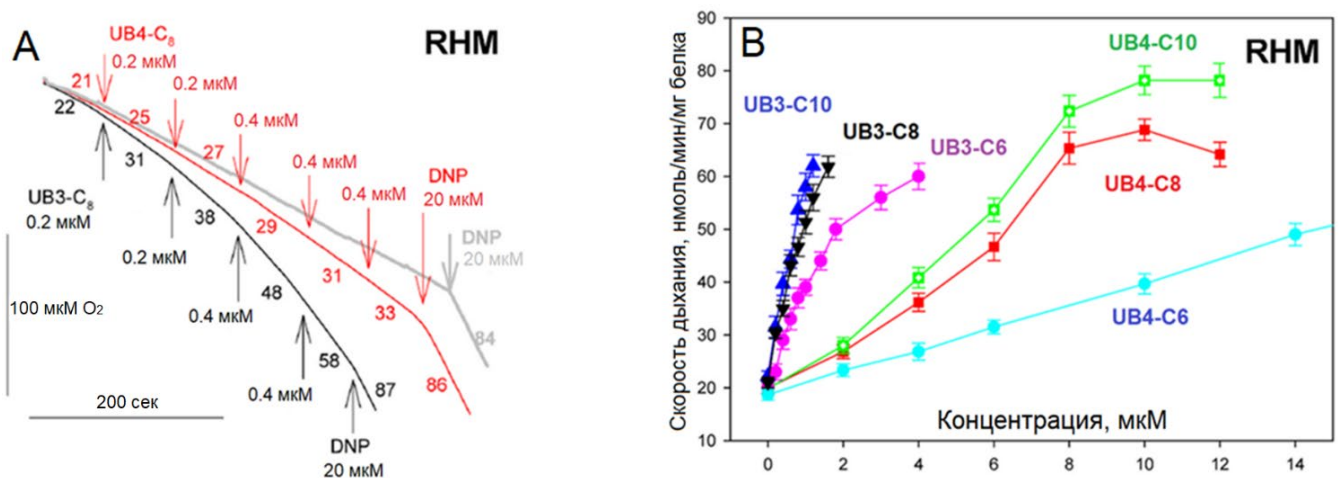


Рисунок 45. Ускорение дыхания митохондрий сердца (RHM) октиловым эфиром умбеллиферон-4-уксусной кислоты (**A**) и всей серией синтезированных кумаринов (**B**). Подтверждается, что самыми активными в каждой серии были дециловые эфиры (и октиловый UB3-C<sub>8</sub>), а 3-производные на порядок активнее производных по 4-му положению кумарина.



Рисунок 46. Эффект добавления CATR – ингибитора АТФ/АДФ антипортёра – на сброс мембранного потенциала и скорость дыхания изолированных митохондрий сердца крысы в присутствии UB3-C8 и UB3-C10 (чёрная и красная линии соответственно). Эффект респираторного сброса может говорить об участии этого белка в протонотранспортной активности синтезированных соединений. Серая кривая – сброс мембранного потенциала в присутствии UB3-C10 без добавления CATR.

### 3.4.1. Выделение ALDH2 из матрикса митохондрий печени крысы и изучение эстеразной активности выделенного фермента по отношению к сложноэфирным производным умбеллиферона

Для проверки участия ALDH2 в гидролизе сложных эфиров умбеллиферона мы выделили этот белок из матрикса RLM (супернатанта при получении СМЧ [150]) методом аффинной хроматографии по методике [129], [130]. Был синтезирован сорбент на основе Sepharose-4B, содержащий ковалентно пришитую 4-гидрокси-6-цианокоричную кислоту через диглицидиловый эфир бутандиола (рисунок 47). Аффинная хроматография проводилась в batch-версии в Mops буфере pH=7.4 (50 mM NaCl / 2 mM бензамидин / 1 mM EDTA / 0.1 mM дитиотреитол / 20 mM Mops-NaOH буфер), промывка – добавлением 500 mM 4-гидрокси-6-цианокоричной кислоты, а элюирование – дополнительно 1M NaCl.

Полученная фракция содержала около 50% целевой ALDH2 по результатам масс-спектрометрии, поэтому дальнейшее разделение было решено не проводить (см. соответствующий раздел методов). Однако, при инкубации с UB3-C10 образование кислоты не

происходило (по ТСХ), тогда как гидролиз рНРА наблюдался (и ингибировался добавлением DSF, данные не приведены).

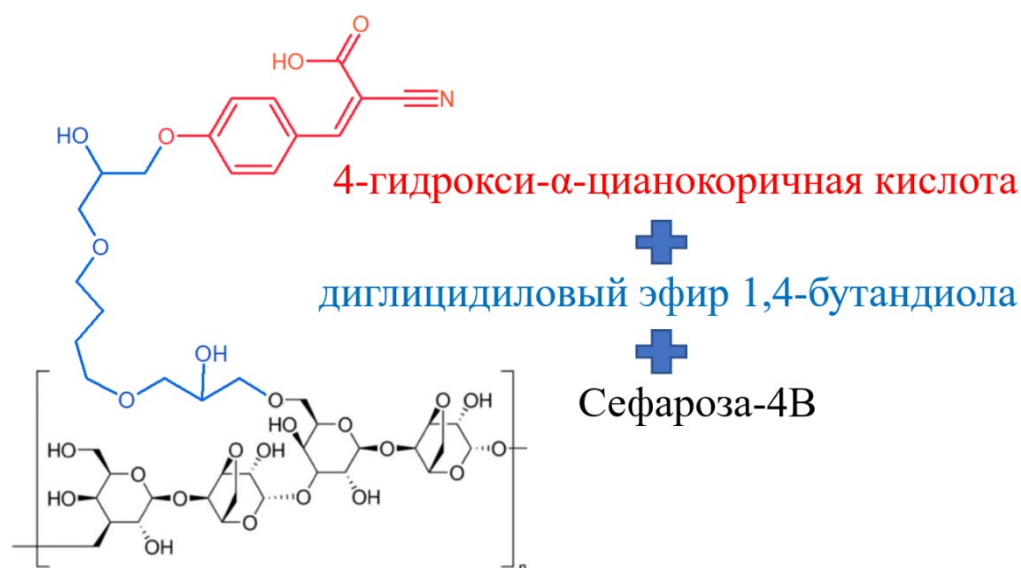


Рисунок 47. Структура синтезированного аффинного сорбента для выделения митохондриальной альдегиддегидрогеназы ALDH2 из матрикса митохондрий печени крысы. К полимеру Сефарозе-4В (черная) через диглицидиловый эфир бутандиола в качестве линкера (синий) пришивалась 4-гидрокси-альфа-цианокоричная кислота (красная). В результате за 1 стадию выделения из матрикса RLM была получена фракция с 50мол% ALDH2 согласно масс-спектрометрическому анализу.

### 3.4.2. Молекулярный докинг ALDH2

Подтверждением неверности гипотезы об участии ALDH2 дополнительно могут служить результаты докинга. Расчёты были проведены на кристаллической структуре человеческой ALDH2 с агонистом alda-1 (PDB 3INJ). Структура была подготовлена в программе Build Model, докинг проводился в программе Lead Finder.

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 (рисунок 48). Дополнительно были проведены расчёты с другой стороны от каталитической триады – в сайте связывания  $NAD^+$  (так как при гидролизе окислительно-восстановительной реакции не происходит,  $NAD^+$  не требуется в качестве кофактора). В этом случае расположение UB3-C10 аналогично: свободная гидроксильная группа направлена внутрь к активному центру, а эфирная и липофильный хвост – наружу (рисунок не приведён).

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.

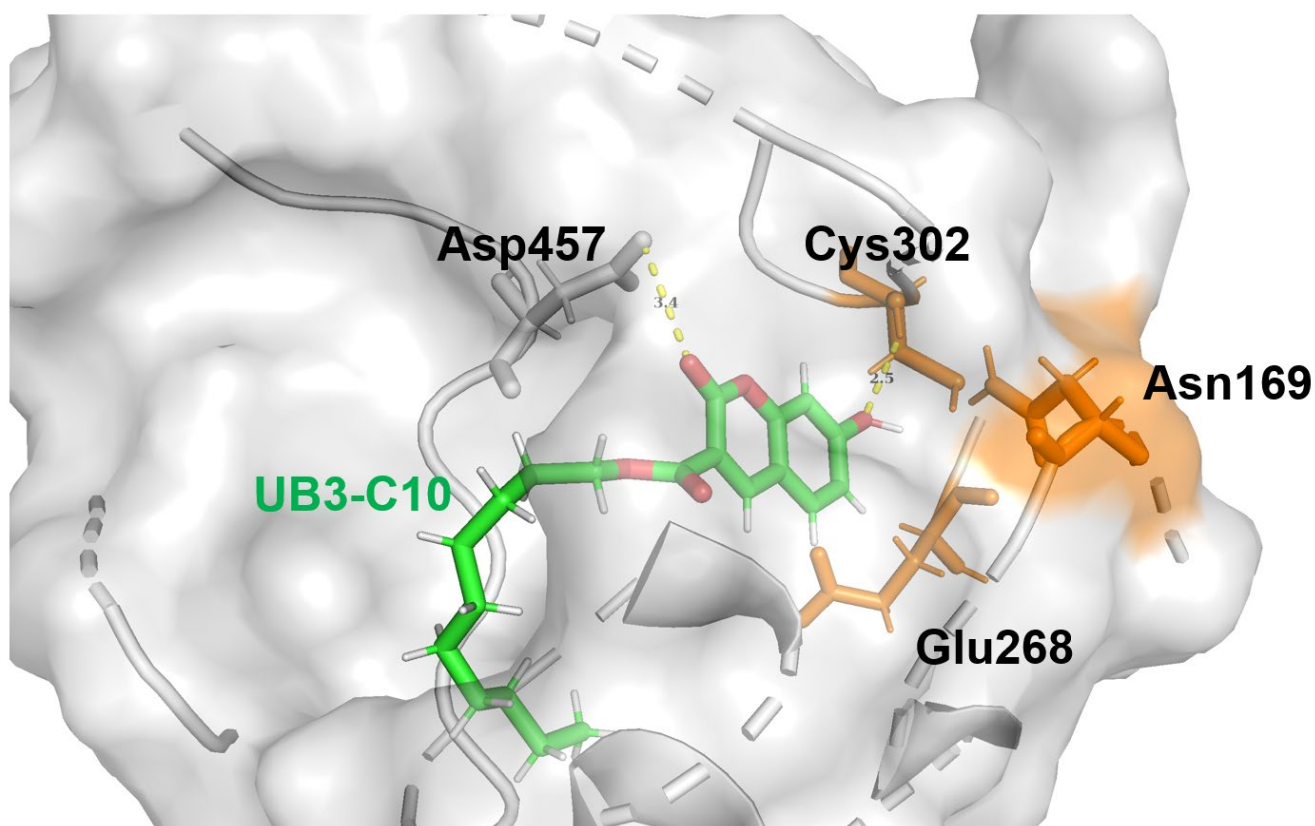


Рисунок 48. Результат молекулярного докинга децилового эфира умбеллиферон-3-карбоновой кислоты в структуру человеческой альдегиддегидрогеназы ALDH2 (PDB 3inj). Из структуры удалены аминокислотные остатки, не формирующие субстрат-связывающий карман и находящиеся в отдалении от лиганда. Каталитическая триада Cys302, Glu268 (не показан) и Asn169 выделена оранжевым и находится вглубине белка, а все сложные эфиры умбеллиферона по 3-му и 4-му положениям связываются только 7-гидроксигруппой «внутри». Такое положение, стабилизированное водородными связями с Asp457 и Cys302 ( $dG \sim -9$  ккал/моль для UB3-C10), исключает возможность гидролиза этого типа соединений белком ALDH2.

### 3.5 Карбоксилэстераза 1 инактивирует сложные эфиры умбеллиферона

Как уже говорилось в обзоре литературы, DSF может ингибировать не только ALDH2, но и карбоксилэстеразы [91], [92]. Кроме того, тканевое распределение CES1 соответствует полученным нами ранее результатам тканеспецифичного гидролиза синтезированных кумаринов, что делает её потенциальной причиной спонтанной инактивации сложных эфиров умбеллиферона.

#### 3.5.1. Молекулярный докинг CES1

Сначала был проведен компьютерный анализ теоретической возможности гидролиза – в качестве модели белка была использована структура человеческой CES1 с тамоксифеном (PDB 1ya4). Карбоксилэстеразы – это сериновые гидролазы с каталитической триадой Ser221, Glu345 и His468. В отличие от ALDH2, в этом случае уже не наблюдается стерических затруднений для гидролиза UB3-C8: расстояние от карбонильного углерода до серина составляет около 3Å, а dG составляет около -10 ккал/моль в том числе за счёт водородной связи 7-гидроксильной группы с кислородом Ala93 (рисунок 49).

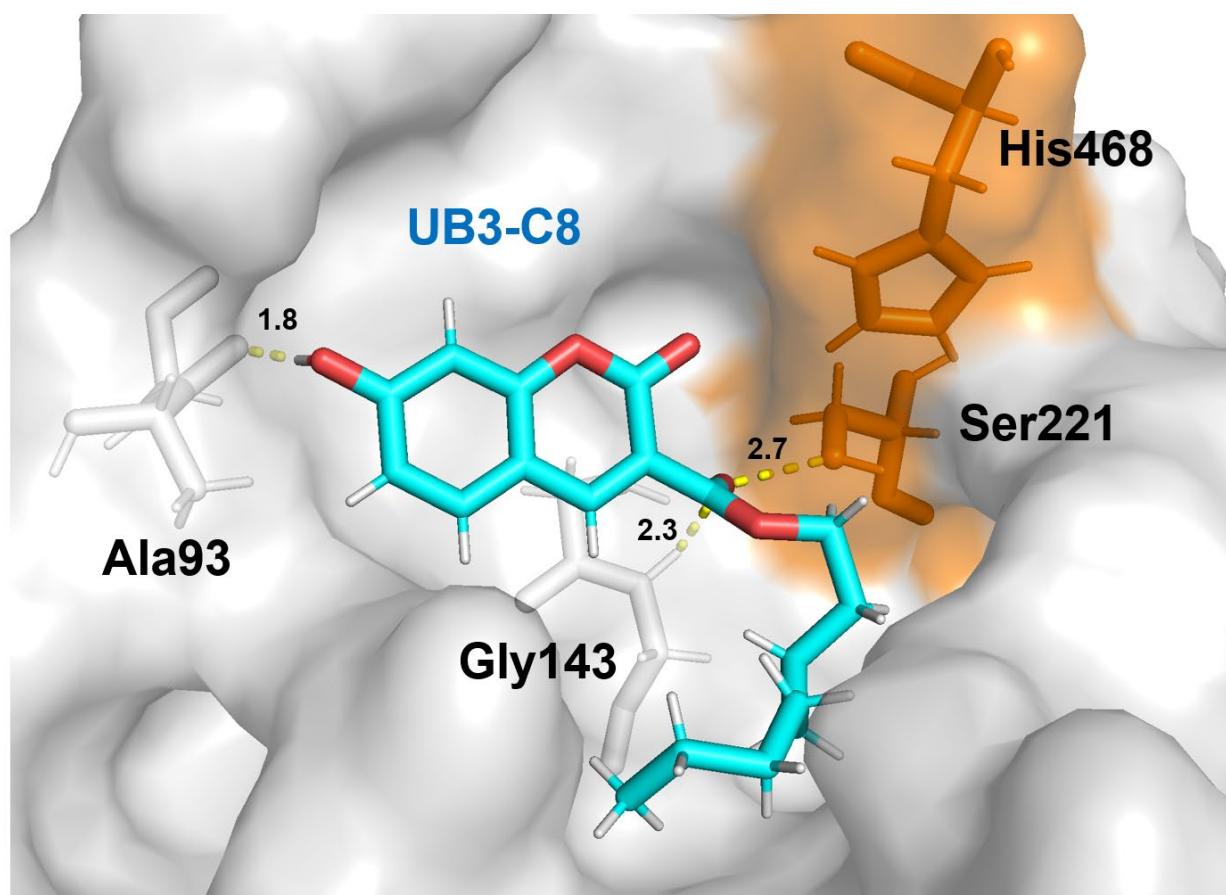


Рисунок 49. Результат молекулярного докинга октилового эфира умбеллиферон-3-карбоновой кислоты в структуру человеческой карбоксилэстеразы CES1 (PDB 1ya4). Из структуры удалены аминокислотные остатки, перекрывающие обзор. Каталитическая триада Ser221, Glu345 (не показан) и His468 выделена оранжевым. Типичное расположение производных кумарина, стабилизированное водородными связями с кислородами Ala93 и Gly143 (dG~-10 ккал/моль для UB3-C8) не исключает возможности гидролиза таких соединений белком CES1.

### 3.5.2. Ингибиторный анализ: действие ингибиторов карбоксилазы на кинетику исчезновения разобщающей активности

Эксперименты по сбросу мембранного потенциала на изолированных митохондриях печени крысы также показали замедление исчезновения разобщающей активности UB3-C8 при прединкубации с ингибиторами CES1 – PMSF, TTFA и лоперамидом (рисунок 50). Важно отметить, что концентрация TTFA была недостаточной для ингибирования комплекса II дыхательной цепи.

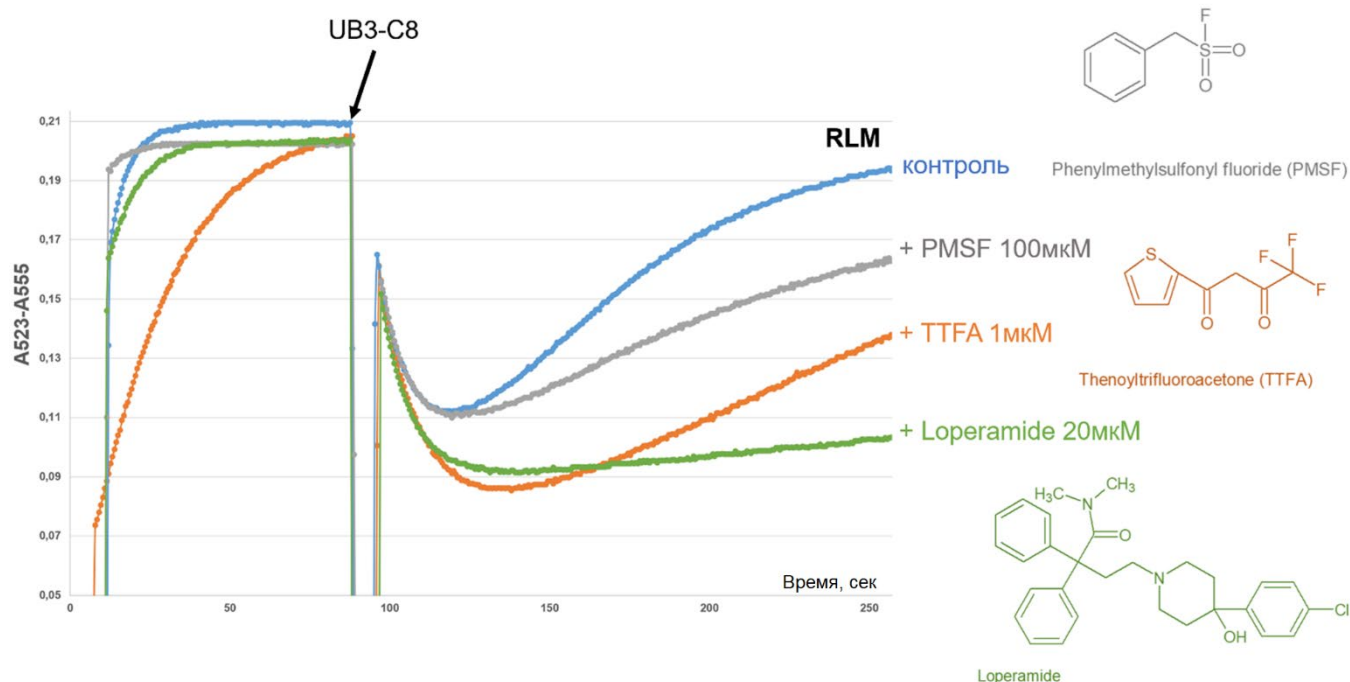
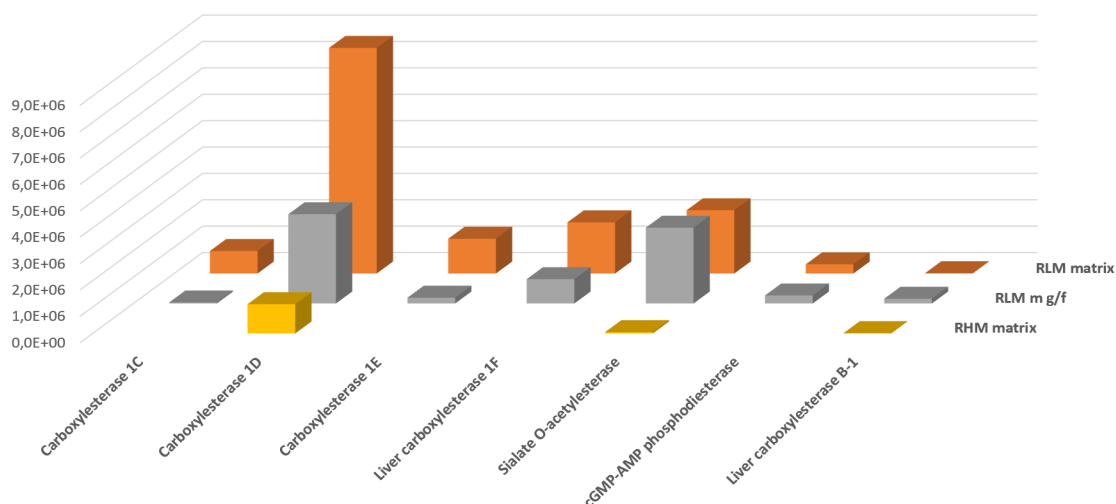


Рисунок 50. Добавление PMSF, TTFA и лоперамида - ингибиторов CES1 – замедляет исчезновение разобщающего действия октилового эфира умбеллиферон-3-карбоновой кислоты на RLM, что косвенно доказывает участие этого белка в гидролизе UB3-C8.

### 3.5.3. Протеомный анализ

Для дополнительного подтверждения наличия карбоксилэстераз, матриксы митохондрий печени (RHM) и сердца (RLM) крысы были отданы на протеомный анализ (рисунок 51). Оказалось, что в печеночной фракции представлены 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 51. Гистограмма результатов протеомного анализа матриксов митохондрий печени (RLMm, оранжевый ряд) и сердца (RHMm, желтый ряд). По оси X гистограммы расположены белки-эстеразы, которые программа обнаружила в образцах. Так как в RLMm гидролитическая активность по отношению к производным умбеллиферона наблюдалась, а в RHMm – нет, можно сделать выводы, что карбоксилэстераза 1 (но не её изоформа *ces1d*) может разлагать сложные эфиры кумарина. RLMm g/f – 14 фракция после гель фильтрации с максимумом гидролитической активности.*

Поэтому было решено провести выделение белка CES по методике [131]. Суспензия митохондрий была озвучена и отцентрифугирована при 50000g для отделения мембранных белков. Далее белки были поделены гель-фильтрацией на Sephadex G-100 в MOPS буфере при pH=7.5. 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 52 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 53).

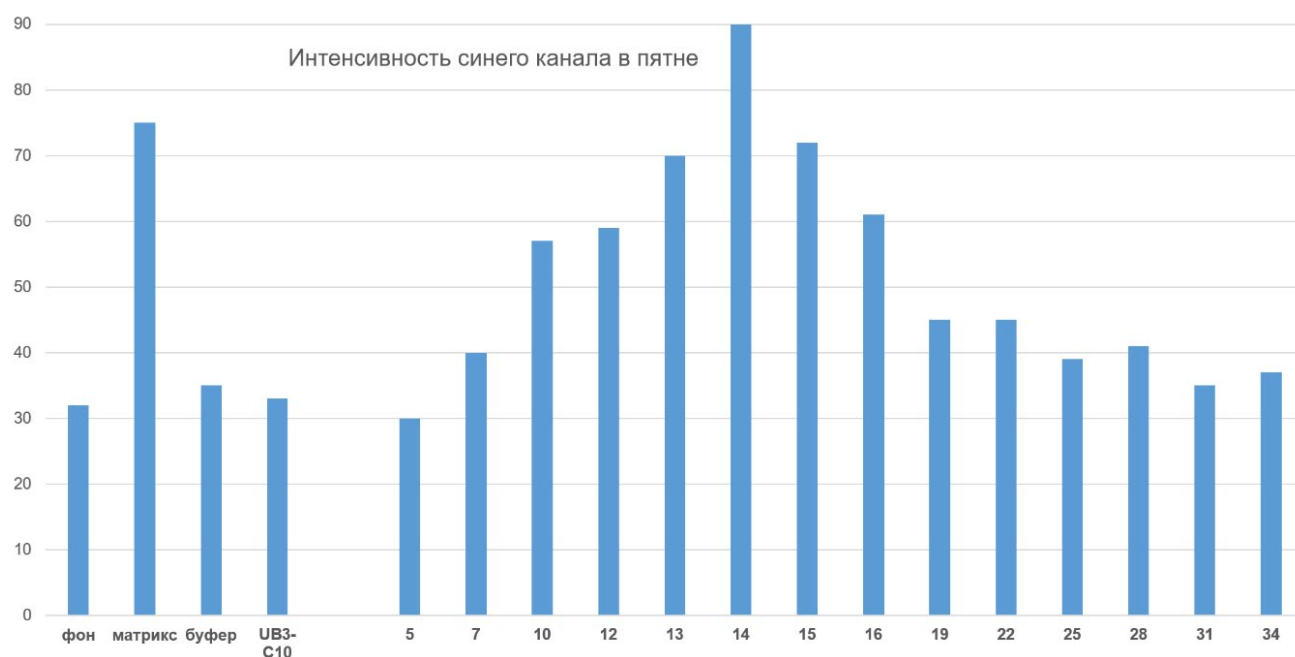


Рисунок 52. Пик активности на профиле элюции после гель-фильтрации на Sephadex G-100 матрикса митохондрий печени крысы (RLMt g/f). После разделения в каждую фракцию был добавлен UB3-C10, а после инкубации капля каждой фракции нанесена на ТСХ пластинку и проявлена УФ светом 365нм. На оси ординат – интенсивность синего канала в пятне каждой фракции, которая пропорциональна скорости гидролиза сложного эфира до кислоты. Полученный пик свидетельствует об удовлетворительном результате разделения. В левой части – отрицательные (фоновая интенсивность, без добавления митохондрий-«буфер», и только UB3-C10) и положительный («матрикс» – результат инкубации исходного матрикса RLM с UB3-C10, с приблизительно равной концентрацией суммарного белка) контроли.

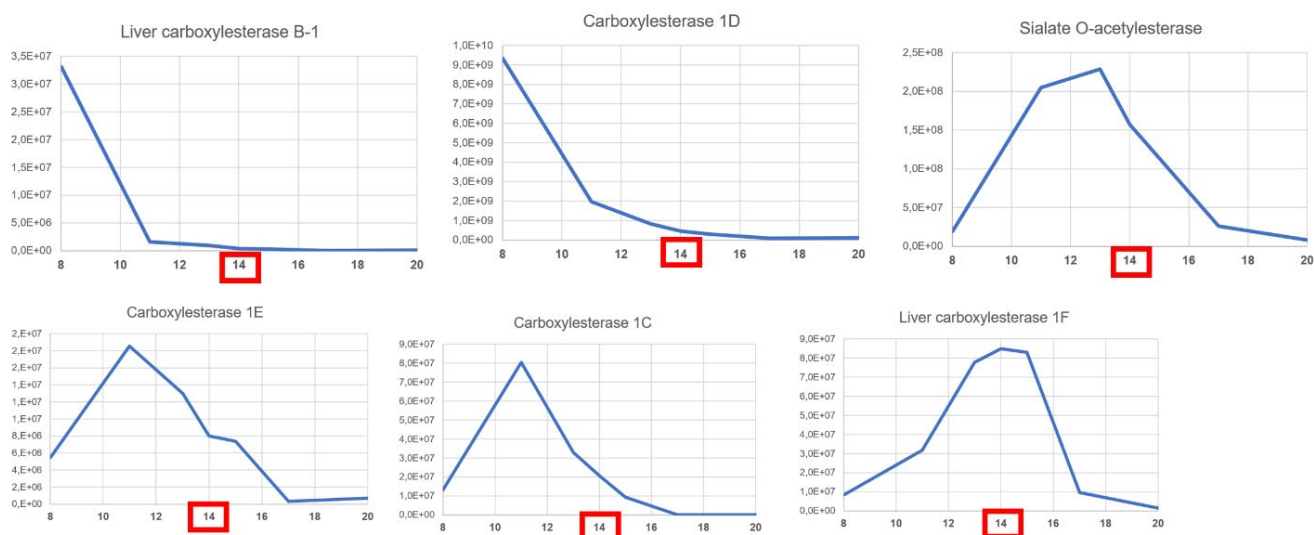


Рисунок 53. Протеомный анализ фракций (№№8, 11, 13, 14, 15, 17, 20), охватывающий пик активности на рисунке выше. Так как распределение *ces1f* соответствует распределению активности на профиле элюции, можно сделать о селективности гидролитической активности этой изоформы *ces1* по отношению к сложным эфирам умбеллиферона.

3.5.4. Гидролиз сложноэфирных производных умбеллиферона коммерческой карбоксилэстеразой.

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

В таблице 2 представлены результаты качественного ингибиторного анализа на чистом белке e2884 и на выделенных митохондриях печени крысы методом ТСХ. Было показано, что все ингибиторы, которые «работали» в экспериментах по сбросу мембранного потенциала на изолированных митохондриях (PMSF, TTFA, DSF, дайдин, 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 замечен эффект только альфа-кетоглутарата.

Дополнительно было показано, что ни разрушение митохондриальной мембраны тритоном X-100, ни разобщение с помощью CCCP, ни добавление  $\text{NAD}^+$ , CATR (ингибитор АТФ/АДФ антипортера), 2,4-динитрохлорбензола (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 много месяцев митохондрии (которые могли «дышать», но из-за нарушения целостности мембраны уже не поддерживали разность потенциала), так и свежевыделенные – качественно результаты не отличались. Однако, нагревание до  $90^\circ$ , ожидаемо, полностью убирало эстеразную активность.

Кроме того, фракции пика активности после гель-фильтрации матрикса RLM вместе с контролями и белком e2884 были проанализированы при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE; рисунок 54). Количество ces1d во всех случаях на порядок выше других изоформ и, следовательно, после проявления серебром виден планомерный спад интенсивности полосок ces после деления матрикса печени.



Соединение	На RLM	На белке e2884
PMSF	+	+
TTFA	+	+
UB4-COC10	+	+
UB4-COC8	+	+
$\alpha$ -кетоглутарат	+	+
малат	+	-
оксалоацетат	+	-
сукцинат	-	-
глутамат	-	-
оксалат	+	+
лоперамид	+	-
2-гидроксихинолин	+	+
дисульфiram	+	+
дайдзин	+	+
CDNB	-	-

Соединение	На RLM
UB3-N-C10	+
UB4-N-C10	+
Me-UB3-C10	+
UB3-Acid	+
UB4-Acid	+
UB6-Acid	+
4-Me-UB	+
ацетозоламид	-
Triton X-100	-
CATR	-
CCCP	-
NAD <sup>+</sup>	-

Таблица 2. 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 исчезновению сброса мембранного потенциала и, в большинстве, на карбоксилэстеразе печени свиньи. На скорость гидролиза не влияло ни разрушение митохондриальной мембраны тритоном X-100, ни разобщение с помощью CCCP, ни добавление NAD<sup>+</sup>, CATR (ингибитор АТФ/АДФ антипортёра), CDNB (субстрат глутатионилирования). Отдельно можно отметить несколько 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.

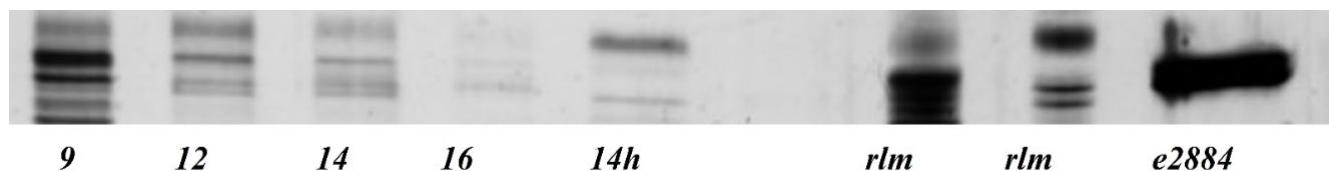


Рисунок 54. Часть геля SDS-фореза с молекулярной массой 50-70 кДа, покрашенного AgNO<sub>3</sub>. Фракции слева направо: 9, 12, 14, 16 (после гель-фильтрации матрикса RLM), 14h (аналогичная фракция после гель-фильтрации матрикса сердца), rlm (матрикс печени), rlm (матрикс сердца) и белок e2884. Наблюдаемое снижение интенсивности полосы 62 кДа во фракциях RLMm соответствует распределению *ces1d*, которой на порядок больше других изоформ.

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

Проводилась работа по модификации структуры эфиров умбеллиферона для изменения их тканевой специфичности или активности. Так, из 2,4-дигидрокси-5-нитробензальдегида был синтезирован аналог октилового эфира умбеллиферон-3-карбоновой кислоты с нитрогруппой в шестом положении, обозначенный как **NO2-UB3-C8** (рисунок 55).

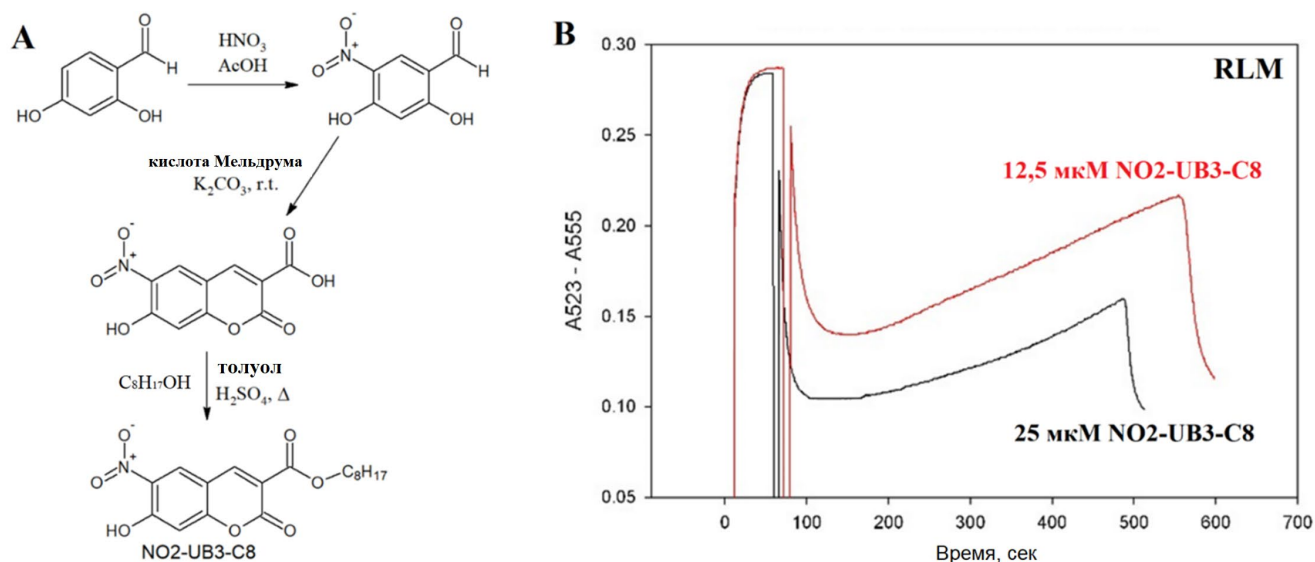


Рисунок 55. Схема синтеза нитро-аналога UB3-C8 (A) и его действие на мембранный потенциал митохондрий печени крысы (B, 12, 12,5 мкМ - красная линия и 25 мкМ - черная линия).

Другой негидролизующийся 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-оксодекановой кислоты и последующую конденсацию с дигидроксибензальдегидом. Далее карбонильная группа UB3-C-C7 была легко модифицирована малонитрилом с получением дицианопроизводного **UB3-CN-C7**. Такие производные сохраняют протонофорную активность, хотя замена карбоксильной группы на карбонильную сильно её снижает по сравнению с UB3-C8. UB3-CN-C7, в свою очередь, оказалось значительно более активным, чем UB3-C-C7 и UB3-C8 с точки зрения сброса мембранного потенциала (рисунок 56).

Примечательно, что все описанные выше модифицированные кумарины сохраняют чувствительность к SATR (рисунок 57).

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 проявил разобщающей активности: ускорение дыхания и эффект сброса мембранного потенциала не были обнаружены даже при большей концентрации (данные не приведены).

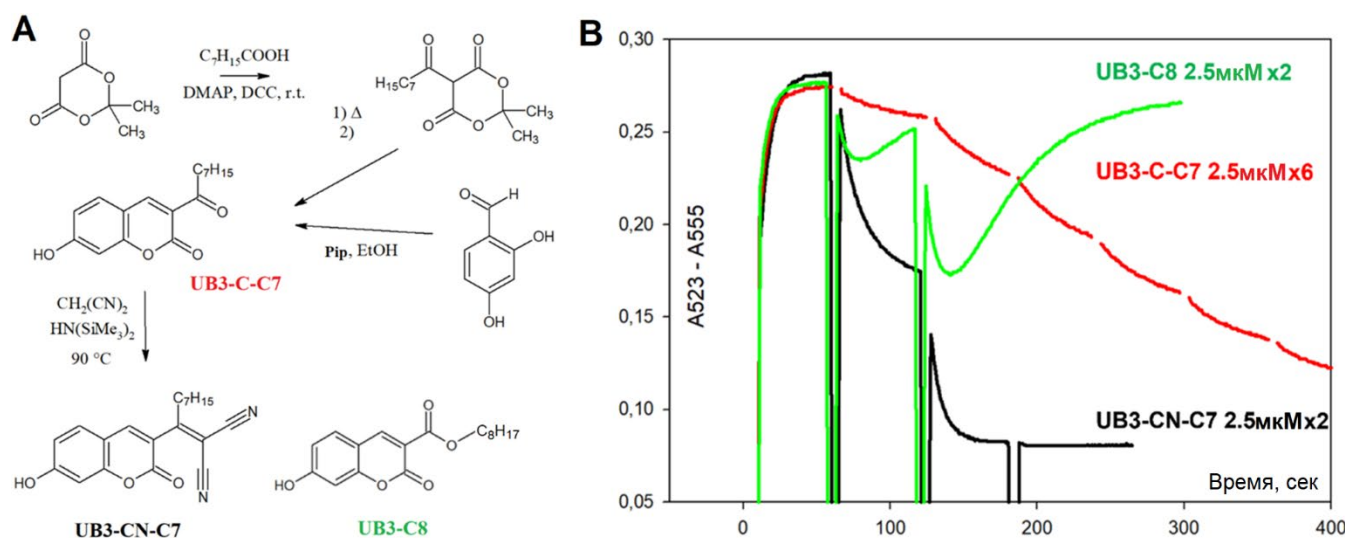


Рисунок 56. (А) Схема синтеза негидролизуемых аналогов октилового эфира 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты: **UB3-C-C7** и **UB3-CN-C7**. (В) По сбросу мембранного потенциала митохондрий печени (RLM) кето-аналог (красная линия; 6 добавок **UB3-C-C7** по 2,5  $\mu M$  в моменты, обозначенные пропуском) заметно слабее **UB3-C8** (зелёная линия; 2 добавки по 2,5  $\mu M$ ), однако введение динитрильной группы (чёрная линия) значительно повышает разобщающую активность.

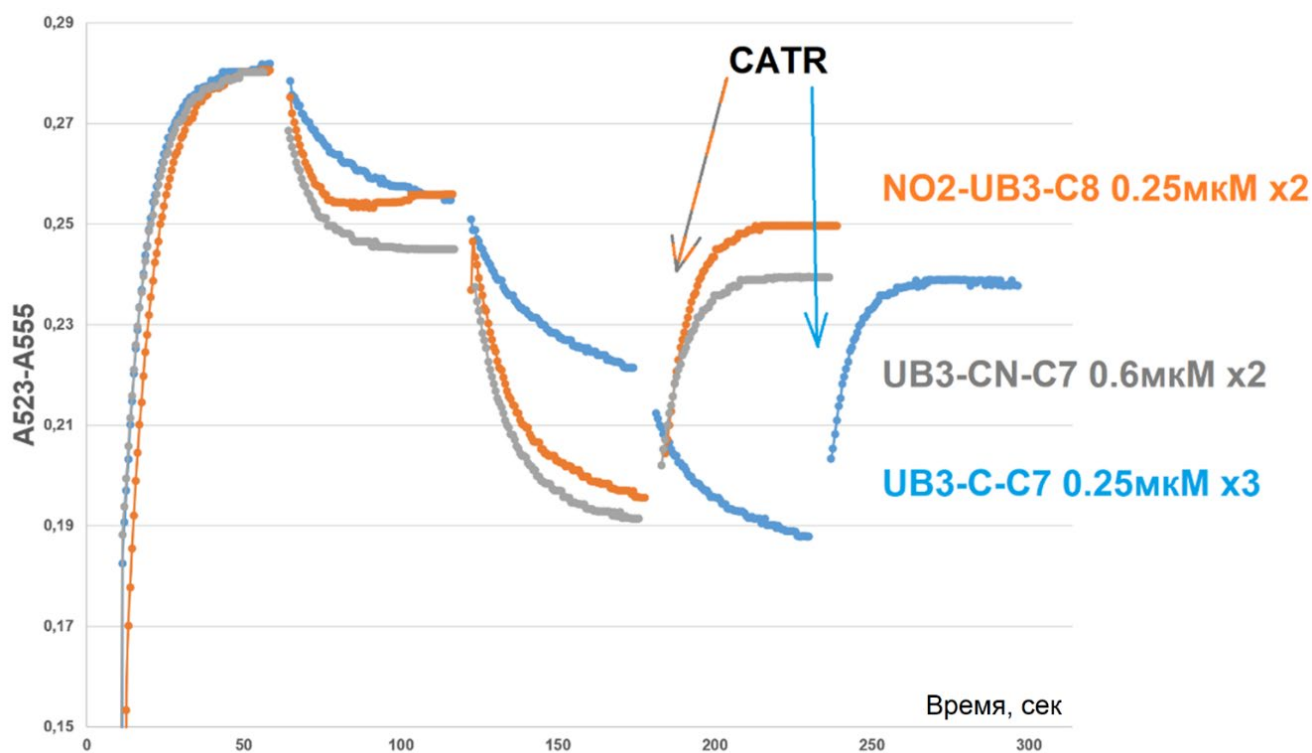


Рисунок 57. Эффект ресопряжения при добавлении **CATR** при инкубации **RHM** с нитро- кето- и динитрил-аналогами октилового эфира умбеллиферон-3-карбонпвой кислоты.

Дополнительные химической модификации кумаринового остова включали «закрытие» гидроксильной группы умбеллиферона. Так, метилированный диметилсульфатом по 7 положению **Me-UB3-C10** был лишен разобщающего действия на изолированных митохондриях крыс, что доказывает решающее значение этой диссоциирующей группы для протонотонной

активностим (рисунок 58). Кроме того, было показано замедление исчезновения активности UB3-C8 в присутствии метилированного аналога.

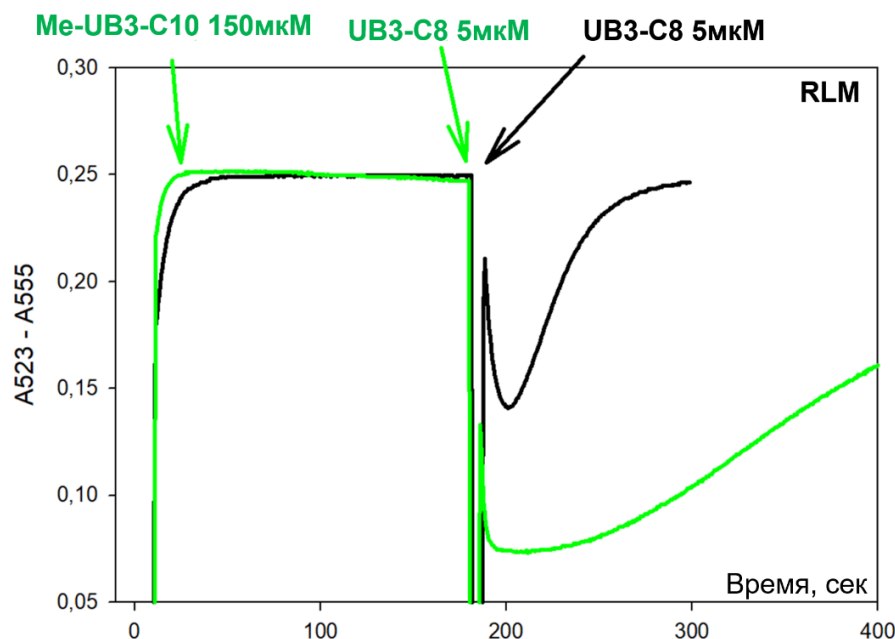
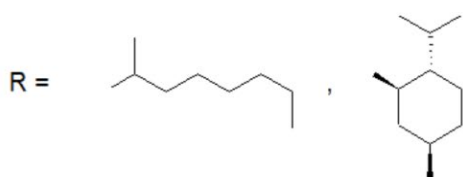
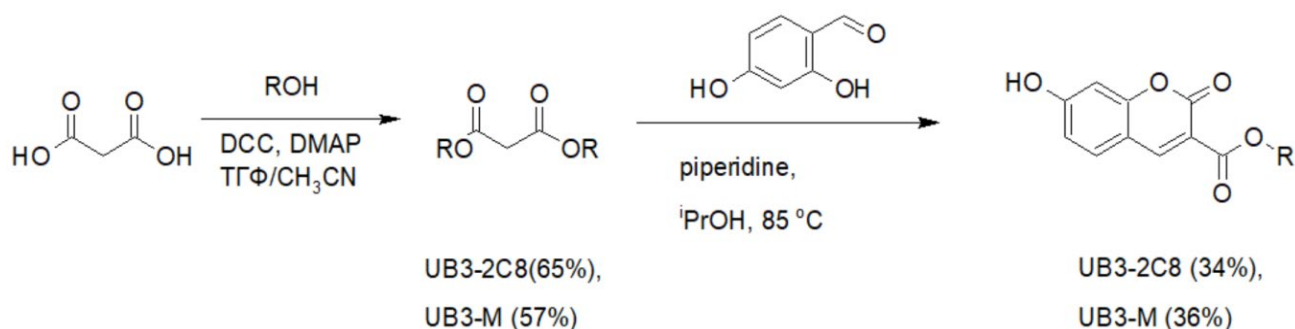


Рисунок 58. Метилированный аналог децилового эфира 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты не проявляет разобщающей активности, однако замедляет гидролиз UB3-C8. Можно сделать вывод, что гидроксигруппа вносит решающий вклад в разобщающую активность сложных эфиров умбеллиферона.

Все описанные ранее сложные эфиры умбеллиферона включали в структуру линейные гидрофобные группы. Для того, чтобы выяснить влияние природы спирта на активность были синтезированы производные умбеллиферона со вторичными и третичными спиртами: 2-октанолом (UB3-2C8), L-ментолом (UB3-M) и линалоолом (UB3-L). Прямая этерификация, с успехом использованная нами для синтеза эфиров умбеллиферон-3-карбоновой кислоты со спиртами линейного строения, к сожалению, не позволяет получать эфиры этой кислоты с разветвленными спиртами. Поэтому был опробован другой путь, основанный на конденсации Кневенагеля эфиров малоновой кислоты с 2,4-дигидроксibenзальдегидом [151]:



Поскольку выход целевых продуктов оказался невысок (21-22% по двум стадиям), мы разработали другую схему синтеза такого рода соединений (рисунок 59 А). Так как использование смешанных сложных эфиров малоновой кислоты в этой реакции может приводить к двум продуктам, идея предложенной схемы заключается в том, что в случае объемного заместителя R путь, включающий образование интермедиата А с последующей лактонизацией, выглядит более предпочтительным (рисунок 59 В). Интересно отметить, что в случае производного 2-октанола на заключительной стадии происходило образование заметных количеств метилового эфира умбеллиферон-3-карбоновой кислоты (что в итоге сказалось на выходе целевого соединения), но в синтезе L-ментолового и линалоолового эфиров этот побочный продукт не наблюдался. Надо признать, что схема с использованием смешанного эфира малоновой кислоты типа  $\text{MeOCOCH}_2\text{COOR}$  не оказалась лучше простого использования  $\text{CH}_2(\text{COOR})_2$  в случае 2-октанола, тем не менее она может быть полезна для получения эфиров умбеллиферон-3-карбоновой кислоты с более разветвленными спиртами.

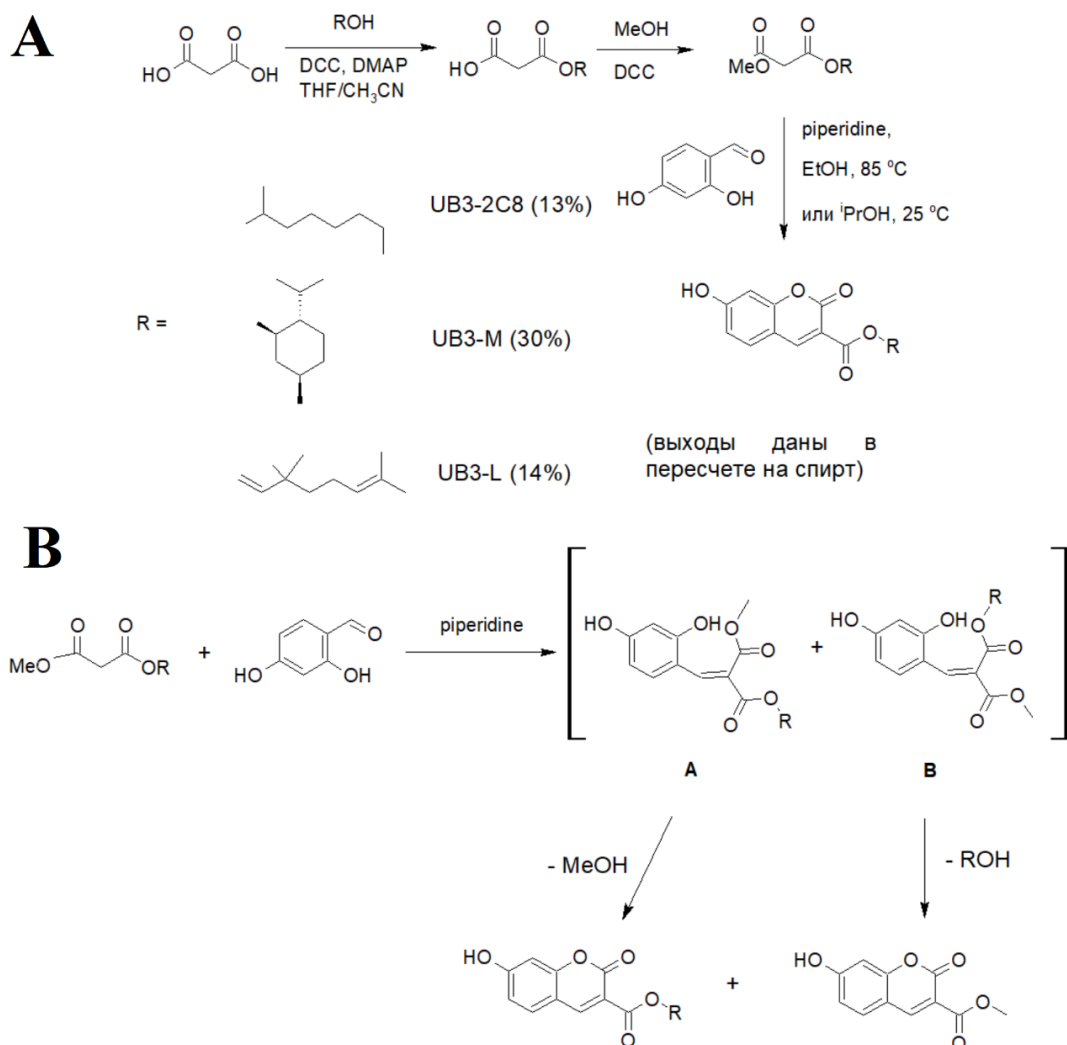


Рисунок 59. **A** – Подобранный метод синтеза сложных эфиров умбеллиферон-3-карбоновой кислоты с 2-октанолом (UB3-2C8), L-ментолом (UB3-M) и линалоолом (UB3-L). **B** – механизм последней стадии – конденсации Кневенагеля со смешанными эфирами малоновой кислоты.

По результатам сброса мембранного потенциала, скорость гидролиза (и скорость восстановления мембранного потенциала) плавно падала при переходе от первичного спирта ко вторичному, стерически затрудненному вторичному и, наконец, третичному (рисунок 60).

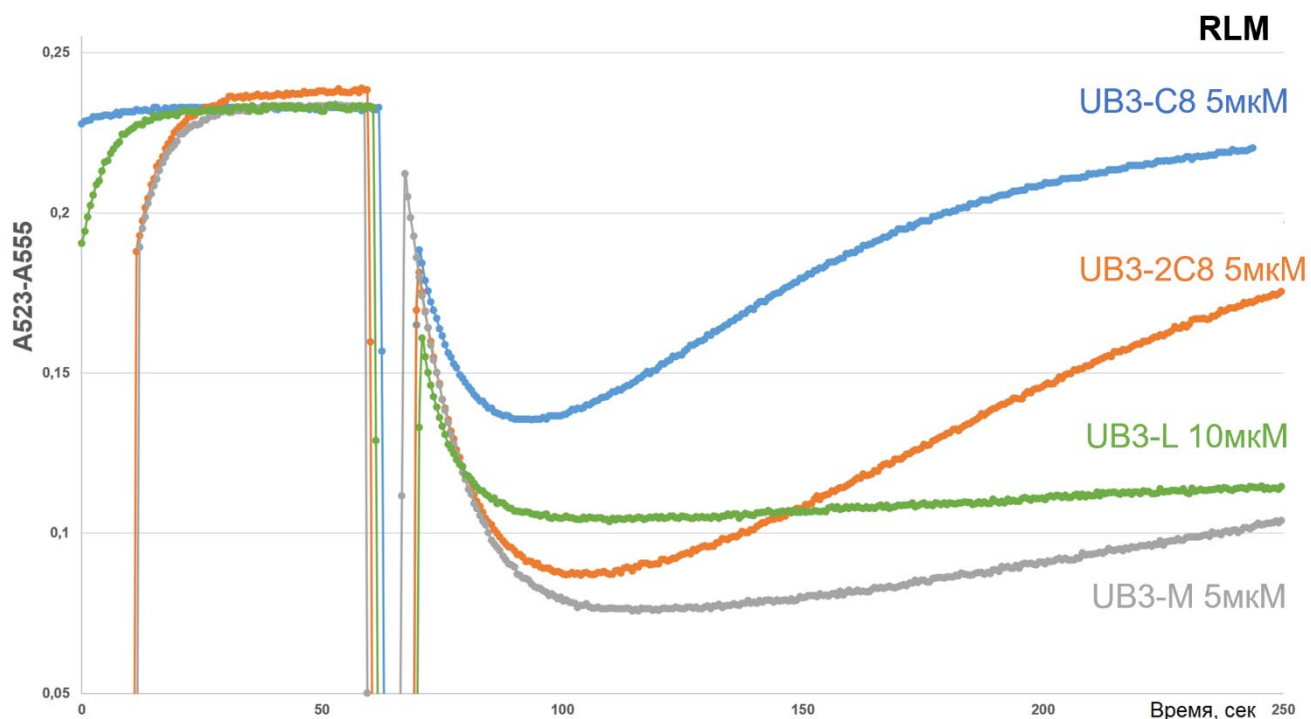


Рисунок 60. Скорость спонтанной инактивации снижалась вследствие стерических затруднений ферментативного гидролиза в ряду сложных эфиров 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты и гидрофобных спиртов: октанол > 2-октанол > L-ментол > линалоол.



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

Для дальнейшего исследования связи свойств производных кумарина с их структурой 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 (рисунок 61).

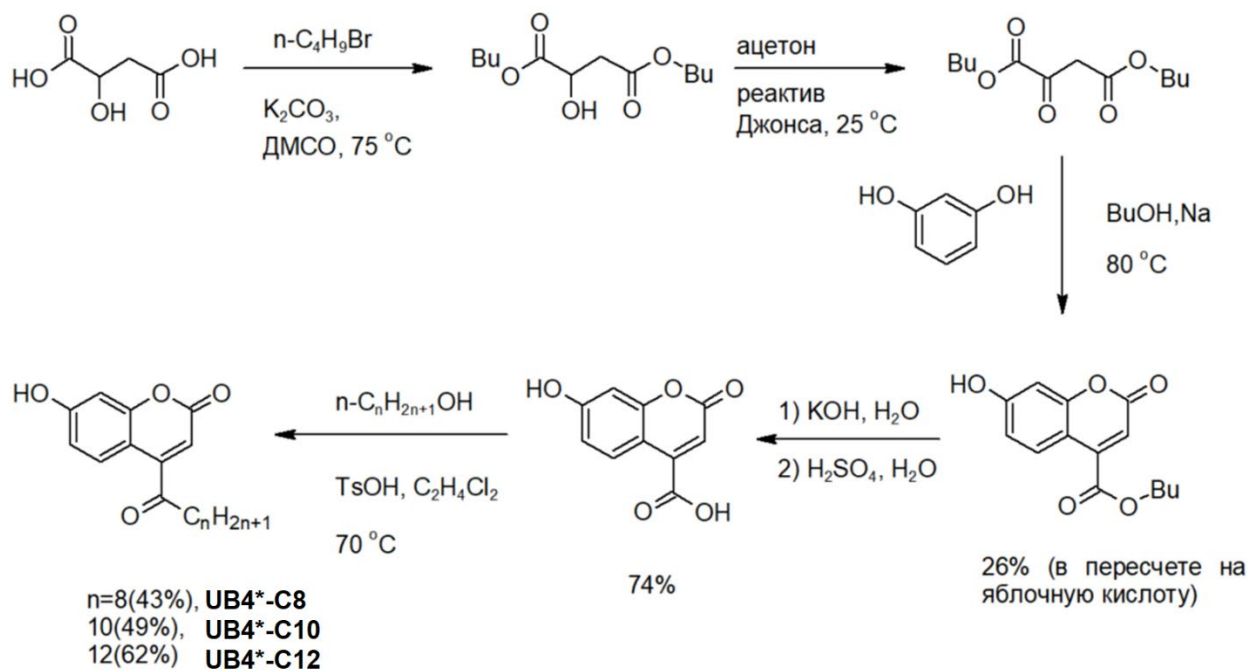


Рисунок 61. Схема синтеза сложных эфиров 7-гидроксикумарин-4-карбоновой кислоты.

На первой стадии бутиловый эфир 2-оксоянтарной кислоты был получен алкилированием по Вильямсону бутилбромидом малата калия, полученного *in situ* действием карбоната калия на яблочную кислоту, с последующим окислением дибутилмалата реактивом Джонса. Далее следовала ключевая стадия конденсации с резорцином в присутствии бутилата натрия (конденсация Пехмана), описанная ранее для этилового эфира умбеллиферон-4-карбоновой кислоты [152], [153]. Гидролиз бутилового эфира с последующей этерификацией позволил получить октиловый, дециловый и додециловый эфиры умбеллиферон-4-карбоновой кислоты.

Производные умбеллиферон-4-метил-6-карбоновой кислоты (серия UB6-Cn) были получены конденсацией дигидроксibenзальдегида с этиловым эфиром ацетоуксусной кислоты и последующей этерификацией (рисунок 62).

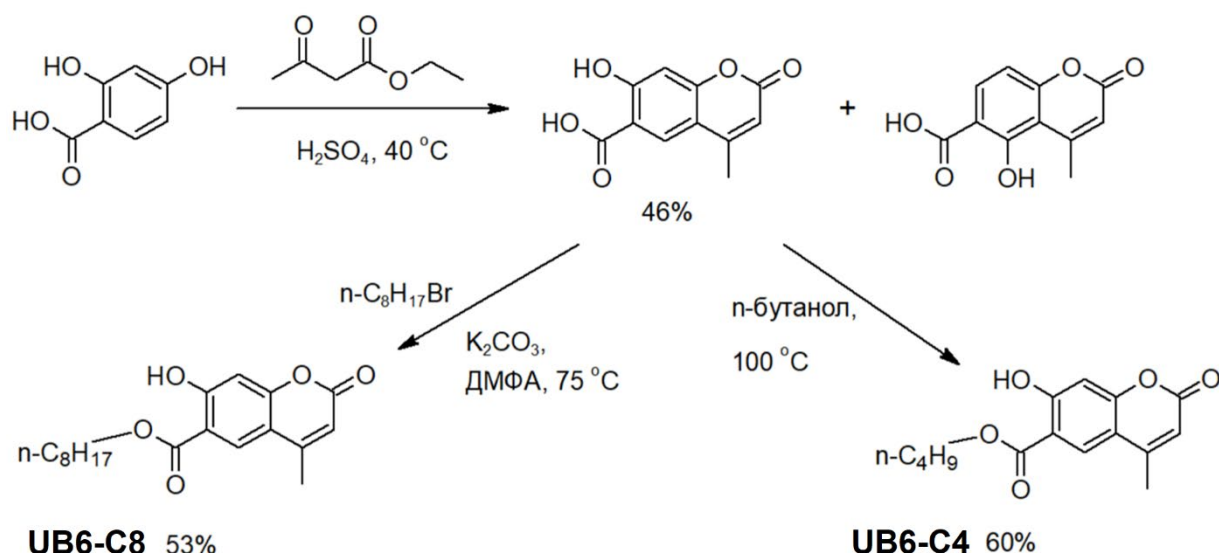


Рисунок 62. Схема двустадийного синтеза производных 7-гидроxicумарин-4-метил-6-карбоновой кислоты.

Измерения сброса мембранного 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 63).

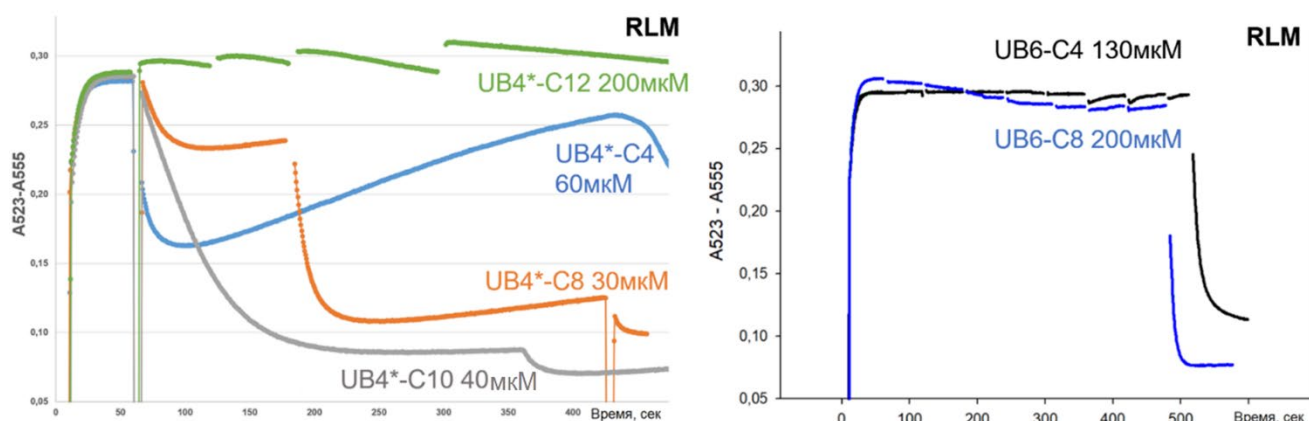


Рисунок 63. Влияние сложных эфиров 7-гидроxicумарин-4-карбоновой кислоты (UB4\*-C4 – UB4\*-C12) и умбеллиферон-4-метил-6-карбоновой кислоты (бутиловый UB6-C4 и октиловый UB6-C8) на мембранный потенциал выделенных митохондрий печени крыс (RLM). UB4\*-Cn разобщают на порядок хуже UB3-Cn производных соответствующей длины, а UB6-Cn сложные эфиры не проявляют активности. Подписанные концентрации – в финальный момент наблюдения; добавки делались равными порциями.

### 3.8 Производные умбеллиферон-4-глиоксалевой кислоты – новые ингибиторы карбоксилаз

В литературе представлены данные об ингибиторной активности некоторых 1,2-дионов и β-лапахона, в частности, по отношению к CES [154]. Введение альфа-кетогруппы в сложные эфиры умбеллиферон-4-уксусной кислоты по реакции Райли (соединения UB4-COC8 и UB4-



COC10; рисунок 64) интересным образом изменило их биологическую активность: было обнаружено, что такие соединения эффективно замедляют гидролиз других сложных эфиров умбеллиферона в наномолярном диапазоне, так на рисунке 65 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.

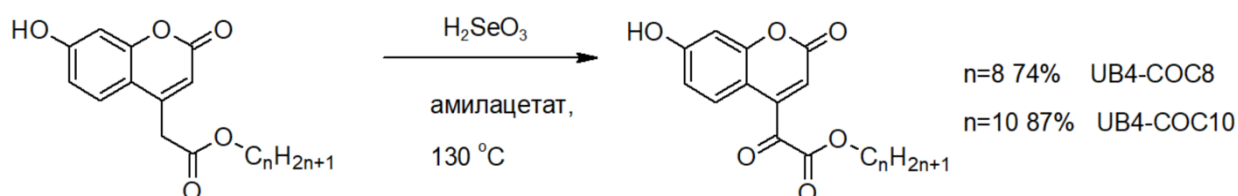


Рисунок 64. Схема синтеза сложных эфиров 7-гидроксикумарин-4-глиоксалевой кислоты.

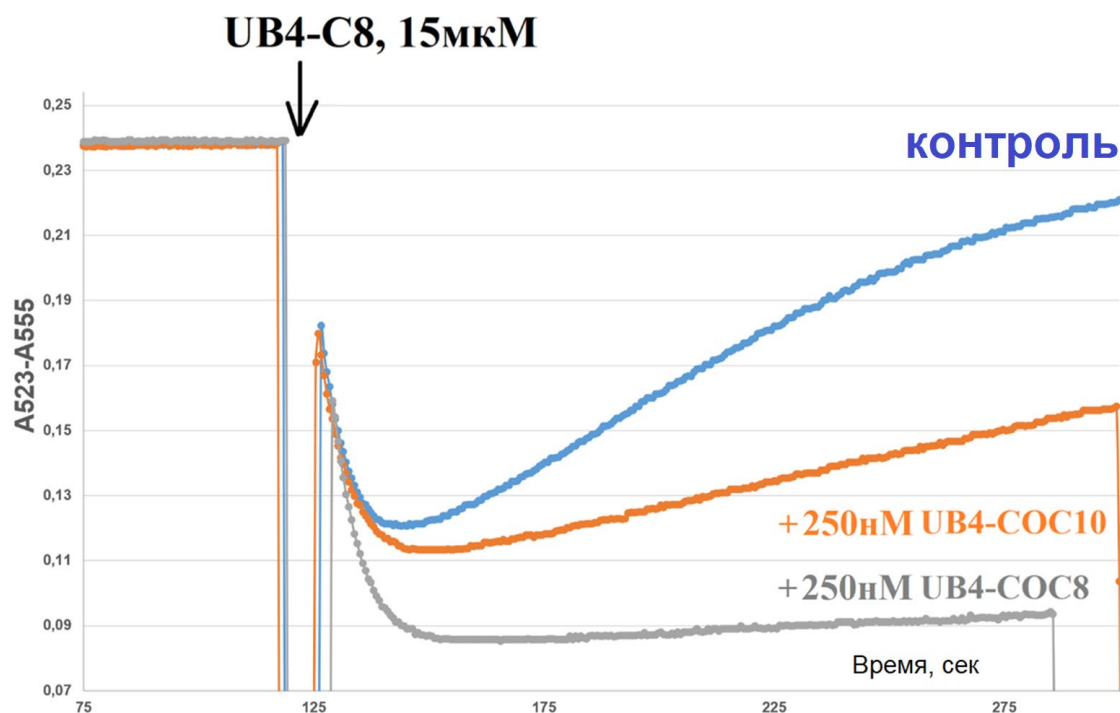


Рисунок 65. Сложные эфиры умбеллиферон-4-глиоксалевой кислоты замедляют исчезновение разобщающей активности UB4-C8 на митохондриях печени крысы (RLM). Синяя линия – контрольный опыт по сбросу мембранного потенциала под действием UB4-C8. Оранжевая и серая – эффект прединкубации RLM с дециловым и октиловым эфиром умбеллиферон-4-глиоксалевой кислоты соответственно.

### 3.8 Исследование флуазинама и производных фенил-тиофенамина [155], [156]

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

Для флуазинама авторы [117] 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 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, преинкубация с которым убирает весь GSH из среды) (рисунок 66).

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 мембранного 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 67).

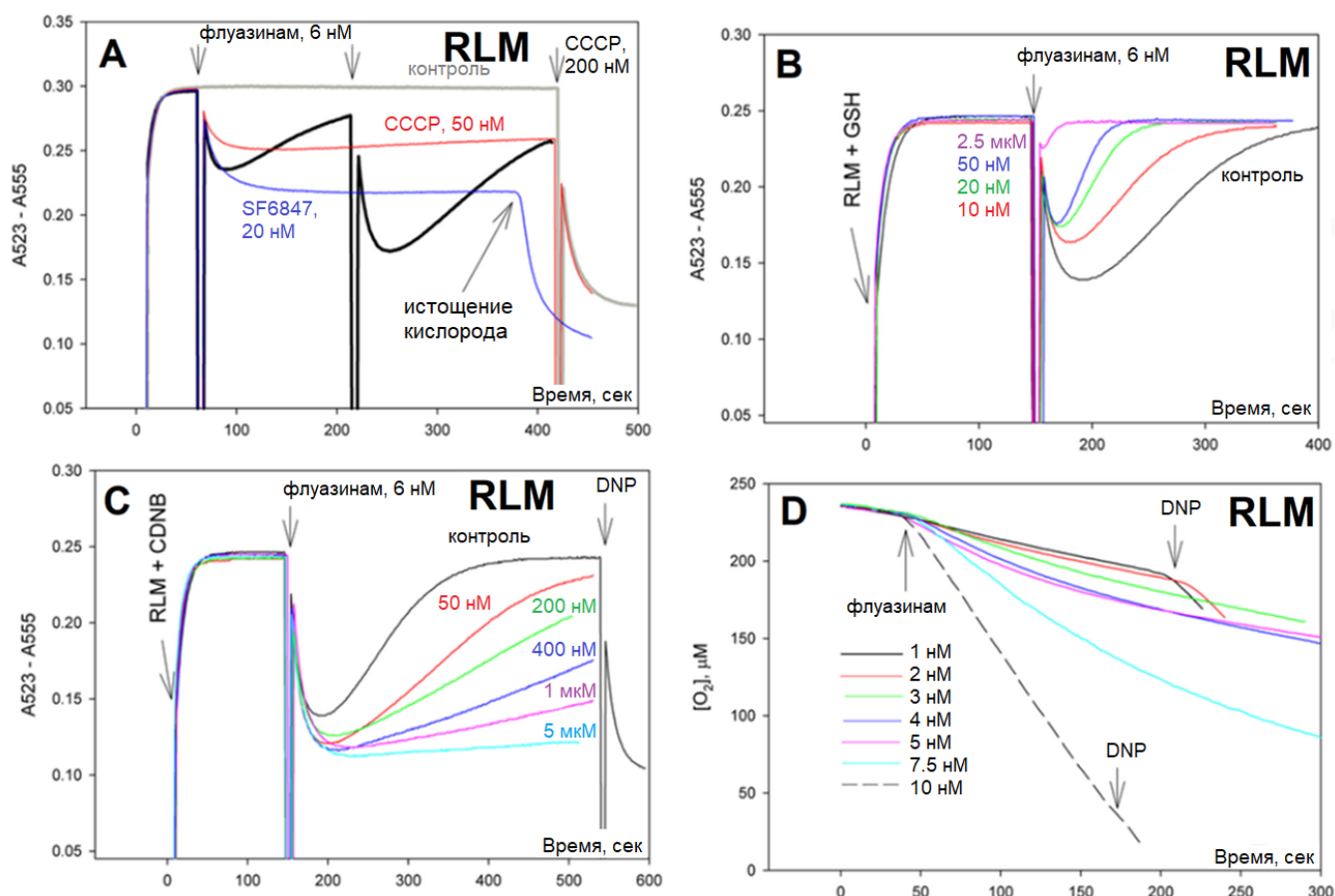


Рисунок 66. Действие флуазилама на мембранный потенциал (A-C) и дыхание (D) энергизованных изолированных митохондрий печени крысы (RLM). Наблюдается исчезновение разобщающей активности, в сопоставимых с SF6847 концентрациях (A). Прединкубация митохондрий с глутатионом (B) дозозависимо ускоряет, а с динитрохлорбензолом (CDNB; C) - замедляет эффект ресопряжения, что говорит о GST-зависимом механизме инактивации.

Кроме того, методами капиллярного электрофореза, ТСХ и LC-MS было показано образование химических конъюгатов глутатиона и флуазилама (рисунок 68). Так, после инкубации разобщителя с митохондриями печени (даже без добавления GSH) на ВЭЖХ хроматограмме присутствует только 1 пик (с  $t_R \approx 2$ ), соответствующий монозамещённому по атому хлора бензольного кольца производному (рядом с электрон-акцепторной нитрогруппой). Но в случае неферментативного замещения (при инкубации флуазилама только с GSH в сильнощелочных условиях) появляется два дополнительных пика с  $[M+H]^+ = 996$ , соответствующие диконъюгату по хлору и какой-либо из нитрогрупп. При инкубации с RKM модификации разобщителя не происходит.

Исходя из полученных данных, мы сделали вывод о каталитическом глутатионировании флуазилама как механизме тканеспецифичной спонтанной инактивации данного разобщителя.

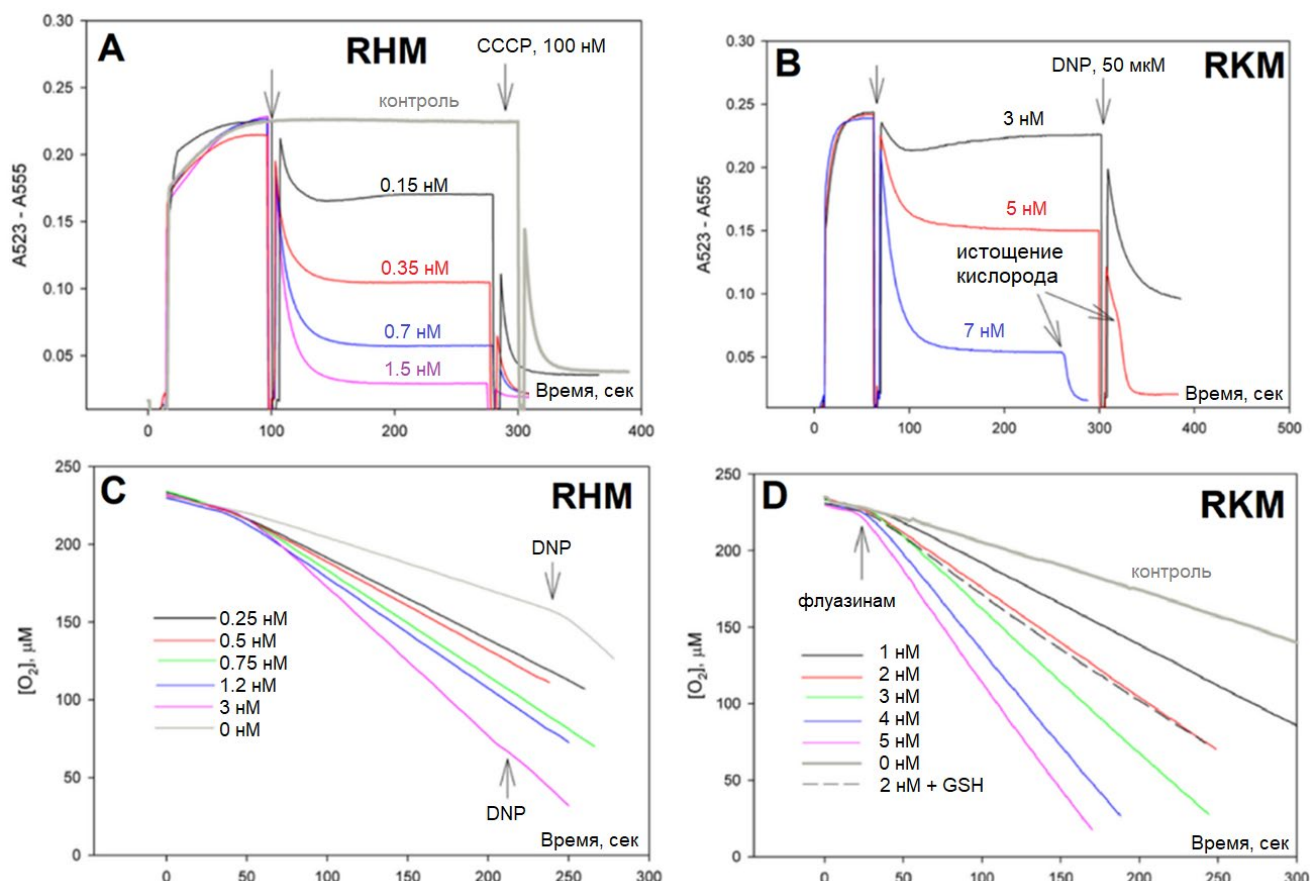


Рисунок 67. Эксперименты, доказывающие тканеспецифичность действия флуази́нама. Отсутствие исчезновения сброса мембранного потенциала и гораздо большее ускорения дыхания наблюдается в случае митохондрий сердца (RHM; **A**, **B**) и почек (RKM; **C**, **D**) крыс.

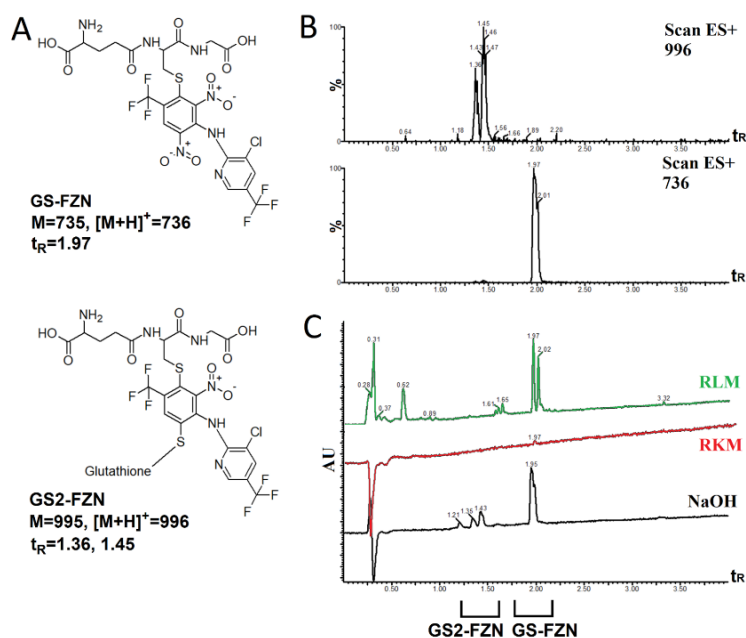


Рисунок 68. **A** – Химическая структура возможных конъюгатов флуази́нама и глутатиона: происходит замещение атома хлора (GS-FZN) и, дополнительно, одной из двух нитрогрупп (GS2-FZN, t<sub>R</sub>=1.36, 1.45). **B** – Сканирование по массе смеси после инкубирования флуази́нама с глутатионом в сильнощелочных условиях. Моноконъюгат GS-FZN имеет t<sub>R</sub>=1.97, а диконъюгаты GS2-FZN - t<sub>R</sub>=1.36, 1.45. **C** – УФ хроматограмма после инкубации флуази́нама с RLM (зелёная линия), RKM (красная) и NaOH (чёрная). В последнем случае видны пики всех трёх производных, с RLM – только GS-FZN, с RKM реакция не происходит.

Аналогичная серия экспериментов по изучению разобщающей активности была проведена для производных фенилтиофенамина. 4-хлорфенил, 2,6-диметилфенил и 4-нитрофенил производные 5-бром-3,4-динитротиофен-2-амина (BDCT, BDDT и BDNT соответственно) были синтезированы по методике [124] (рисунок 69).

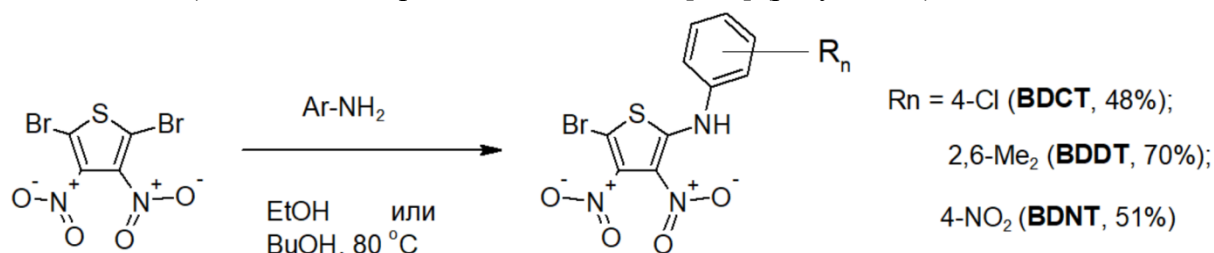


Рисунок 69. Схема синтеза производных фенилтиофенамина.

Как и флуазином, 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 70). Самым сильным разобщителем серии был BDNT, что согласуется с работой [124].

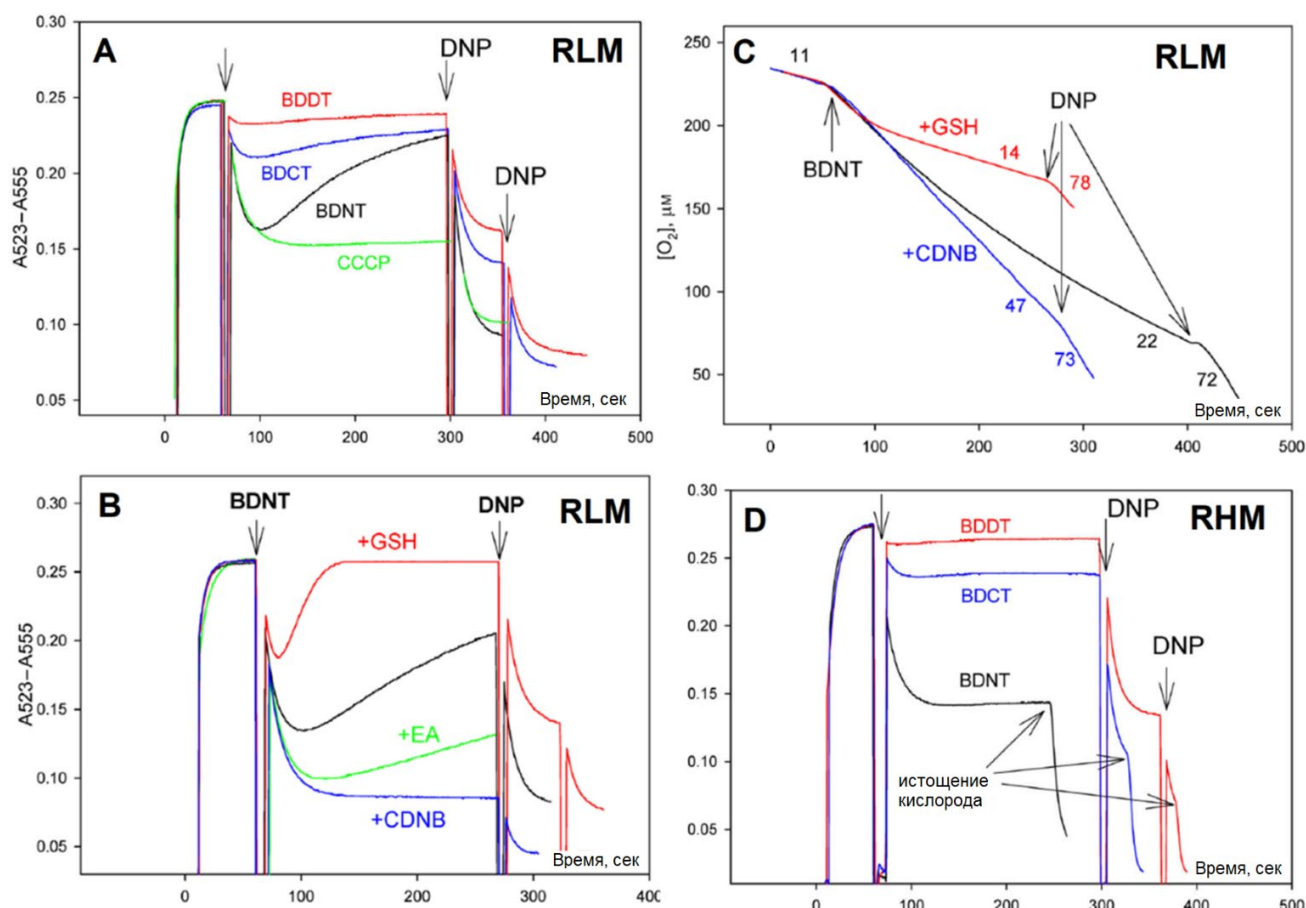


Рисунок 70. Действие производных фенилтиофенамина BDCT, BDDT и BDNT на мембранный потенциал и дыхание энергизованных изолированных митохондрий печени (RLM; A-C) и сердца крысы (RHM; D). Аналогично флуазиному, наблюдается зависимость от глутатиона, динитрохлорбензола и ингибитора GST – этакриновой кислоты (EA). Можно утверждать об схожей с производными кумарина и флуазинома тканеспецифичности разобщающего действия и аналогичном FZN GST-зависимом механизме инактивации.

Образование конъюгата GS-BDNT путем замещения атома брома детектировали методами ТСХ, LC-MS и СЕ (рисунок 71). Дополнительно было показано его образование при инкубировании BDNT и GSH с GST печени лошади (CAS 50812-37-8) (по ТСХ, данные не приведены).

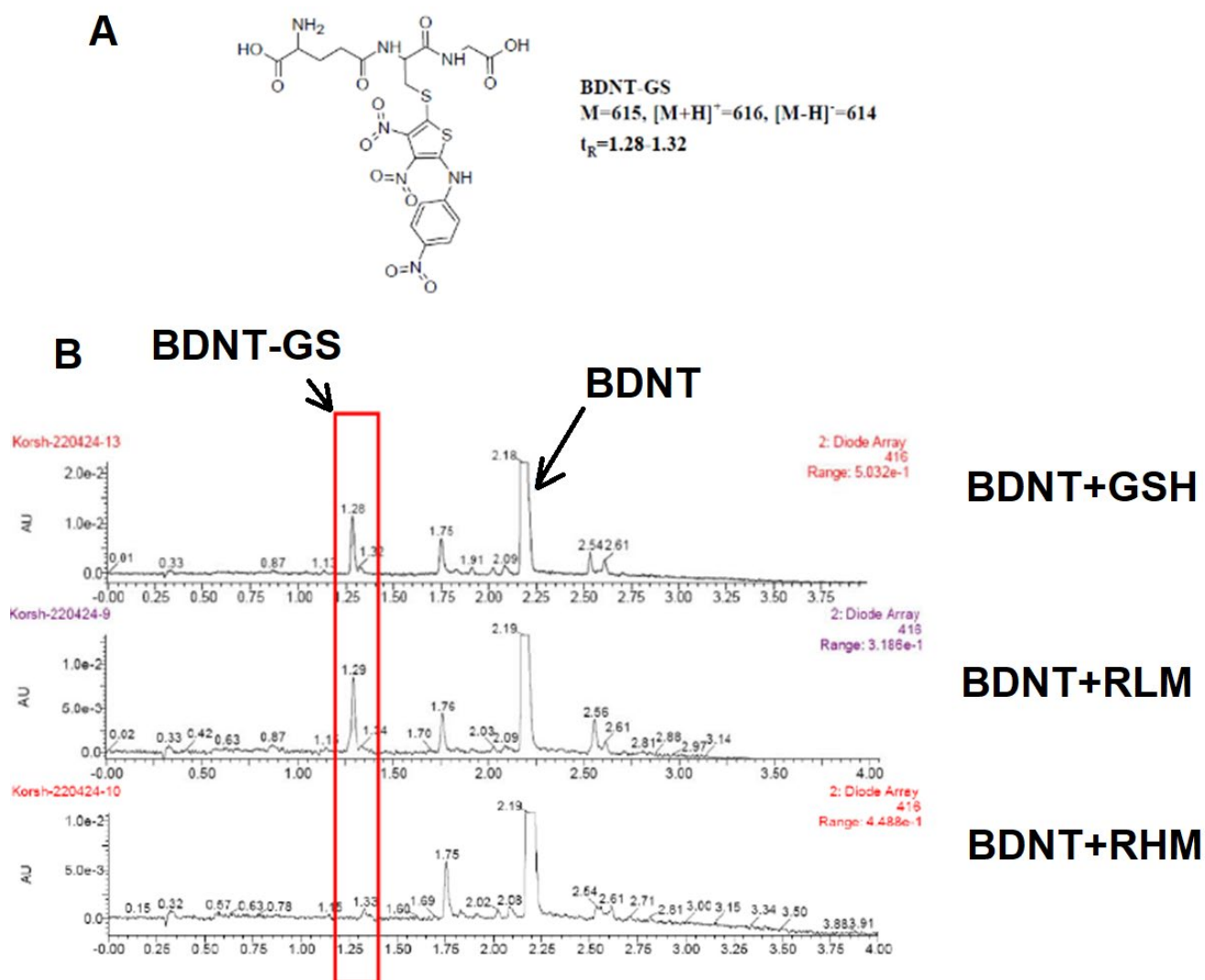


Рисунок 71. **A** – Химическая структура конъюгата 5-бром-3,4-динитро-(4-нитрофенил)-тиофен-2-амин и глутатиона: происходит замещение атома брома. **B** – Увеличенная хроматограмма смеси после инкубации BDNT с GSH, RLM или RHM. BDNT-GS, имеющий t<sub>R</sub>=1.28-1.32 (из-за нескольких отличающихся условий ВЭЖХ), наблюдается в первых двух случаях, но не при инкубации с митохондриями сердца.



### Заключение

Подводя итоги работы, можно утверждать, что поставленные цели и задачи исследования выполнены. Путем присоединения гидрофобного (алкильного) заместителя оптимальной длины к 7-гидроксикумариновому остову 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-гидроксикумарин-содержащих 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  $\alpha$ -кетозэфиров. Дальнейшее исследование, проведённое для известных ранее разобщителей с аналогичными свойствами – флуазинама и производных анилинотиофена – показало, что они теряли свою активность посредством другого механизма, зависящего 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 (ТСХ 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 остова, негидролизуемые производные и аналоги без протонофорной группы. Наибольшую разобщающую активность проявляли 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 фенилтиофенаминов биофизическими и химическими методами доказан другой, глутатион-зависимый механизм тканеспецифичного исчезновения разобщающей активности.

1. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. // *Nature*. 1961. V. 191. P. 144-148.  
DOI: 10.1038/191144a0
2. Loomis W.F., Lipmann F. Reversible inhibition of the coupling between phosphorylation and oxidation. // *J Biol Chem*. 1948. V. 173. № 2. P. 807.  
PMID: 18910739.
3. Ricquier D., Kader J.C. Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. // *Biochem Biophys Res Commun*. 1976. V. 73. № 3. P. 577-583.  
DOI: 10.1016/0006-291x(76)90849-4
4. Nedergaard J., Cannon B., Lindberg O. Microcalorimetry of isolated mammalian cells. // *Nature*. 1977. V. 267. № 5611. P. 518-520.  
DOI: 10.1038/267518a0
5. Heaton G.M., Wagenvoort R.J., Kemp A. Jr, Nicholls D.G. Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. // *Eur J Biochem*. 1978. V. 82. № 2. P. 515-521.  
DOI: 10.1111/j.1432-1033.1978.tb12045.x
6. Solmonson A., Mills E. M. Uncoupling Proteins and the Molecular Mechanisms of Thyroid Thermogenesis. // *Endocrinology*. 2016. V. 157. № 2. P. 455–462.  
DOI: 10.1210/en.2015-1803
7. Bertholet A.M., Kirichok Y. Mitochondrial H<sup>+</sup> Leak and Thermogenesis. // *Annu Rev Physiol*. 2022. V. 84. P. 381-407.  
DOI: 10.1146/annurev-physiol-021119-034405
8. J. Enrique Silva. Thermogenic Mechanisms and Their Hormonal Regulation. // *Physiological Reviews*. 2006. V. 86. № 2. P. 435-464.  
DOI: 10.1152/physrev.00009.2005
9. Saito S., Saito C.T., Shingai R. Adaptive evolution of the uncoupling protein 1 gene contributed to the acquisition of novel nonshivering thermogenesis in ancestral eutherian mammals. // *Gene*. 2008. V. 408. № 1-2. P. 37-44.  
DOI: 10.1016/j.gene.2007.10.018
10. Robinson A.J., Overy C., Kunji E.R. The mechanism of transport by mitochondrial carriers based on analysis of symmetry. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008. V. 105. № 46. P. 17766-17771.  
DOI: 10.1073/pnas.0809580105



11. Jones S.A., Gogoi P., Ruprecht J.J., King M.S., Lee Y., Zögg T., Pardon E., Chand D., Steimle S., Copeman D.M., Cotrim C.A., Steyaert J., Crichton P.G., Moiseenkova-Bell V., Kunji E.R.S. Structural basis of purine nucleotide inhibition of human uncoupling protein 1. // *Sci Adv.* 2023. V. 9. № 22. eadh4251.

DOI: 10.1126/sciadv.adh4251

12. Kang Y., Chen L. Structural basis for the binding of DNP and purine nucleotides onto UCP1. // *Nature.* 2023. V. 620. № 7972. P. 226-231.

DOI: 10.1038/s41586-023-06332-w

13. Demine S., Renard P., Arnould T. Mitochondrial Uncoupling: A Key Controller of Biological Processes in Physiology and Diseases. // *Cells.* 2019. V. 8. № 8. P. 795.

DOI: 10.3390/cells8080795

14. Nath S. Molecular mechanistic insights into uncoupling of ion transport from ATP synthesis. // *Biophys Chem.* 2018. V. 242. P. 15-21.

DOI: 10.1016/j.bpc.2018.08.006

15. Childress E. et al. Small Molecule Mitochondrial Uncouplers and Their Therapeutic Potential. // *Journal of Medicinal Chemistry.* 2017 V. 61. № 11.

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b01182

16. Mei Ying Ng, Zhi Jian Song, Choon Hong Tan, Marcella Bassetto, Thilo Hagen. Structural investigations on the mitochondrial uncouplers niclosamide and FCCP. // *FEBS openbio.* 2024 V.14. № 7. P. 1057-1071.

DOI: 10.1002/2211-5463.13817

17. Naven R.T., Swiss R., Klug-Mcleod J., Will Y., Greene N. The Development of Structure-Activity Relationships for Mitochondrial Dysfunction: Uncoupling of Oxidative Phosphorylation. // *Toxicological Sciences.* 2013. V. 131. № 1. P. 271–278.

DOI: 10.1093/toxsci/kfs279

18. Lou P.-H., Hansen B.S., Olsen P.H., Tullin S., Murphy M.P., Brand M.D. Mitochondrial uncouplers with an extraordinary dynamic range. // *Biochem J.* 2007. V. 407. № 1. P. 129–140.

DOI: 10.1042/BJ20070606

19. Котова Е.А., Антоненко Ю.Н. 50 лет изучения протонофоров: разобшение митохондрий как основа терапевтического действия. // *ActaNaturae.* 2022. Т. 15. № 1. С. 4-13.

DOI: 10.32607/actanaturae.11610

20. Horgan D.J., Stoops J.K., Webb E.C., Zerner B. Carboxylesterases (EC 3.1.1). A large-scale purification of pig liver carboxylesterase. // *Biochemistry.* 1969. V. 8. № 5. P. 2000-2006.

DOI: 10.1021/bi00833a033. PMID: 5785220.

21. Iaubasarova I.R., Khailova L.S., Firsov A.M., Grivennikova V.G., Kirsanov R.S., Korshunova G.A., Kotova E.A., Antonenko Y.N. The mitochondria-targeted derivative of the classical uncoupler of oxidative phosphorylation carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone is an effective mitochondrial recoupler // *PLoS One*. 2020. Vol. 15. e0244499.

DOI: 10.1371/journal.pone.0244499

22. Kirsanov R.S., Khailova L.S., Rokitskaya T.I., Lyamzaev K.G., Panteleeva A.A., Nazarov P.A., Firsov A.M., Iaubasarova I.R., Korshunova G.A., Kotova E.A., Antonenko Y.N. Synthesis of Triphenylphosphonium-Linked Derivative of 3,5-Ditert-butyl-4-hydroxybenzylidene-malononitrile (SF6847) via Knoevenagel Reaction Yields an Effective Mitochondria-Targeted Protonophoric Uncoupler // *ACS Omega*. 2024. Vol. 9. № 10. P. 11551-11561.

DOI: 10.1021/acsomega.3c08621

23. McLaughlin S.G., Dilger J.P. Transport of protons across membranes by weak acids. // *Physiol.Rev.* 1980. V. 60. № 3. P. 825-863.

DOI: 10.1152/physrev.1980.60.3.825

24. Shrestha R., Johnson E., Byrne F.L. Exploring the therapeutic potential of mitochondrial uncouplers in cancer. // *Mol Metab*. 2021. V. 51. P. 101222.

DOI: 10.1016/j.molmet.2021.101222

25. Popova L. B., Nosikova E. S., Kotova E. A., Tarasova E. O., Nazarov P. A., Khailova L. S., Balezina O. P., Antonenko Y. N. Protonophoric action of triclosan causes calcium efflux from mitochondria, plasma membrane depolarization and bursts of miniature end-plate potentials. // *Biochim.Biophys.Acta Biomembr.* 2018. V. 1860. P. 1000-1007.

DOI: 10.1016/j.bbamem.2018.01.008

26. Luo X., Qian L., Xiao Y., Tang Y., Zhao Y., Wang X., Gu L., Lei Z., Bao J., Wu J., He T., Hu F., Zheng J., Li H., Zhu W., Shao L., Dong X., Chen D., Qian X., Yang Y. A diversity-oriented rhodamine library for wide-spectrum bactericidal agents with low inducible resistance against resistant pathogens. // *Nat.Commun.* 2019. V. 10. P. 258.

DOI: 10.1038/s41467-018-08241-3

27. Nazarov P. A., Maximov V. S., Firsov A. M., Karakozova M. V., Panfilova V., Kotova E. A., Skulachev M. V., and Antonenko Y. N. Rhodamine 19 Alkyl Esters as Effective Antibacterial Agents. // *Int.J.Mol.Sci.* 2024. V. 25. P. 6137.

DOI: 10.3390/ijms25116137

28. Nazarov P. A., Kirsanov R. S., Denisov S. S., Khailova L. S., Karakozova M. V., Lyamzaev K. G., Korshunova G. A., Lukyanov K. A., Kotova E. A., Antonenko Y. N. Fluorescein derivatives as antibacterial agents acting via membrane depolarization. // *Biomolecules*. 2020. V. 10. P. 309.

DOI: 10.3390/biom10020309

29. Goedeke L., Shulman G.I. Therapeutic potential of mitochondrial uncouplers for the treatment of metabolic associated fatty liver disease and NASH. // *Mol Metab.* 2021. V. 46. P. 101178.  
DOI: 10.1016/j.molmet.2021.101178
30. Ma M., Zhong J., Tai Y. et al. Combining RNA-seq, molecular docking and experimental verification to explore the mechanism of BAM15 as a potential drug for atherosclerosis. // *Sci Rep.* 2025. V. 15. P. 13347.  
DOI: 10.1038/s41598-025-98209-3
31. Ng M.Y., Song Z.J., Venkatesan G. et al. Conjugating uncoupler compounds with hydrophobic hydrocarbon chains to achieve adipose tissue selective drug accumulation. // *Sci Rep.* 2024. V. 14. P. 4932.  
DOI: 10.1038/s41598-024-54466-2
32. Song Y., Villeneuve, D.L. AOP Report: Uncoupling of Oxidative Phosphorylation Leading to Growth Inhibition via Decreased Cell Proliferation. // *Environmental Toxicology and Chemistry.* 2021. V. 40. № 11. P. 2959–2967.  
DOI: 10.1002/etc.5197
33. Hijazin T., Radwan A., Abouzeid S., Dräger G., Selmar D. Uptake and modification of umbelliferone by various seedlings. // *Phytochemistry.* 2019. V. 157. P. 194-199.  
DOI: 10.1016/j.phytochem.2018.10.032
34. Kornicka A., Balewski Ł., Lahutta M., Kokoszka J. Umbelliferone and Its Synthetic Derivatives as Suitable Molecules for the Development of Agents with Biological Activities: A Review of Their Pharmacological and Therapeutic Potential. // *Pharmaceuticals (Basel).* 2023. V. 16. № 12. P. 1732.  
DOI: 10.3390/ph16121732
35. Mazimba O. Umbelliferone: Sources, chemistry and bioactivities review. // *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University.* 2017. V. 55. № 2. P. 223-232.  
DOI: 10.1016/j.bfopcu.2017.05.001
36. Dawidowicz A.L., Bernacik K., Typek R. Umbelliferone instability during an analysis involving its extraction process. // *Monatsh Chem.* 2018. V. 149. № 8. P. 1327-1340.  
DOI: 10.1007/s00706-018-2188-9
37. Du L., Li M., Zheng S., Wang B. Rational Design of a Fluorescent Hydrogen Peroxide Probe Based on the Umbelliferone Fluorophore. // *Tetrahedron Lett.* 2008. V. 49. № 19. P. 3045-3048.  
DOI: 10.1016/j.tetlet.2008.03.063
38. Yang D., Li Z., Allan Diwu Y., Fu H., Liao J., Wei C., Diwu Z. A novel fluorogenic coumarin substrate for monitoring acid phosphatase activity at low pH environment. // *Curr Chem Genomics.* 2008. V. 14. № 2. P. 48-50.

DOI: 10.2174/1875397300802010048

39. Zhang X.P., Yuan Q., Qi Y.L., Zheng D.J., Liu Q.X., Wang B.Z., Yang Y.S., Zhu H.L. An umbelliferone-derivated fluorescent sensor for selective detection of palladium(II) from palladium(0) in living cells. // *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2019. V. 220. P. 117134.

DOI: 10.1016/j.saa.2019.05.039

40. Choo M.Z.Y., Chua J.A.T., Lee S.X.Y., Ang Y., Fred Wong W. S., Chai C.L.L. Privileged natural product compound classes for anti-inflammatory drug development. // *Nat. Prod. Rep.* 2025. V. 42. P. 856-875.

DOI: 10.1039/D4NP00066H

41. Seong S.H., Ali M.Y., Jung H.A., Choi J.S. Umbelliferone derivatives exert neuroprotective effects by inhibiting monoamine oxidase A, self-amyloid $\beta$  aggregation, and lipid peroxidation. // *Bioorg Chem.* 2019. V. 92. P.103293.

DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.103293

42. Al-Majedy Y.K., Al-Duhaidahawi D.L., Al-Azawi K.F., Al-Amiery A.A., Kadhum A.A., Mohamad A.B. Coumarins as Potential Antioxidant Agents Complemented with Suggested Mechanisms and Approved by Molecular Modeling Studies. // *Molecules.* 2016. V. 21. № 2. P. 135.

DOI: 10.3390/molecules21020135

43. Kimura Y., Sumiyoshi M. Antitumor and antimetastatic actions of dihydroxycoumarins (esculetin or fraxetin) through the inhibition of M2 macrophage differentiation in tumor-associated macrophages and/or G1 arrest in tumor cells. // *Eur J Pharmacol.* 2015. V. 746. P. 115-25.

DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.10.048

44. Chu L.L., Pandey R.P., Lim H.N., Jung H.J., Thuan N.H., Kim T.S., Sohng J.K. Synthesis of umbelliferone derivatives in *Escherichia coli* and their biological activities. // *J Biol Eng.* 2017. V. 11. P. 15.

DOI: 10.1186/s13036-017-0056-5

45. Maleki E.H., Bahrami A.R., Sadeghian H., Matin M.M. Discovering the structure-activity relationships of different O-prenylated coumarin derivatives as effective anticancer agents in human cervical cancer cells. // *Toxicol In Vitro.* 2020. V. 63. P. 104745.

DOI: 10.1016/j.tiv.2019.104745

46. Abdizadeh T., Kalani M.R., Abnous K., Tayarani-Najaran Z., Khashyarmanesh B.Z., Abdizadeh R., Ghodsi R., Hadizadeh F. Design, synthesis and biological evaluation of novel coumarin-based benzamides as potent histone deacetylase inhibitors and anticancer agents. // *Eur J Med Chem.* 2017. V. 132. P. 42-62.

DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.03.024

47. Yang F., Zhao N., Song J., Zhu K., Jiang C.S., Shan P., Zhang H. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Coumarin-Based Hydroxamate Derivatives as Histone Deacetylase (Hdac) Inhibitors with Antitumor Activities. // *Molecules*. 2019. V. 24. № 14. P. 2569.

DOI: 10.3390/molecules24142569

48. Ding J., Liu J., Zhang Z., Guo J., Cheng M., Wan Y., Wang R., Fang Y., Guan Z., Jin Y., Xie S.S. Design, synthesis and biological evaluation of coumarin-based N-hydroxycinnamamide derivatives as novel histone deacetylase inhibitors with anticancer activities. // *Bioorg Chem*. 2020. V. 101. P. 104023.

DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104023

49. Williams F.M. Clinical significance of esterases in man. // *Clin Pharmacokinet*. 1985. V. 10. № 5. P. 392-403.

DOI: 10.2165/00003088-198510050-00002

50. Oakeshott J.G. Biochemical Genetics and Genomics of Insect Esterases. // *Comprehensive Molecular Insect Science*. 2005. V. 5. P. 309–381.

DOI: 10.1016/B0-44-451924-6/00073-9

51. Jinghui Lai J., Huang H., Lin M., Xu Y., Li X., Sun B. Enzyme catalyzes ester bond synthesis and hydrolysis: The key step for sustainable usage of plastics. // *Front. Microbiol*. 2023. V.13.

DOI: 10.3389/fmicb.2022.1113705

52. Wang D., Zou L., Jin Q., Hou J., Ge G., Yang L. Human carboxylesterases: a comprehensive review. // *Acta Pharm Sin B*. 2018. V. 8. № 5. P. 699-712.

DOI: 10.1016/j.apsb.2018.05.005.

53. Jiang Ao et al. Ratiometric two-photon fluorescent probe for in situ imaging of carboxylesterase (CE)-mediated mitochondrial acidification during medication. // *Chem. Commun*. 2019. V. 55. P. 11358-11361.

DOI: 10.1039/C9CC05759E

54. Miwa Satomi et al. Carboxylesterase converts Amplex red to resorufin: Implications for mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release assays. // *Free Radical Biology and Medicine*. 2016. V. 90. P. 173-183.

DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.11.011

55. Draganov D.I., Teiber J.F., Speelman A., Osawa Y., Sunahara R., La Du B.N. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. // *J Lipid Res*. 2005. V. 46. № 6. P. 1239-1247.

DOI: 10.1194/jlr.M400511-JLR200

56. Sussman J.L., Harel M., Frolova F., Oefner C., Goldman A., Toker L., Silman I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. // *Science*. 1991. V. 253. № 5022. P. 872-879.

DOI: 10.1126/science.1678899

57. Martinez C., De Geus P., Lauwereys M., Matthyssens G., Cambillau C. Fusarium solani cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. // *Nature*. 1992. V. 356. P. 615–618.

DOI: 10.1038/356615a0

58. Neitzel J.J. Enzyme Catalysis: The Serine Proteases. // *Nature Education*. 2010. V. 3. № 9. P. 21.

59. Tang S., Beattie A.T., Kafkova L. et al. Mechanism-based traps enable protease and hydrolase substrate discovery. // *Nature*. 2022. V. 602. P. 701–707.

DOI: 10.1038/s41586-022-04414-9

60. Brady L., Brzozowski A., Derewenda Z. et al. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. // *Nature*. 1990. V. 343. P. 767–770.

DOI: 10.1038/343767a0

61. Dijkstra B.W., Renetseder R., Kalk K.H., Hol W.G.J., Drenth K., Huber R. Structure of porcine pancreatic phospholipase A2 at 2·6resolution and comparison with bovine phospholipase A2. // *Journal of Molecular Biology*. 1983. V. 168. № 1. P. 163-179.

DOI: 10.1016/S0022-2836(83)80328-3

62. Gao J., Hao Y., Piao X., Gu X. Aldehyde Dehydrogenase 2 as a Therapeutic Target in Oxidative Stress-Related Diseases: Post-Translational Modifications Deserve More Attention. // *Int J Mol Sci*. 2022. V. 23. № 5. P. 2682.

DOI: 10.3390/ijms23052682

63. Xanthis V., Mantso T., Dimtsi A., Pappa A., Fadouloglou V.E. Human Aldehyde Dehydrogenases: A Superfamily of Similar Yet Different Proteins Highly Related to Cancer. // *Cancers (Basel)*. 2023. V. 15. № 17. P. 4419.

DOI: 10.3390/cancers15174419

64. Koppaka V., Thompson D.C., Chen Y., Ellermann M., Nicolaou K.C., Juvonen R.O., Petersen D., Deitrich R.A., Hurley T.D., Vasiliou V. Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. // *Pharmacol Rev*. 2012. V. 64. № 3. P. 520-539.

DOI: 10.1124/pr.111.005538

65. Oyama T., Isse T., Kagawa N., Kinaga T., Kim Y.D., Morita M., Sugio K., Weiner H., Yasumoto K., Kawamoto T. Tissue-distribution of aldehyde dehydrogenase 2 and effects of the ALDH2 gene-disruption on the expression of enzymes involved in alcohol metabolism. // *Front Biosci*. 2005. V. 1. № 10. P. 951-960.

DOI: 10.2741/1589

66. Shortall K., Djeghader A., Magner E., Soulimane T. Insights into Aldehyde Dehydrogenase Enzymes: A Structural Perspective. // *Front Mol Biosci*. 2021. V. 14. № 8. P. 659550.  
DOI: 10.3389/fmolb.2021.659550
67. Fojan P., Jonson P.H., Petersen M.T.N., Petersen S.B. What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. // *Biochimie*. 2000. V. 82. № 11. P. 1033-1041.  
DOI: 10.1016/S0300-9084(00)01188-3
68. Koivisto T., Carr L.G., Li T.K., Eriksson C.J. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) polymorphism in AA and ANA rats: lack of genotype and phenotype line differences. // *Pharmacol Biochem Behav*. 1993. V. 45. № 1. P. 215-220.  
DOI: 10.1016/0091-3057(93)90107-5
69. Zambelli V.O., Gross E.R., Chen C.H., Gutierrez V.P., Cury Y., Mochly-Rosen D. Aldehyde dehydrogenase-2 regulates nociception in rodent models of acute inflammatory pain. // *Sci Transl Med*. 2014. V. 6(251). №251ra118.  
DOI: 10.1126/scitranslmed.3009539
70. Castellví A., Pequerul R., Barracco V. et al. Structural and biochemical evidence that ATP inhibits the cancer biomarker human aldehyde dehydrogenase 1A3. // *Commun Biol*. 2022. V. 5. P. 354.  
DOI: 10.1038/s42003-022-03311-1
71. Lipsky J.J., Shen M.L., Naylor S. Overview — In vitro inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram and metabolites. // *Chemico-Biological Interactions*. 2001. V. 130–132. P. 81-91.  
DOI: 10.1016/S0009-2797(00)00224-6
72. Buchman C.D., Hurley T.D. Inhibition of the Aldehyde Dehydrogenase 1/2 Family by Psoralen and Coumarin Derivatives. // *J. Med. Chem*. 2017. V. 60. № 6. P. 2439–2455.  
DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b01825
73. Jiang W., Chen J., Zhang P., Zheng N., Ma L., Zhang Y., Zhang H. Repurposing Drugs for Inhibition against ALDH2 via a 2D/3D Ligand-Based Similarity Search and Molecular Simulation. // *Molecules*. 2023. V. 28. № 21. P. 7325.  
DOI: 10.3390/molecules28217325
74. Chen Y., Zhu J.Y., Hong K.H., Mikles D.C., Georg G.I., Goldstein A.S., Amory J.K., Schönbrunn E. Structural Basis of ALDH1A2 Inhibition by Irreversible and Reversible Small Molecule Inhibitors. // *ACS Chem Biol*. 2018. V. 13. № 3. P. 582-590.  
DOI: 10.1021/acscchembio.7b00685
75. Khanna M., Chen C.H., Kimble-Hill A., Parajuli B., Perez-Miller S., Baskaran S., Kim J., Dria K., Vasiliou V., Mochly-Rosen D., Hurley T.D. Discovery of a novel class of covalent inhibitor for aldehyde dehydrogenases. // *J Biol Chem*. 2011. V. 286. № 50. P. 43486-43494.  
DOI: 10.1074/jbc.M111.293597

76. Mittal M., Bhagwati S., Siddiqi M.I., Chattopadhyay N. A critical assessment of the potential of pharmacological modulation of aldehyde dehydrogenases to treat the diseases of bone loss. // *European Journal of Pharmacology*. 2020. V. 886. № 5. P. 173541.

DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173541

77. Lian J., Nelson R., Lehner R. Carboxylesterases in lipid metabolism: from mouse to human. // *Protein Cell*. 2018. V. 9. № 2. P. 178-195.

DOI: 10.1007/s13238-017-0437-z

78. Eisner H., Riegler-Berket L., Gamez C.F.R., Sagmeister T., Chalhoub G., Darnhofer B., Jazleena P.J., Birner-Gruenberger R., Pavkov-Keller T., Haemmerle G., Schoiswohl G., Oberer M. The Crystal Structure of Mouse Ces2c, a Potential Ortholog of Human CES2, Shows Structural Similarities in Substrate Regulation and Product Release to Human CES1. // *Int J Mol Sci*. 2022. V. 23. № 21. P. 13101.

DOI: 10.3390/ijms232113101

79. Hosokawa M. Structure and catalytic properties of carboxylesterase isozymes involved in metabolic activation of prodrugs. // *Molecules*. 2008. V. 13. № 2. P. 412-431.

DOI: 10.3390/molecules13020412

80. Wang Yg., Gan Cp., Beukers-Korver J. et al. Intestinal human carboxylesterase 2 (CES2) expression rescues drug metabolism and most metabolic syndrome phenotypes in global Ces2 cluster knockout mice. // *Acta Pharmacol Sin*. 2025. V. 46. P. 777–793.

DOI: 10.1038/s41401-024-01407-4

81. Jones R.D., Taylor A.M., Tong E.Y., Repa J.J. Carboxylesterases are uniquely expressed among tissues and regulated by nuclear hormone receptors in the mouse. // *Drug Metab Dispos*. 2013. V. 41. № 1. P. 40-49.

DOI: 10.1124/dmd.112.048397

82. Singh A., Gao M., Beck M.W. Human carboxylesterases and fluorescent probes to image their activity in live cells. // *RSC Med. Chem*. 2021. V. 12. P. 1142-1153.

DOI: 10.1039/D1MD00073J

83. Ribone S.R., Estrin D.A., Quevedo M.A. Exploring human carboxylesterases 1 and 2 selectivity of two families of substrates at an atomistic level. // *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2025. V. 1873. № 4. P. 141069.

DOI: 10.1016/j.bbapap.2025.141069

84. Fleming C.D., Bencharit S., Edwards C.C., Hyatt J.L., Tsurkan L., Bai F., Fraga C., Morton C.L., Howard-Williams E.L., Potter P.M., Redinbo M.R. Structural insights into drug processing by human carboxylesterase 1: tamoxifen, mevastatin, and inhibition by benzil. // *J Mol Biol*. 2005. V. 352. № 1. P. 165-177.



DOI: 10.1016/j.jmb.2005.07.016

85. Gan C., Wang J., Martínez-Chávez A., Hillebrand M., de Vries N., Beukers J., Wagenaar E., Wang Y., Lebre M.C., Rosing H., Klarenbeek S., Ali R.B., Pritchard C., Huijbers I., Beijnen J.H., Schinkel A.H. Carboxylesterase 1 family knockout alters drug disposition and lipid metabolism. // *Acta Pharm Sin B*. 2023. V. 13. № 2. P. 618-631.

DOI: 10.1016/j.apsb.2022.10.017

86. Her L., Zhu H.J. Carboxylesterase 1 and Precision Pharmacotherapy: Pharmacogenetics and Nongenetic Regulators. // *Drug Metab Dispos*. 2020. V. 48. № 3. P. 230-244.

DOI: 10.1124/dmd.119.089680

87. Gan. C. Pharmacological and physiological roles of the carboxylesterase 1 enzyme complex.

DOI: 10.33540/1980

[88. Di L. The Impact of Carboxylesterases in Drug Metabolism and Pharmacokinetics. // *Curr Drug Metab*. 2019. V. 20. № 2. P. 91-102.

DOI: 10.2174/1389200219666180821094502

89. Hyatt J.L., Stacy V., Wadkins R.M., Yoon K.J., Wierdl M., Edwards C.C., Zeller M., Hunter A.D., Danks M.K., Crundwell G., Potter P.M. Inhibition of carboxylesterases by benzil (diphenylethane-1,2-dione) and heterocyclic analogues is dependent upon the aromaticity of the ring and the flexibility of the dione moiety. // *J Med Chem*. 2005.V. 48. № 17. P. 5543-5550.

DOI: 10.1021/jm0504196

90. Zhang J.G, Fariss M.W. Thenoyltrifluoroacetone, a potent inhibitor of carboxylesterase activity. // *Biochem Pharmacol*. 2002. V. 63. № 4. P. 751-754.

DOI: 10.1016/s0006-2952(01)00871-1

91. Zemaitis M.A., Greene F.E. Impairment of hepatic microsomal and plasma esterases of the rat by disulfiram and diethyldithiocarbamate. // *Biochem Pharmacol*. 1976. V. 25. № 4. P. 453-459.

DOI: 10.1016/0006-2952(76)90349-x

92. Nousiainen U., Törrönen R. Differentiation of microsomal and cytosolic carboxylesterases in the rat liver by in vivo and in vitro inhibition. // *Gen Pharmacol*. 1984. V. 15. № 3. P. 223-227.

DOI: 10.1016/0306-3623(84)90163-0

3. Liu Y., Hyde A.S., Simpson M.A., Barycki J.J. Emerging regulatory paradigms in glutathione metabolism. // *Adv Cancer Res*. 2014. V. 122. P. 69-101.

DOI: 10.1016/B978-0-12-420117-0.00002-5

94. Lu S.C. Glutathione synthesis. // *Biochim Biophys Acta*. 2013. V. 1830. № 5. P. 3143-53.

DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.09.008

95. Forman H.J., Zhang H., Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. // *Mol Aspects Med*. 2009. V. 30. № 1-2. P. 1-12.

DOI: 10.1016/j.mam.2008.08.006

96. Yin N., Harris P.W.R., Liu M., Sun J., Chen G., Wen J., Brimble M.A. Enhancing the Oral Bioavailability of Glutathione Using Innovative Analogue Approaches. // *Pharmaceutics*. 2025. V. 17. № 3. P. 385.

DOI: 10.3390/pharmaceutics17030385

97. Josephy P. D. Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology. // *Toxicology in Vitro*. 2010. V. 19. № 6. P. 743-753.

DOI: 10.4061/2010/876940

98. Spielberg S.P. N-acetyltransferases: pharmacogenetics and clinical consequences of polymorphic drug metabolism. // *Journal of Pharmacogenetics*. 1996. V. 7. № 1. P. 61-70.

DOI: 10.1007/BF02353477

99. Spielberg S.P. N-acetyltransferases: pharmacogenetics and clinical consequences of polymorphic drug metabolism. // *Journal of Pharmacogenetics*. 1996. V. 7. № 1. P. 61-70.

DOI: 10.1007/BF02353477

100. Wu G., Fang Y.Z., Yang S., Lupton J.R., Turner N.D. Glutathione metabolism and its implications for health. // *J Nutr*. 2004. V. 134. № 3. P. 489-492.

DOI: 10.1093/jn/134.3.489

101. Anderson M.E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. // *Chem Biol Interact*. 1998. V. 111-112. P. 1-14.

DOI: 10.1016/s0009-2797(97)00146-4

102. Bose Mazumdar A., Chattopadhyay S. Unfolding the Role of Glutathione to Combat Environmental Stresses Through “Omics”-Based Approaches/Studies. // *J Plant Growth Regul*. 2025. V. 44. P. 419–435.

DOI: 10.1007/s00344-024-11476-8

103. Bell C.J.M., Mehta M., Mirza L., Young A.H., Beck K. Glutathione alterations in depression: a meta-analysis and systematic review of proton magnetic resonance spectroscopy studies. // *Psychopharmacology (Berl)*. 2025. V. 242. № 4. P. 717-724.

DOI: 10.1007/s00213-024-06735-1

104. Zhou Y., Harrison D.E., Love-Myers K., Chen Y., Grider A., Wickwire K., Burgess J.R., Stochelski M.A., Pazdro R. Genetic analysis of tissue glutathione concentrations and redox balance. // *Free Radic Biol Med*. 2014. V. 71. P. 157-164.

DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.027

105. Cooper A.J.L., Hanigan M.H. Metabolism of Glutathione S-Conjugates: Multiple Pathways. // *Comprehensive Toxicology*. 2018. P. 363–406.

DOI: 10.1016/B978-0-12-801238-3.01973-5

106. Allocati N., Masulli M., Di Ilio C., Federici L. Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. // *Oncogenesis*. 2018. V. 7. № 1. P. 8.

DOI: 10.1038/s41389-017-0025-3

107. Mazari A.M.A., Zhang L., Ye Z.W., Zhang J., Tew K.D., Townsend D.M. The Multifaceted Role of Glutathione S-Transferases in Health and Disease. // *Biomolecules*. 2023. V. 13. № 4. P. 688.

DOI: 10.3390/biom13040688

108. Alope C., Onisuru O.O., Achilonu I. Glutathione S-transferase: A versatile and dynamic enzyme. // *Biochem Biophys Res Commun*. 2024. V. 734. P. 150774.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2024.150774

109. Sheehan D., Meade G., Foley V.M., Dowd C.A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. // *Biochem J*. 2001. V. 360 (Pt 1). P. 1-16.

DOI: 10.1042/0264-6021:3600001

110. Atkinson H.J., Babbitt P.C. Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold. // *Biochemistry*. 2009. V. 48. № 46. P. 11108-11116.

DOI: 10.1021/bi901180v

111. Kuang Q., Purhonen P., Ålander J. et al. Dead-end complex, lipid interactions and catalytic mechanism of microsomal glutathione transferase 1, an electron crystallography and mutagenesis investigation. // *Sci Rep*. 2017. V. 7. P. 7897.

DOI: 10.1038/s41598-017-07912-3

112. Spahiu L., Ålander J., Ottosson-Wadlund A., Svensson R., Lehmer C., Armstrong R.N., Morgenstern R. Global Kinetic Mechanism of Microsomal Glutathione Transferase 1 and Insights into Dynamic Enzyme Activation. // *Biochemistry*. 2017. V. 56. № 24. P. 3089-3098.

DOI: 10.1021/acs.biochem.7b00285

113. Wu L., Wu Z., Zhao F., Hahn M., Zhou M., Hou Y. Activity and cell toxicology of fluazinam on *Fusarium graminearum*. // *Pestic Biochem Physiol*. 2022. V. 188. P. 105253.

DOI: 10.1016/j.pestbp.2022.105253

114. Shang Y., Wang Y., Deng J., Liu X., Fang Y., Rao Q., Wu H. Comparative Transcriptome Analysis Reveals the Mechanism Related to Fluazinam Stress of *Panonychus citri* (Acarina: Tetranychidae). // *Insects*. 2020. V. 11. № 11. P. 730.

DOI: 10.3390/insects11110730

115. Jeon Y., Kim J., Lee S., Kim T.H. Fluazinam. // *Acta Crystallogr Sect E Struct Rep Online*. 2013. V. 69 (Pt 9). P. 1467.

DOI: 10.1107/S1600536813023210

116. Saifullah S., Margus A., Kankare M., Lindström L. Repeated exposure of fluazinam fungicides affects gene expression profiles yet carries no costs on a nontarget pest. // *Insect Sci.* 2022. V. 29. № 5. P. 1373-1386.

DOI: 10.1111/1744-7917.13013

117. Guo Z., Miyoshi H., Komyoji T., Haga T., Fujita T. Uncoupling activity of a newly developed fungicide, fluazinam [3-chloro-N-(3-chloro-2,6-dinitro-4-trifluoromethylphenyl)-5-trifluoromethyl-2-pyridinamine.. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1991. V. 1056. P. 89-92.

DOI: 10.1016/S0005-2728(05)80077-5

118. Kolanczyk R.C., Serrano J.A., Tapper M.A., Schmieder P.K. A comparison of fish pesticide metabolic pathways with those of the rat and goat. // *Regul Toxicol Pharmacol.* 2018. V. 94. P. 124-143.

DOI: 10.1016/j.yrtph.2018.01.019

119. Gomes D.S., Miranda F.R., Fernandes K.M., Farder-Gomes C.F., Bastos D.S.S., Bernardes R.C., Serrão J.E. Acute exposure to fungicide fluazinam induces cell death in the midgut, oxidative stress and alters behavior of the stingless bee *Partamona helleri* (Hymenoptera: Apidae). // *Ecotoxicol Environ Saf.* 2024. V. 282. P. 116677.

DOI: 10.1016/j.ecoenv.2024.116677

120. Iwaniuk P., Borusiewicz A., Lozowicka B. Fluazinam and its mixtures induce diversified changes of crucial biochemical and antioxidant profile in leafy vegetable. // *Scientia Horticulturae.* 2022. V. 298. P. 110988

DOI: 10.1016/j.scienta.2022.110988

121. Lee J.E., Kang J.S., Ki Y.W., Park J.H., Shin I.C., Koh H.C. Fluazinam targets mitochondrial complex I to induce reactive oxygen species-dependent cytotoxicity in SH-SY5Y cells. // *Neurochem Int.* 2012. V. 60. № 8. P. 773-781.

DOI: 10.1016/j.neuint.2012.03.007

122. Strunecka A., Strunecky O. Mechanisms of Fluoride Toxicity: From Enzymes to Underlying Integrative Networks. // *Appl. Sci.* 2020. V. 10. № 20. P. 7100.

DOI: 10.3390/app10207100

123. Strunecka A., Strunecky O. Mechanisms of Fluoride Toxicity: From Enzymes to Underlying Integrative Networks. // *Appl. Sci.* 2020. V. 10. № 20. P. 7100.

DOI: 10.3390/app10207100

124. Büchel K. H., Schäfer G. 2-Anilinothiophene als Entkoppler der oxydativen Phosphorylierung in Mitochondrien. // *Z. Naturforsch.* 1970. V. 25b. S. 1465—1474

DOI: 10.1515/znb-1970-1232

125. Shinde N.D., Patil L.S., Pawar O.B. A novel, highly efficient azeotropic method of esterification of p-hydroxybenzoic acid. // *Organic Chemistry: an Indian Journal (OCAIJ)*. 2011. V. 7. № 3. P. 165-167.

126. Tyagi Y., Tyagi S., Raj H., Gupta R. Synthesis of novel 4-methylcoumarins and comparative specificities of substituted derivatives for Acetoxy Drug: Protein Transacetylase. // *Scientia Pharmaceutica*. 2008. V. 76. № 3. P. 395-414.

DOI: 10.3797/scipharm.0805-08

127. Cheng W., Xie Y., Yang Z., Sun Y., Zhang M.Z., Ding Y., Zhang W. General Strategy for in Situ Generation of a Coumarin-Cu<sup>2+</sup> Complex for Fluorescent Water Sensing. // *Anal Chem*. 2019. V. 91. № 9. P. 5817-5823.

DOI: 10.1021/acs.analchem.9b00132

128. Johnson D., Lardy H. Isolation of liver or kidney mitochondria. // *Methods in Enzymology*. 1967. V. 10. P. 94-96

DOI: 10.1016/0076-6879(67)10018-9

129. Sundberg L., Porath J. Attachment of group-containing ligands to insoluble polymers by means of bifunctional oxiranes. // *Journal of Chromatography*. 1974. V. 90. P. 87-98.

DOI: 10.1016/s0021-9673(01)94777-6

130. Poole R.C., Halestrap A.P. Purification of aldehyde dehydrogenase from rat liver mitochondria by  $\alpha$ -cyanocinnamate affinity chromatography. // *Biochem. J.* 1989, V. 259. P. 105-110.

DOI: 10.1042/bj2590105

131. Horgan D.J., Stoops J.K., Webb E.C., Zerner B. Carboxylesterases (EC 3.1.1). A large-scale purification of pig liver carboxylesterase. // *Biochemistry*. 1969. V. 8. № 5. P. 2000-2006.

DOI: 10.1021/bi00833a033. PMID: 5785220.

132. Nowak P.M., Sagan F., Mitoraj M.P. Origin of Remarkably Different Acidity of Hydroxycoumarins – Joint Experimental and Theoretical Studies. // *J. Phys. Chem. B*. 2017. Vol. 121. № 17. P. 4554–4561.

DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b01849

133. Nowak P.M., Sagan F., Mitoraj M.P. Origin of Remarkably Different Acidity of Hydroxycoumarins – Joint Experimental and Theoretical Studies. // *J. Phys. Chem. B*. 2017. Vol. 121. № 17. P. 4554–4561.

DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b01849

134. Brahmachari G. Room Temperature One-Pot Green Synthesis of Coumarin-3-Carboxylic Acids in Water: A Practical Method for the Large-Scale Synthesis. // *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2015. Vol. 3. № 9. P. 2350–2358.

DOI: 10.1021/acssuschemeng.5b00826

135. Lee J.C., Oh Y.S., Cho S.H, Lee J.D. Efficient in Situ Esterification of Carboxylic Acids Using Cesium Carbonate, Organic Preparations and Procedures International. // The New Journal for Organic Synthesis 1996. V. 28 № 4. P. 480-483.

DOI: 10.1080/00304949609356558

136. Pawar O.B. A Novel, Highly Efficient Azeotropic Method of Esterification of P-Hydroxybenzoic Acid. // OCAIJ. 2011. V. 7. № 3.

137. Синтез сложных эфиров: метод. указания // сост. В. В. Чапуркин. ВолгГТУ, Волгоград, 2012.

138. Srinivasa H.T., Harishkumar H.N., Palakshamurthy B.S. New Coumarin Carboxylates Having Trifluoromethyl, Diethylamino and Morpholino Terminal Groups: Synthesis and Mesomorphic Characterisations. // Journal of Molecular Structure. 2017. V. 1131. P. 97-102

DOI: 10.1016/j.molstruc.2016.11.047

139. Corrêa A.G., et al. Preparation and Evaluation of a Coumarin Library Towards the Inhibitory Activity of the Enzyme gGAPDH from Trypanosoma cruzi. // J. Braz. Chem. Soc. 2005. V. 16. № 4. P. 763-773

DOI: 10.1590/S0103-50532005000500014

140. Burris G.H., Lawn F., Schulman H. L. Preparation of Alkyl Esters of Para-Hydroxybenzoic Acid. Pat. US3321509A USA. 1964

141. Hassner A., Alexanian V. Direct Room Temperature Esterification of Carboxylic Acids. // Tetrahedron Letters. 1978. Vol. 19 № 46. P. 4475 – 44780

DOI: 10.1016/S0040-4039(01)95256-6

142. Kosiova I., Janicova A., Kois P. Synthesis of Coumarin or Ferrocene Labeled Nucleosides via Staudinger Ligation. // Beilstein Journal of Organic Chemistry. 2006. Vol. 2, № 23.

DOI: 10.1186/1860-5397-2-23

143. Singh A., Chen K., Adelstein S.J., Kassis A.I. Synthesis of Coumarin–Polyamine-Based Molecular Probe for the Detection of Hydroxyl Radicals Generated by Gamma Radiation. // Radiation Research. 2007. V. 168. № 2. P. 233-242

DOI: 10.1667/RR0948.1

144. Гривенникова В. Г., Виноградов А. Д. Генерация активных форм кислорода митохондриями. // Успехи биологической химии. 2013. Т. 53. С. 245–296

145. Schönfeld P., Wieckowski M.R., Wojtczak L. Long-chain fatty acid-promoted swelling of mitochondria: further evidence for the protonophoric effect of fatty acids in the inner mitochondrial membrane. // FEBS Letters. 2000. V. 471. P. 108-112.

DOI: 10.1016/s0014-5793(00)01376-4

146. Mueller P., Rudin D.O., Tien H., Wescott W.C. Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution. // *J. Phys. Chem.* 1963. V. 67. № 2. P. 534–535.

DOI: 10.1021/j100796a529

147. 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.

DOI: 10.1016/j.bioelechem.2022.108081

148. 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. // *Arch Biochem Biophys*. 2022. V. 728. P. 109366.

DOI: 10.1016/j.abb.2022.109366

149. 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. // *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2024. V. 1865. № 4. P. 149506.

DOI: 10.1016/j.bbabbio.2024.149506

150. Grivennikova V.G., Gladyshev G.V., Vinogradov A.D. Deactivation of mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (respiratory complex I): Extrinsically affecting factors. // *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2020. V. 1861. № 8. P. 148207.

DOI: 10.1016/j.bbabbio.2020.148207

151. Idriss Tchoffo Tchoupou, et al. An overview of the synthesis of coumarins via Knoevenagel condensation and their biological properties. // *Results in Chemistry*. V. 15. P. 102181.

DOI: 10.1016/j.rechem.2025.102181

152. Pechmann H. V., Erdmann Gräger. Über Oxycumarincarbonsäuren. (Studien über Cumarine, VI. Mittheilung. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft // *Chemische Berichte*. 1901. V. 34. I. 1. P. 378-386.

DOI: 10.1002/cber.19010340158

153. L. Pisani et al. Discovery, Biological Evaluation, and Structure–Activity and –Selectivity Relationships of 6'-Substituted (E)-2-(Benzofuran-3(2H)-ylidene)-N-methylacetamides, a Novel Class of Potent and Selective Monoamine Oxidase Inhibitors. // *J. Med. Chem.* 2013. V. 56. № 6. P. 2651–2664.

DOI: 10.1021/jm4000769

154. Hatfield M.J., Chen J., Fratt E.M., Chi L., Bollinger J.C., Binder R.J., Bowling J., Hyatt J.L., Scarborough J., Jeffries C., Potter P.M. Selective Inhibitors of Human Liver Carboxylesterase Based on a  $\beta$ -Lapachone Scaffold: Novel Reagents for Reaction Profiling. // J Med Chem. 2017. V. 60. № 4. P. 1568-1579.

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b01849

155. 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. // Arch Biochem Biophys. 2023. V. 746. P. 109735.

DOI: 10.1016/j.abb.2023.109735

156. 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 J. 2024. V. 291. № 24. P. 5523-5539.

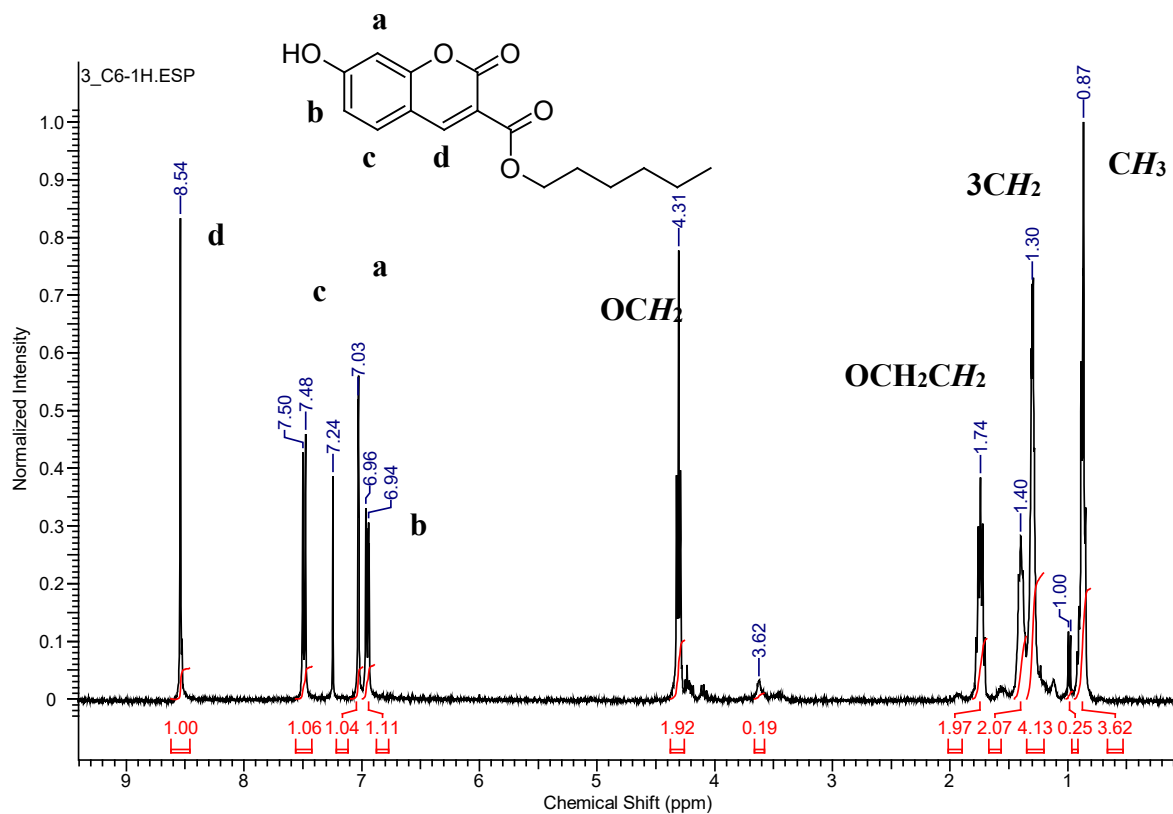
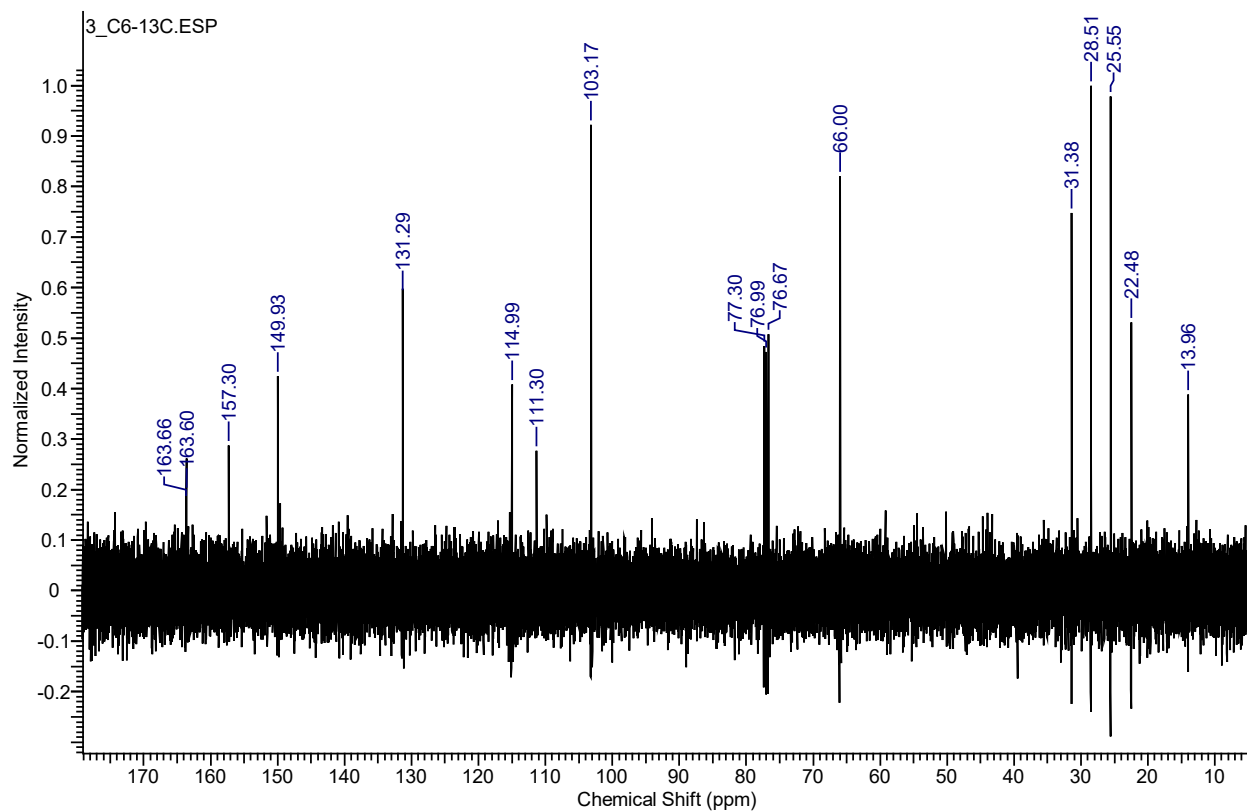
DOI: 10.1111/febs.17329



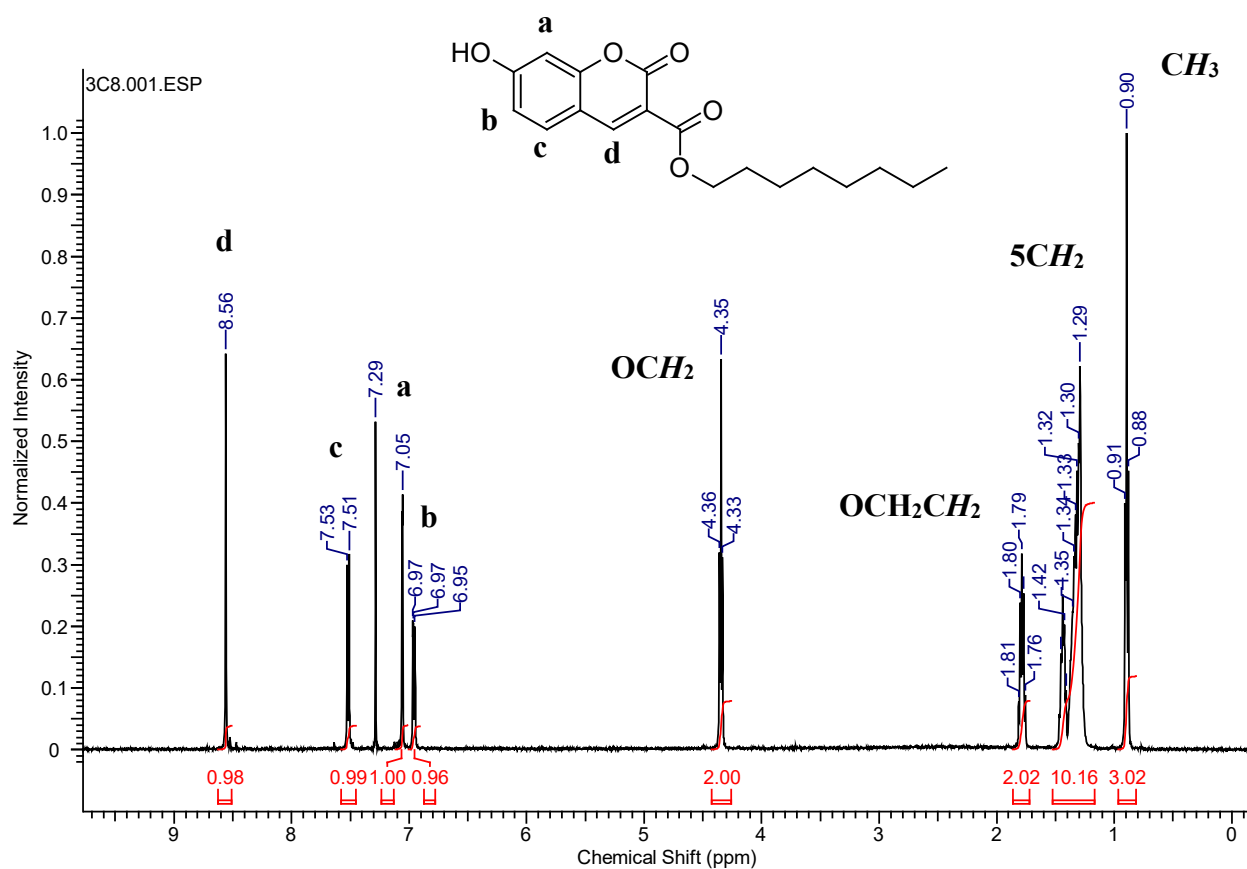
Таблица значений Rf

соединение	Rf	
	гексан:ЭА=1:2	гексан:ЭА=1:1
UB3-Acid	0	
UB3-C6	0.76	
UB3-C8	0.8	
UB3-C10	0.82	
UB3-C12	0.85	
UB4-Acid	0	
UB4-C6	0.64	
UB4-C8	0.69	
UB4-C10	0.76	
UB4-C12	0.8	
UB4-N-C10	0.71	
UB-3-L		0.57
UB-3-M		0.57
UB-3-2-C8		0.55
UB*-4-C4		0.64
UB*-4-C8		0.74
UB*-4-C10		0.77
UB*-4-C12		0.79
UB-6-C8		0.63
UB-6-COOC8		0.79
UB-6-COOC4		0.73
UB-3-C8-NO2		0.74

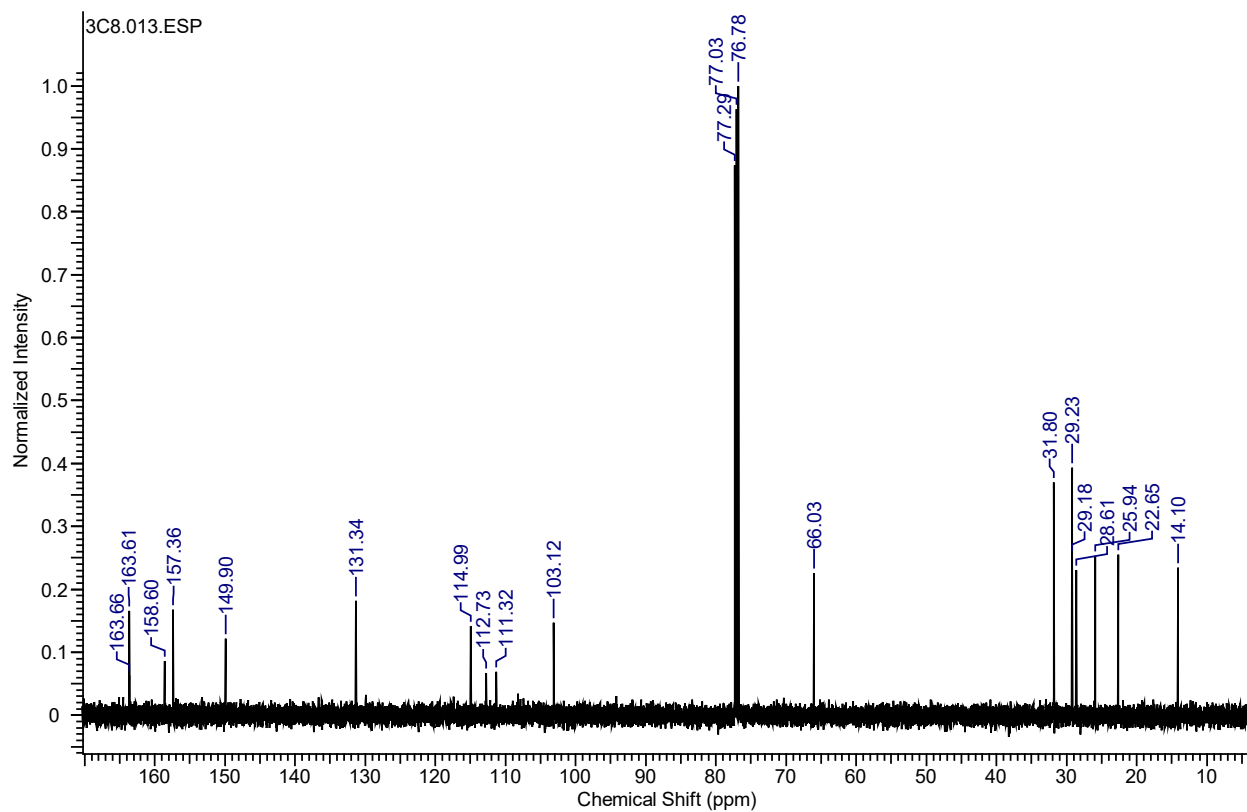
## ЯМР спектры синтезированных соединений

<sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) гексилового эфира 7-гидроxicумарин-3-карбоновой кислоты (UB3-C6)<sup>13</sup>C ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) гексилового эфира 7-гидроxicумарин-3-карбоновой кислоты (UB3-C6)

159

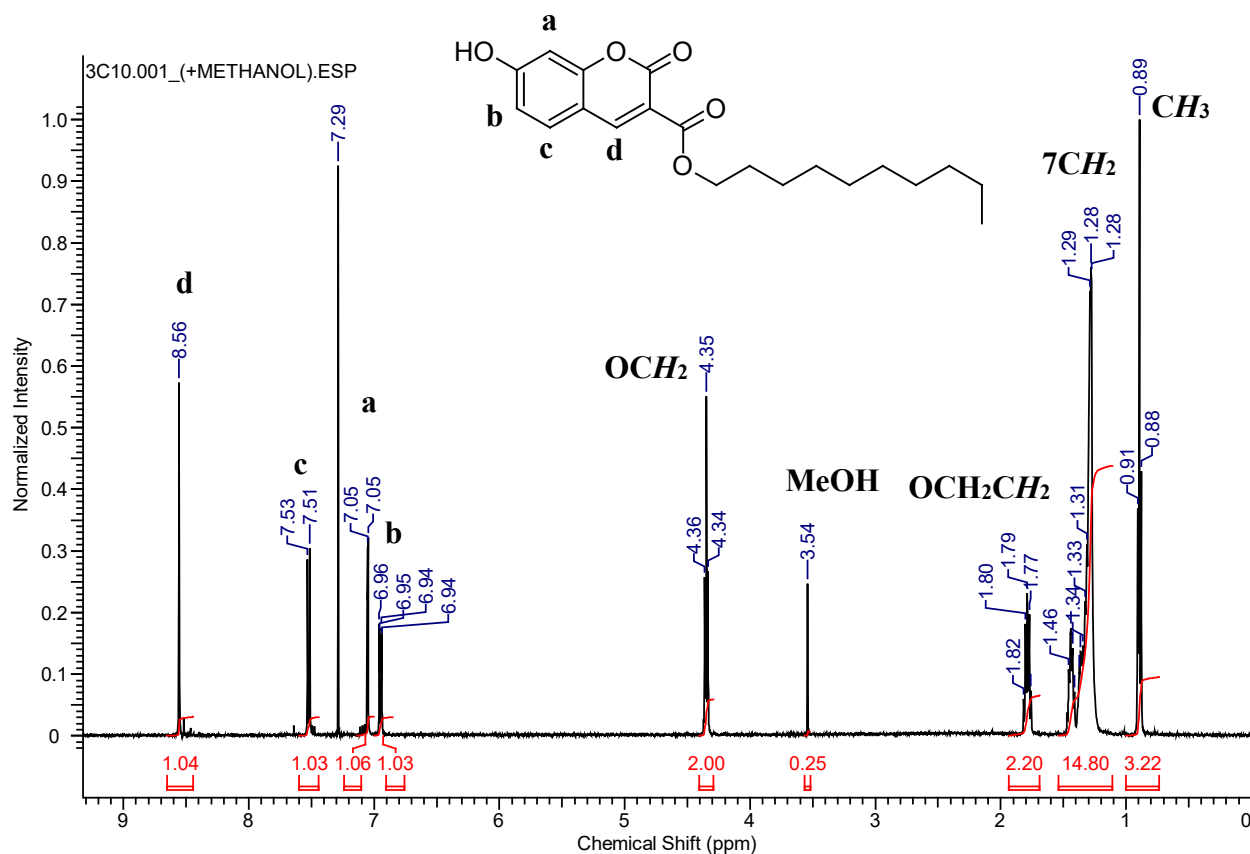


<sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) октилового эфира 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты (UB3-C8)

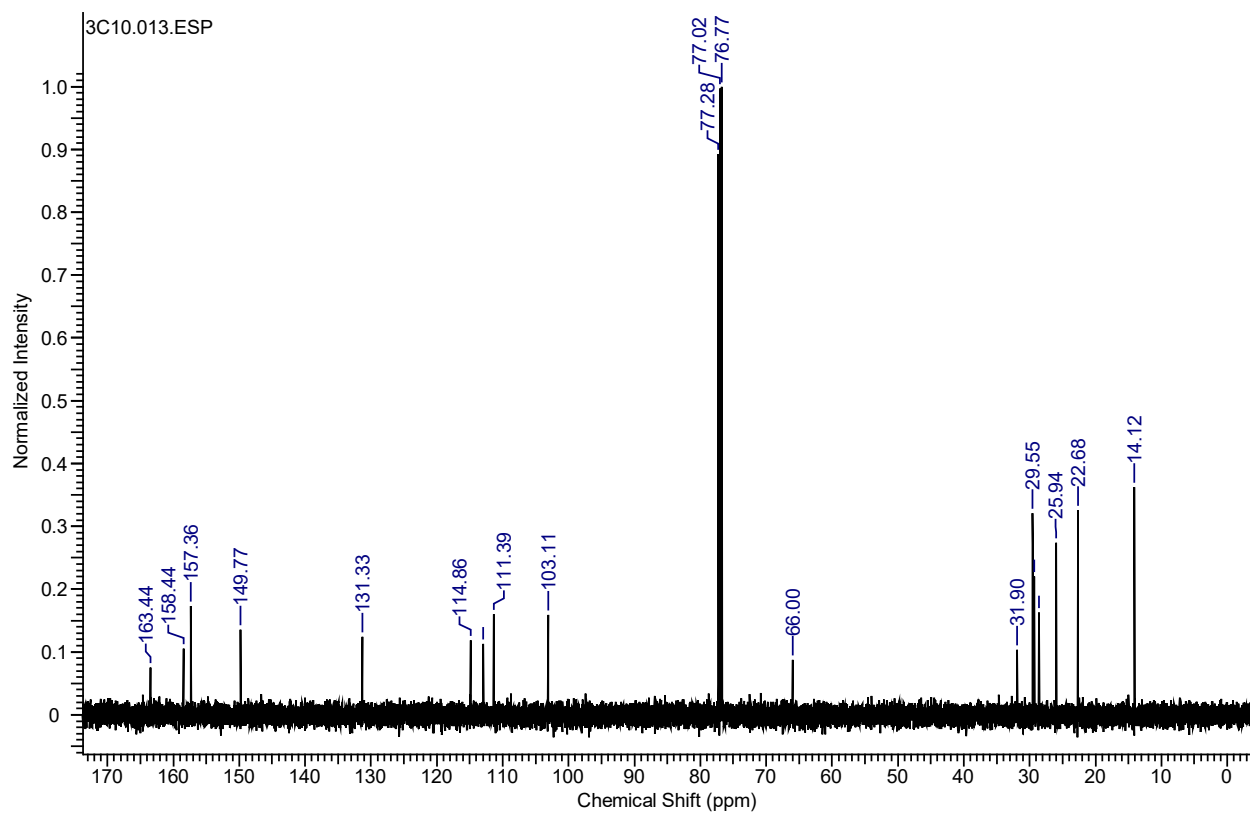


<sup>13</sup>C ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) октилового эфира 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты (UB3-C8)

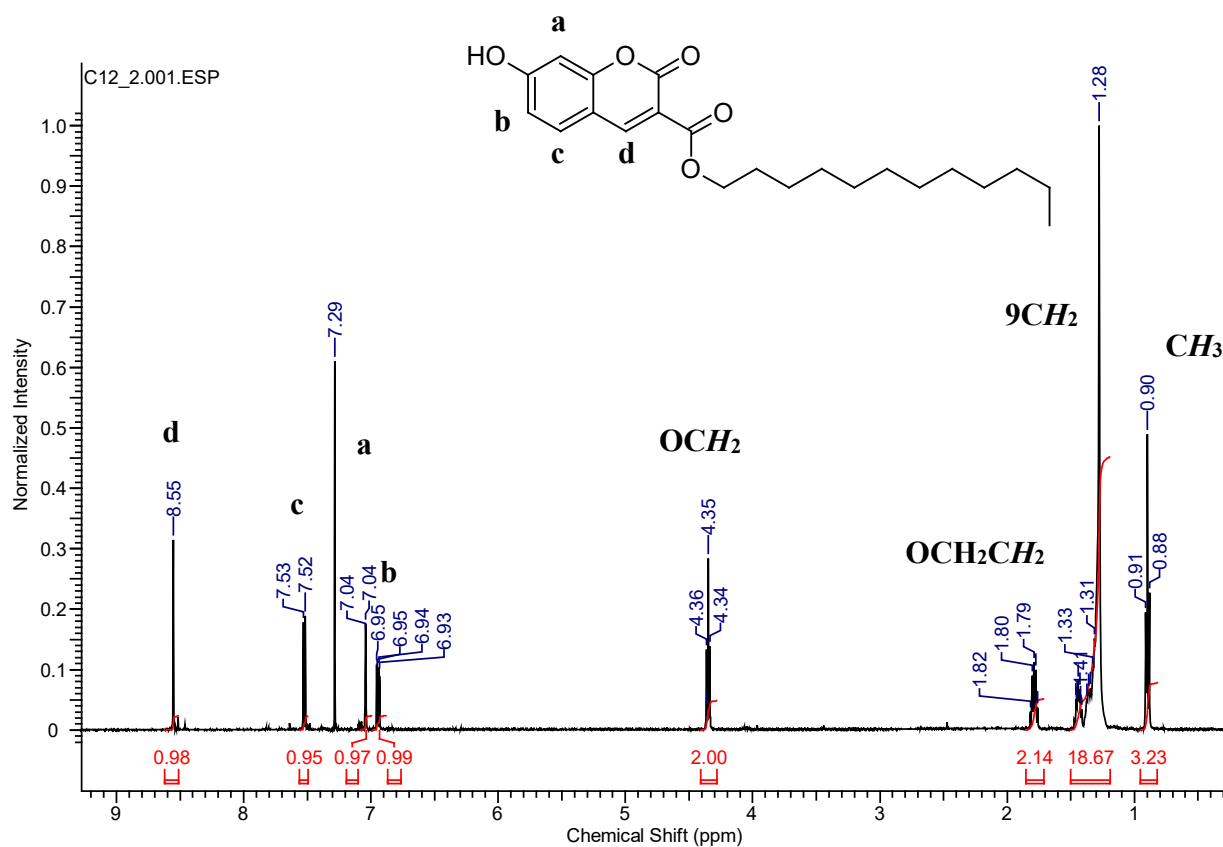
160



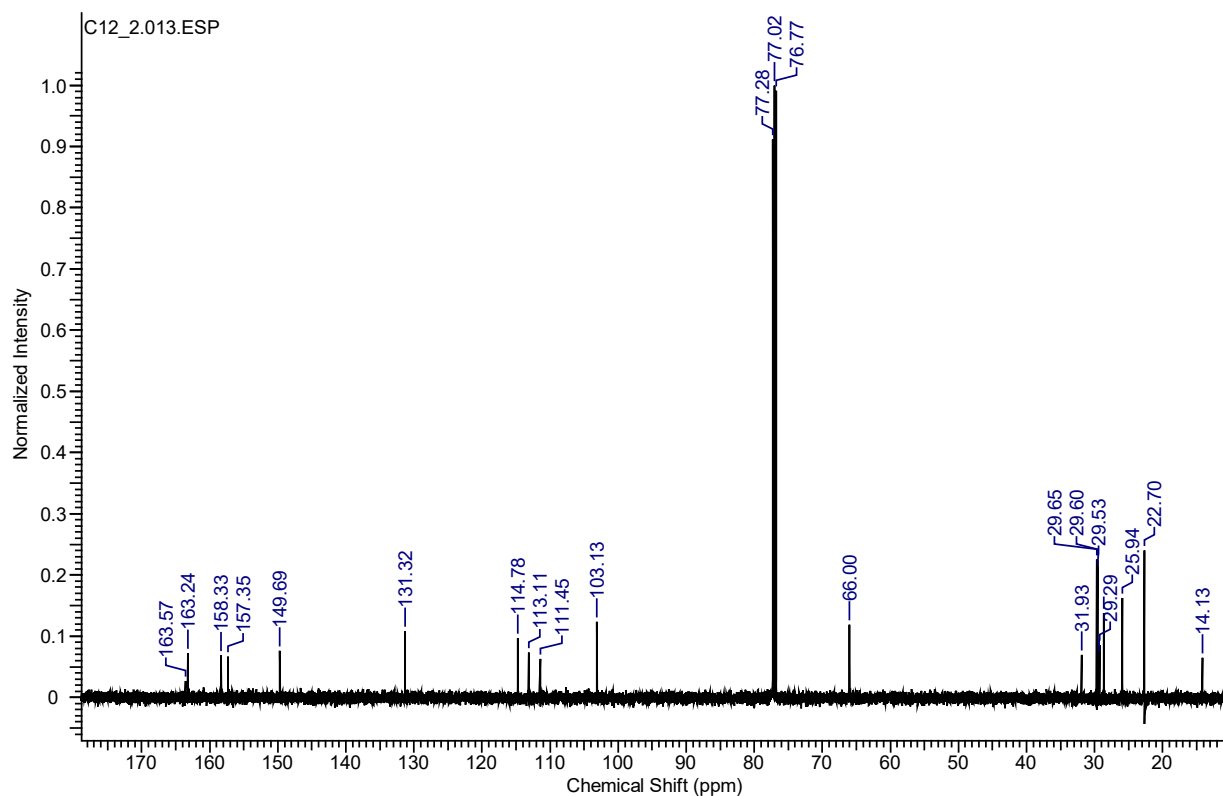
**<sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>)** децилового эфира 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты (UB3-C10)



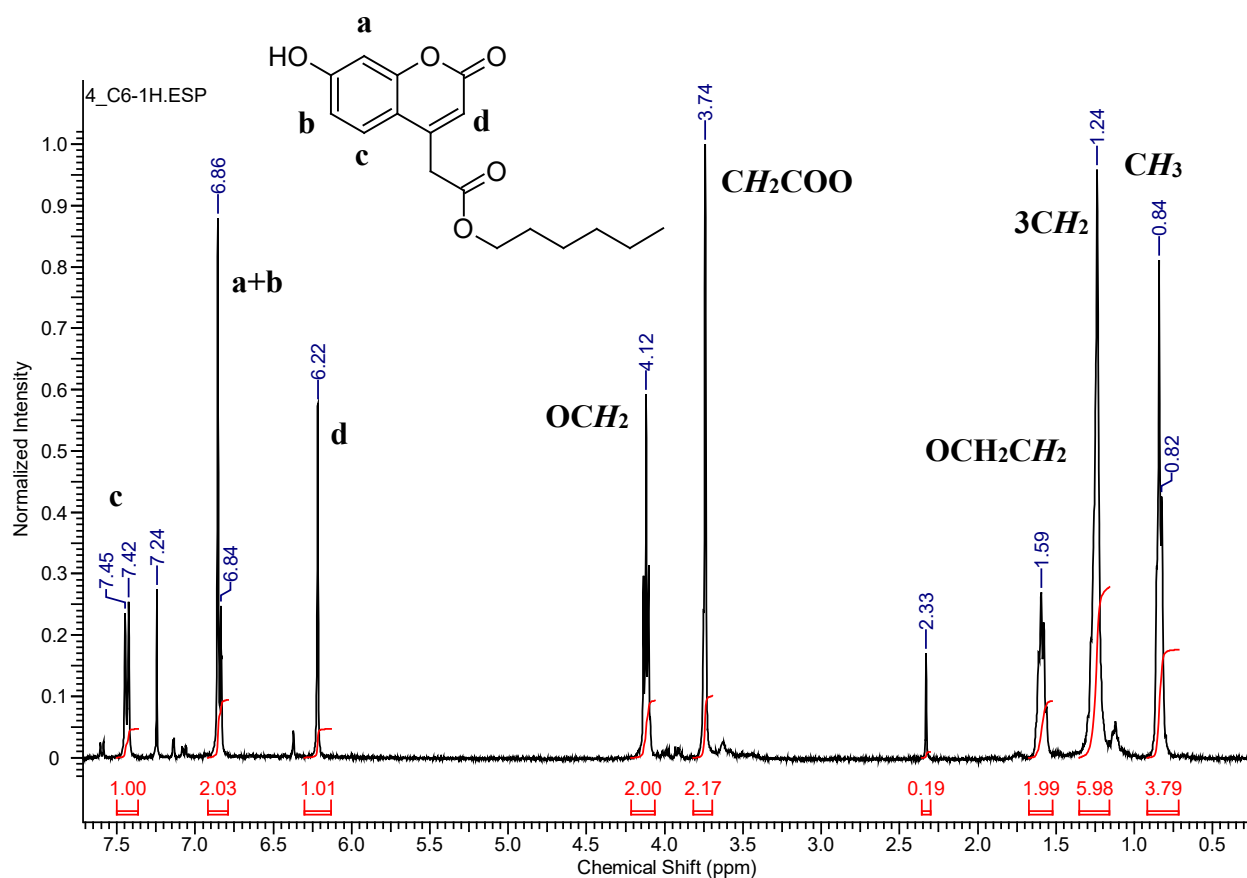
**<sup>13</sup>C ЯМР (CDCl<sub>3</sub>)** децилового эфира 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты (UB3-C10)



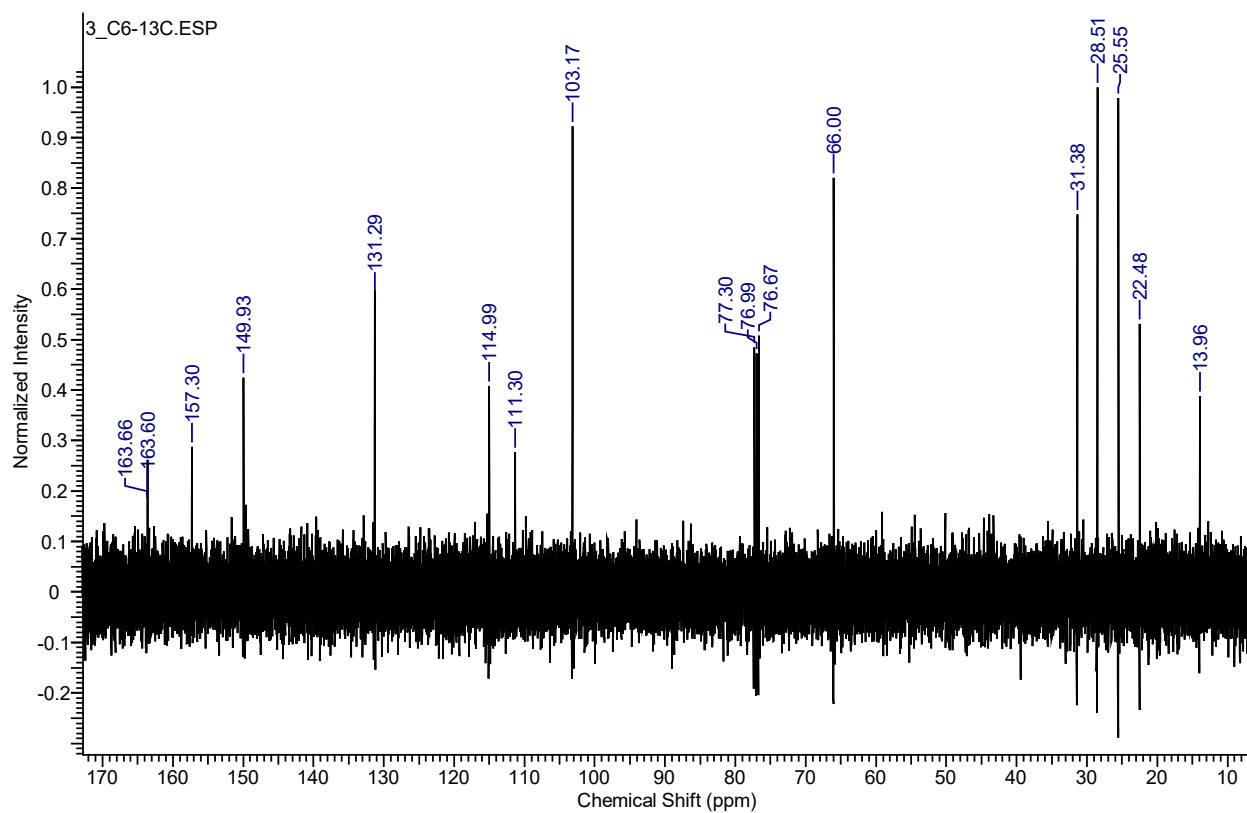
$^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ) додецилового эфира 7-гидроxicумарин-3-карбоновой кислоты (UB3-C12)



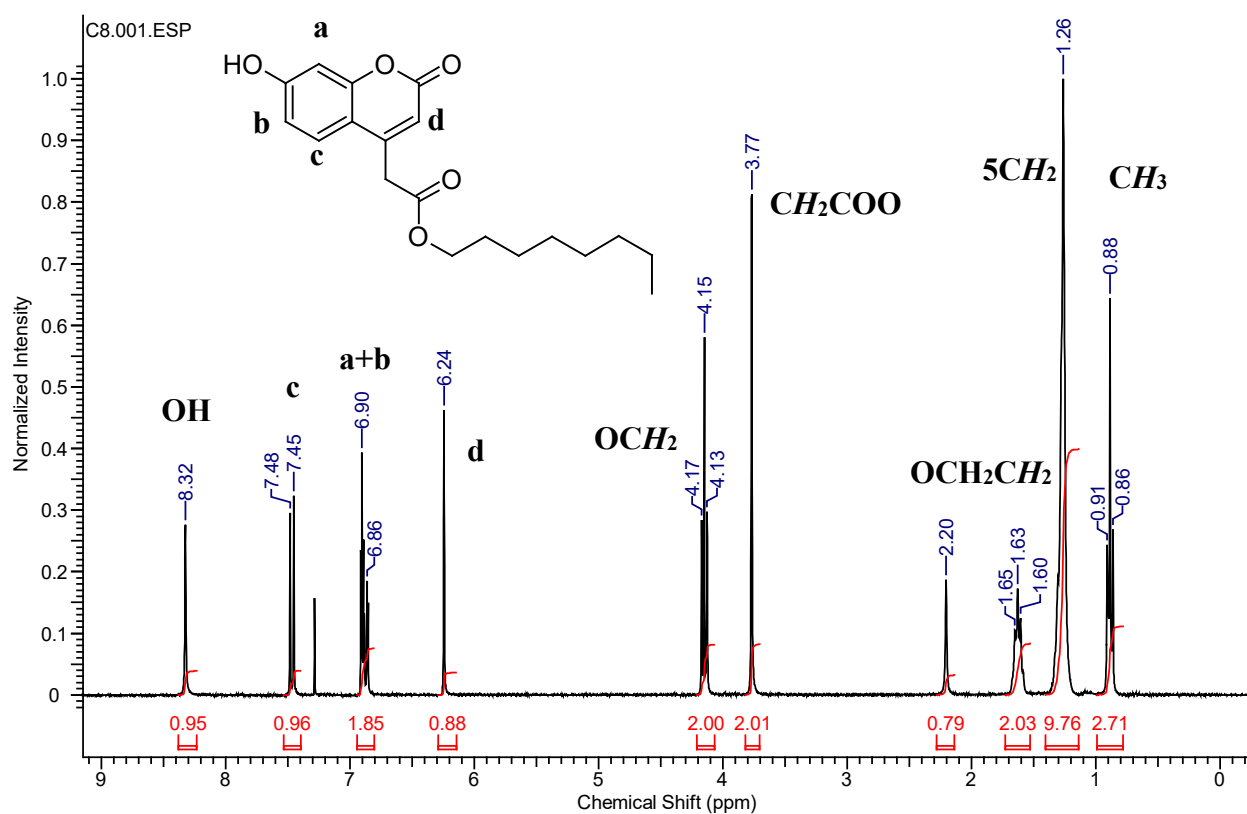
$^{13}\text{C}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ) додецилового эфира 7-гидроxicумарин-3-карбоновой кислоты (UB3-C12)



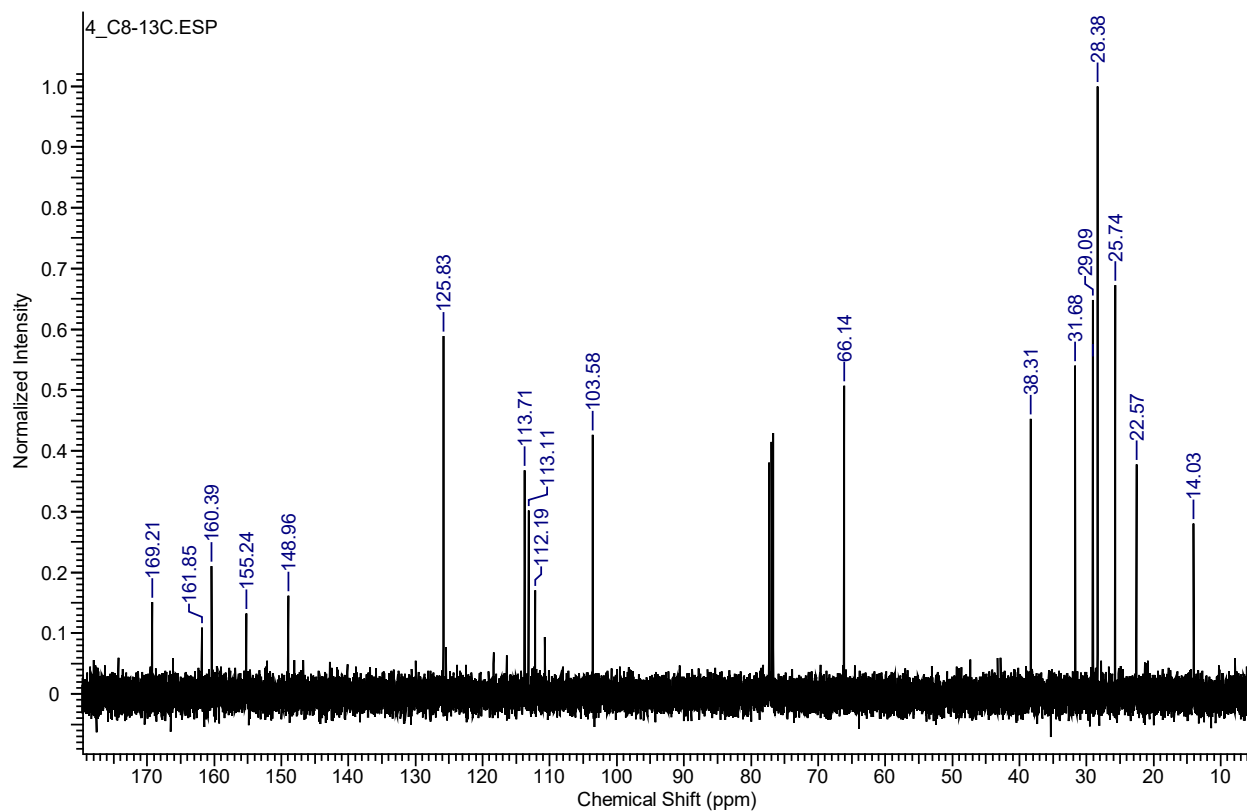
<sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) гексилового эфира 7-гидроксикумарин-4-уксусной кислоты (UB4-C6)



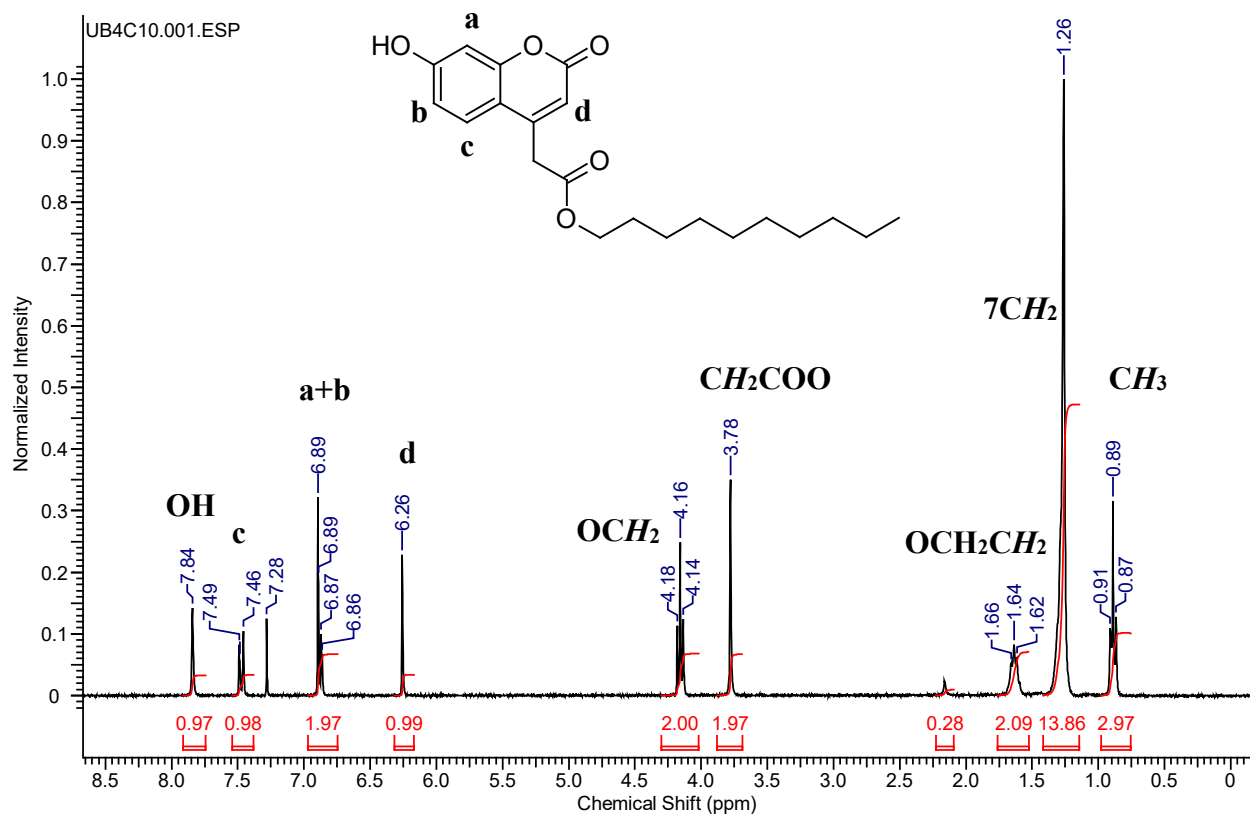
<sup>13</sup>C ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) гексилового эфира 7-гидроксикумарин-4-уксусной кислоты (UB4-C6)



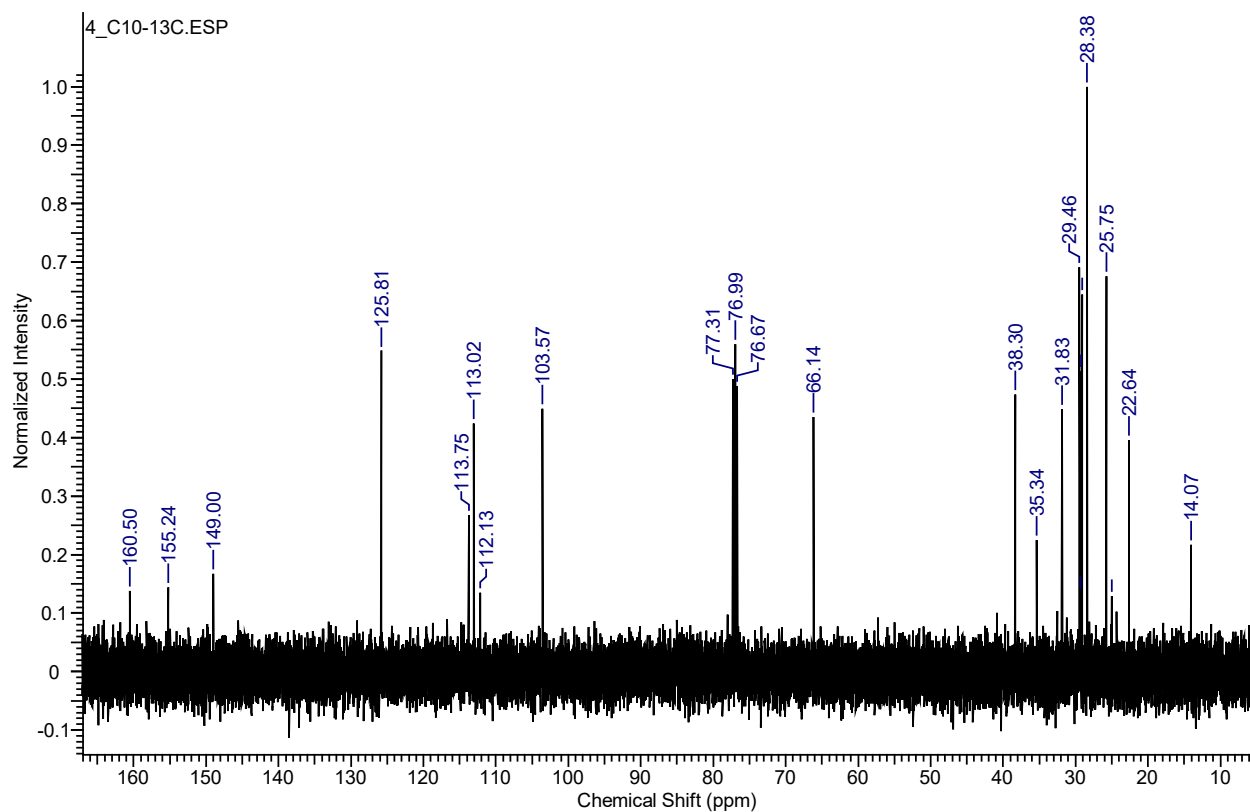
<sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) октилового эфира 7-гидроксикумарин-4-уксусной кислоты (UB4-C8)



<sup>13</sup>C ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) октилового эфира 7-гидроксикумарин-4-уксусной кислоты (UB4-C8)

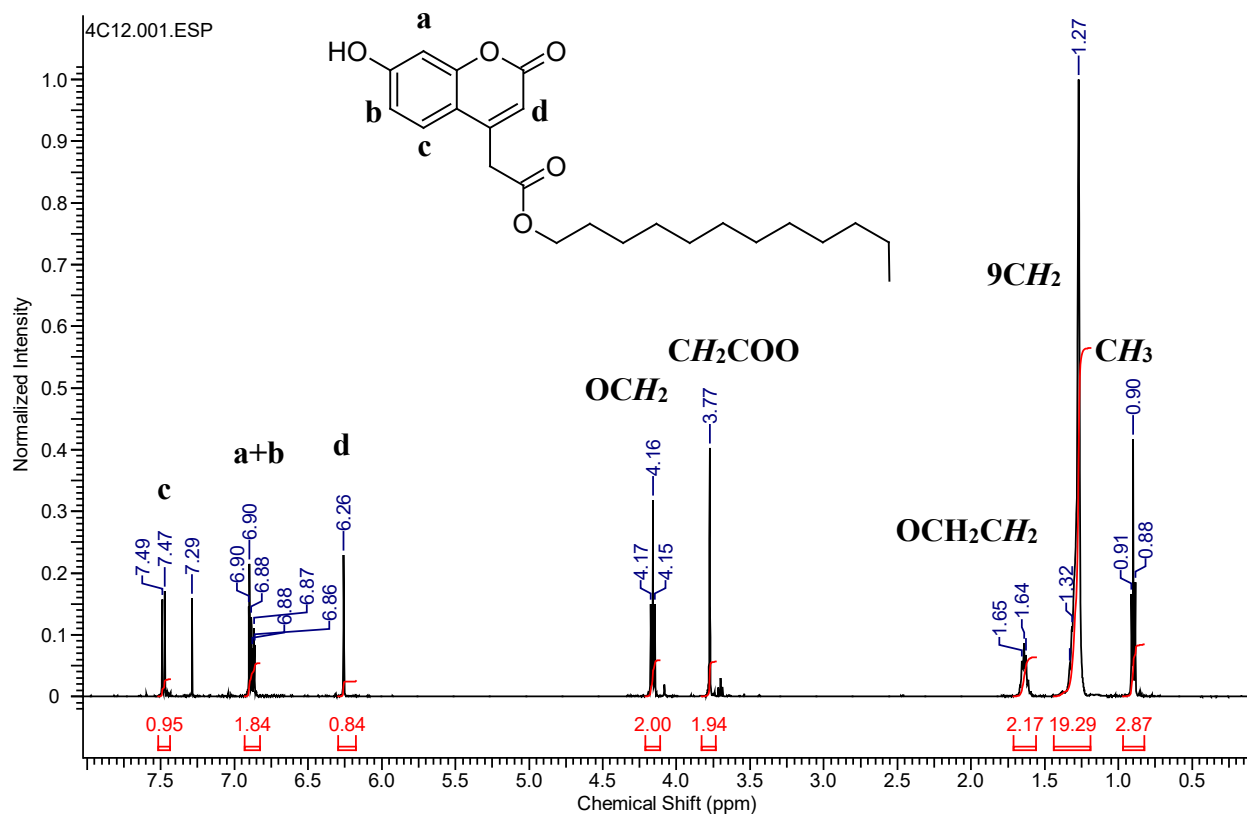


$^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ) децилового эфира 7-гидроxicумарин-4-уксусной кислоты (UB4-C10)

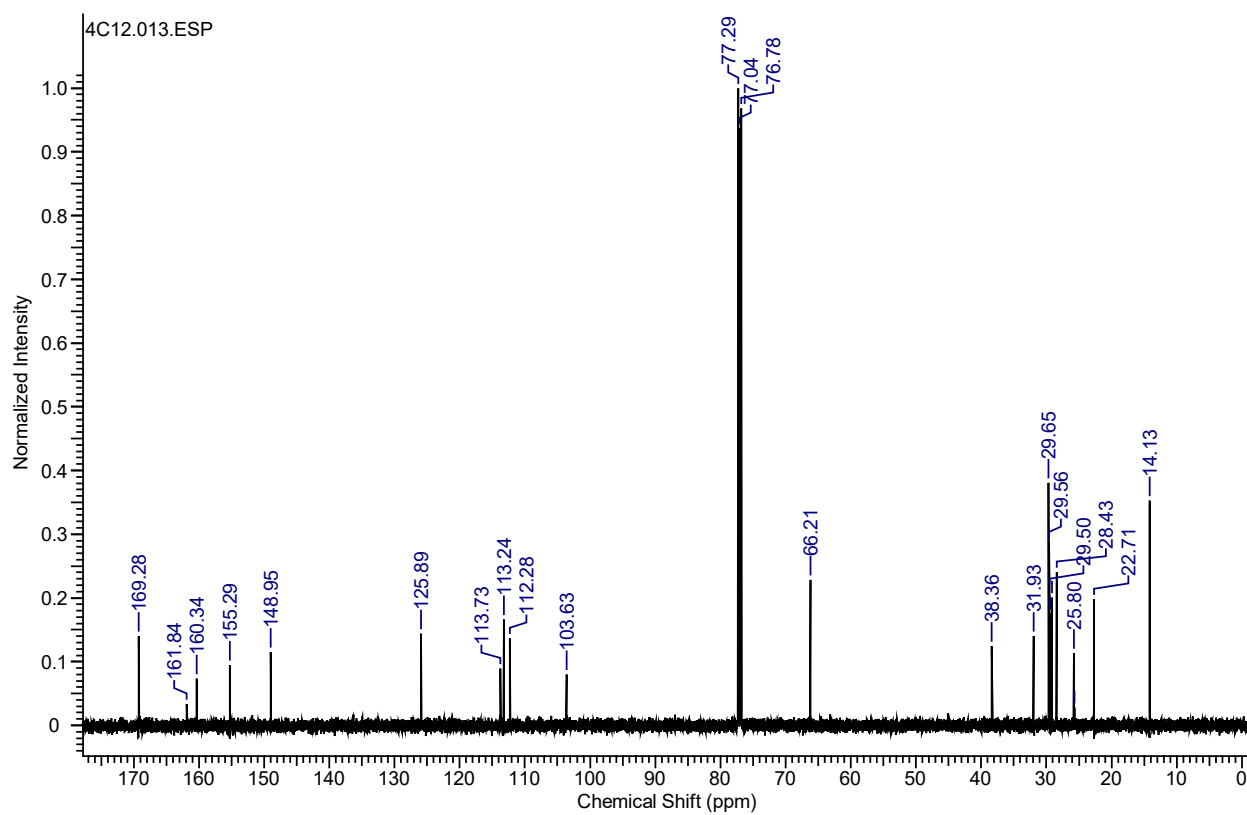


$^{13}\text{C}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ) децилового эфира 7-гидроxicумарин-4-уксусной кислоты (UB4-C10)

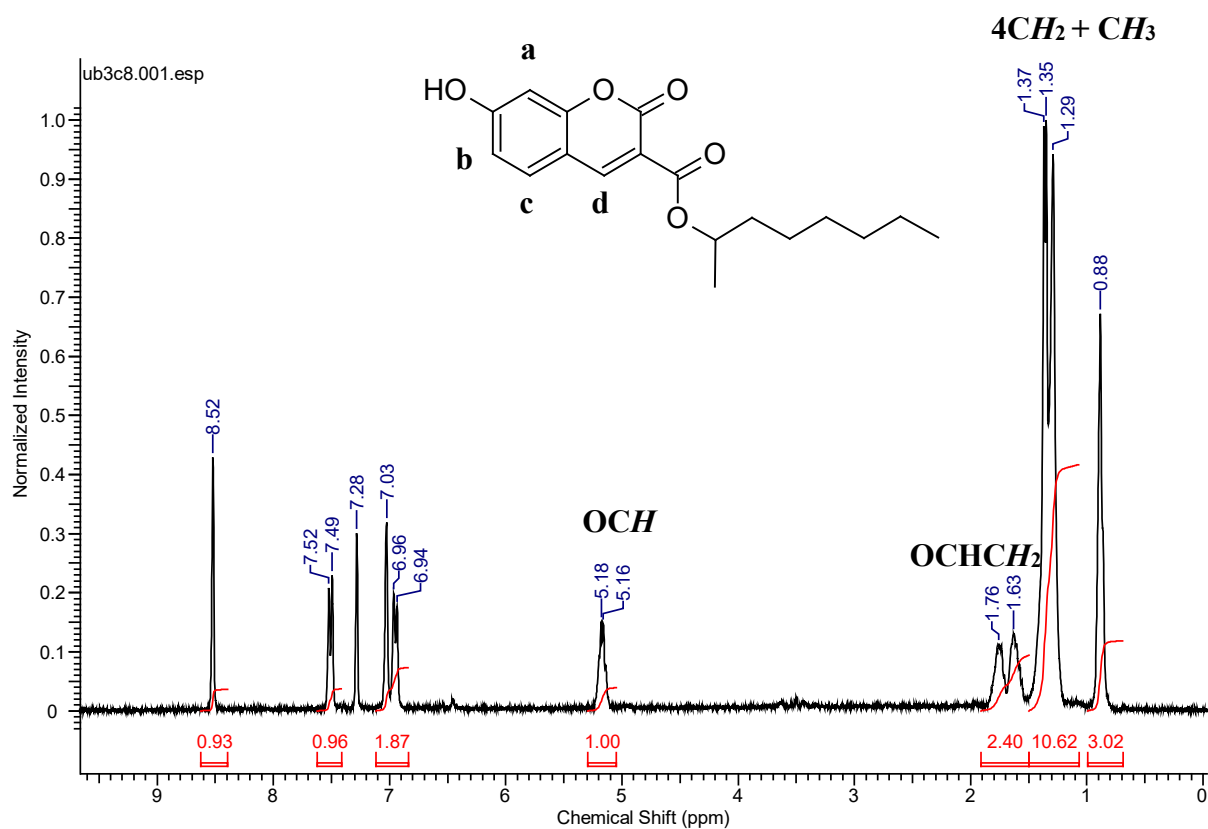




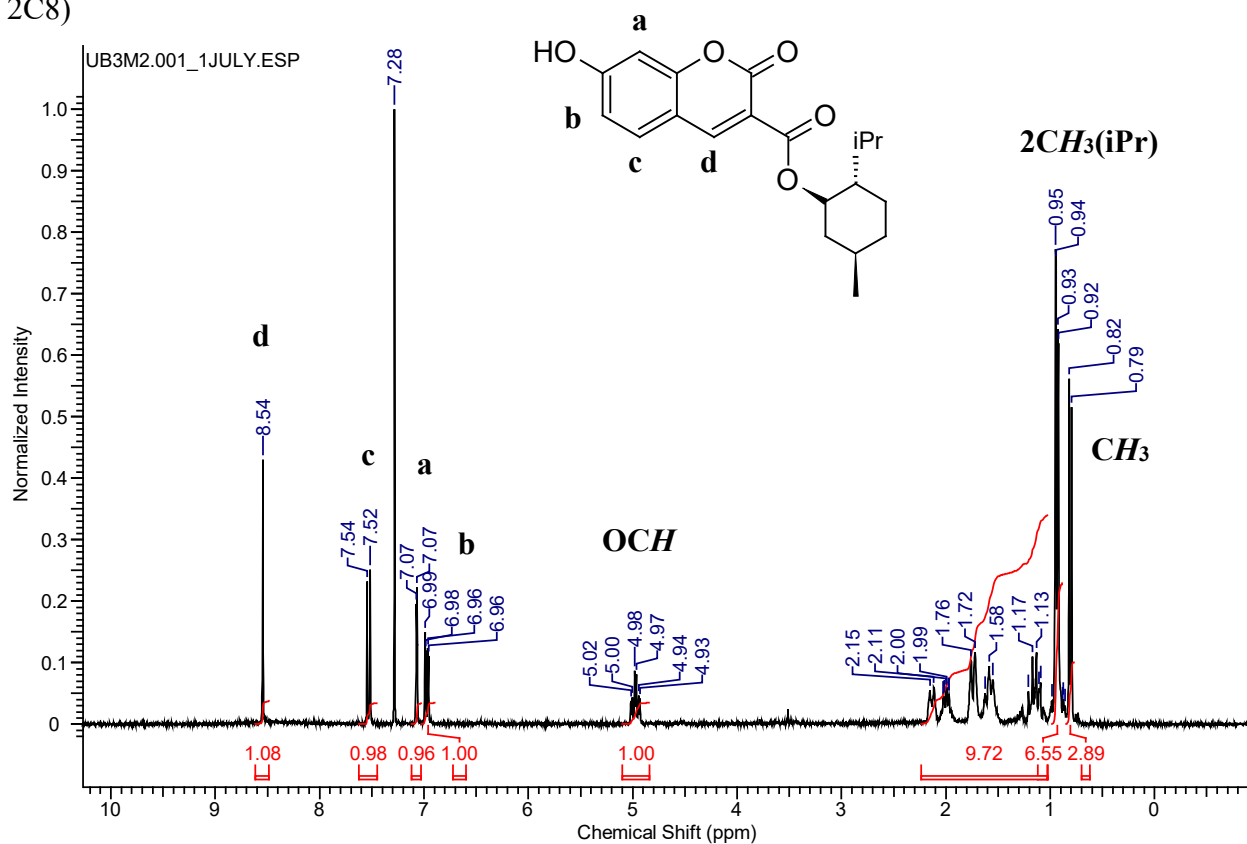
<sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) додецилового эфира 7-гидроxicумарин-4-уксусной кислоты (UB4-C12)



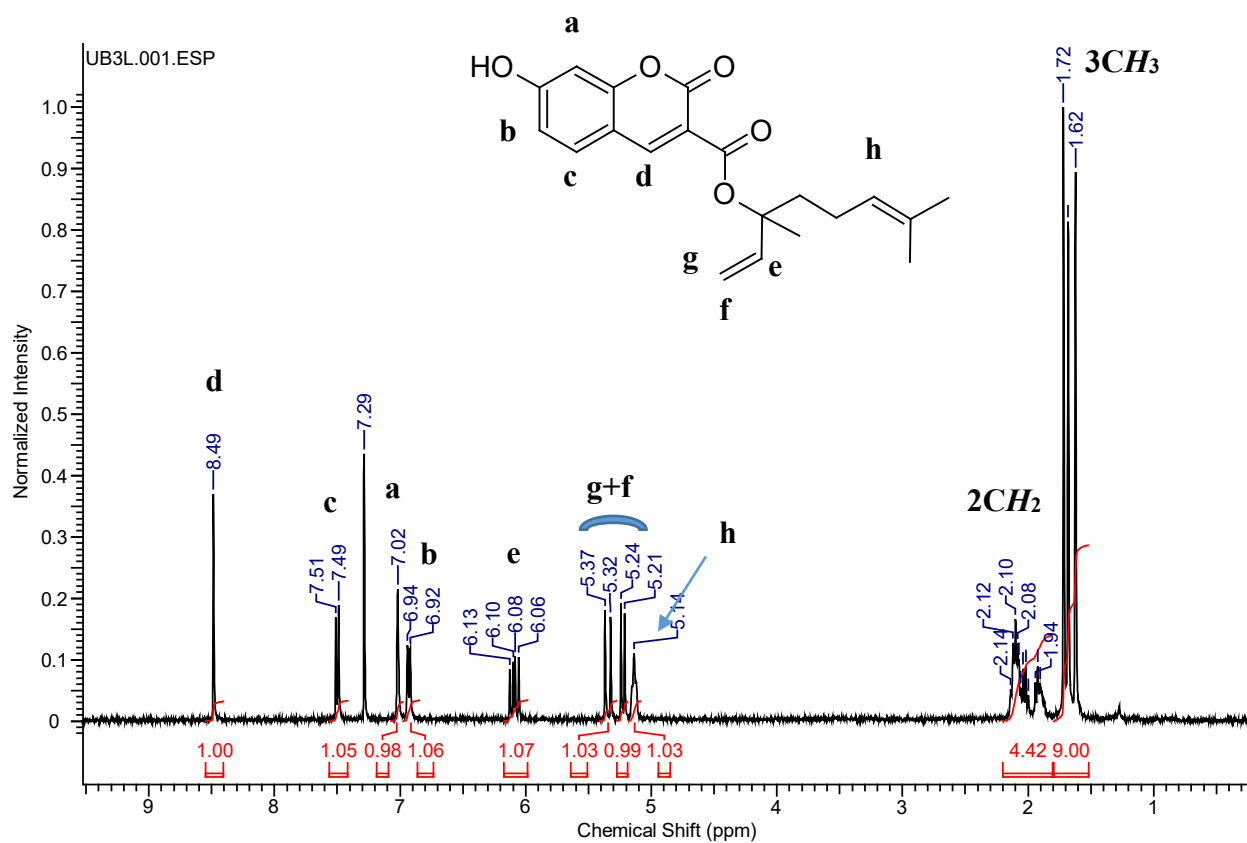
<sup>13</sup>C ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) додецилового эфира 7-гидроxicумарин-4-уксусной кислоты (UB4-C12)



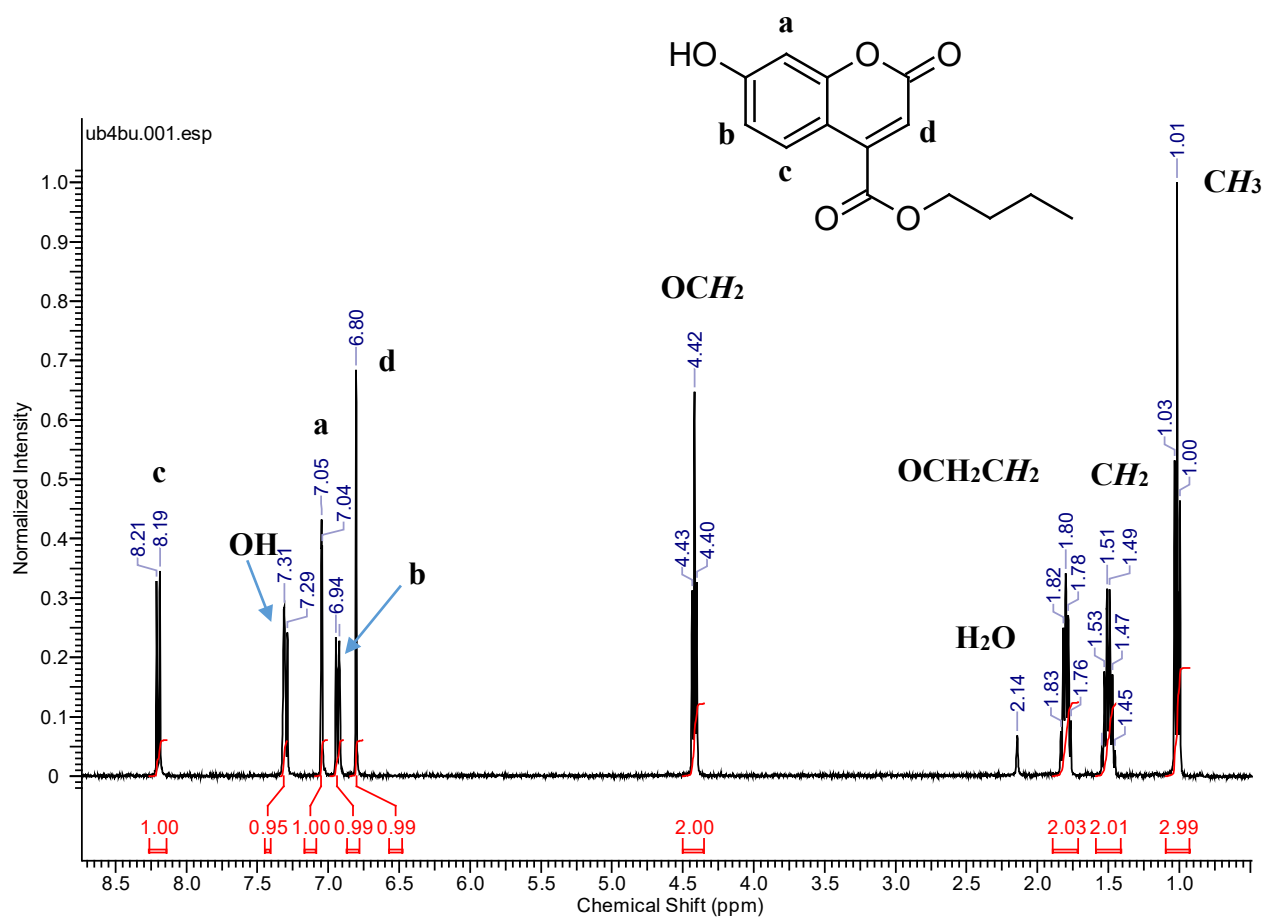
<sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) втор-октилового эфира 7-гидроxicумарин-3-карбоновой кислоты (UB3-2C8)



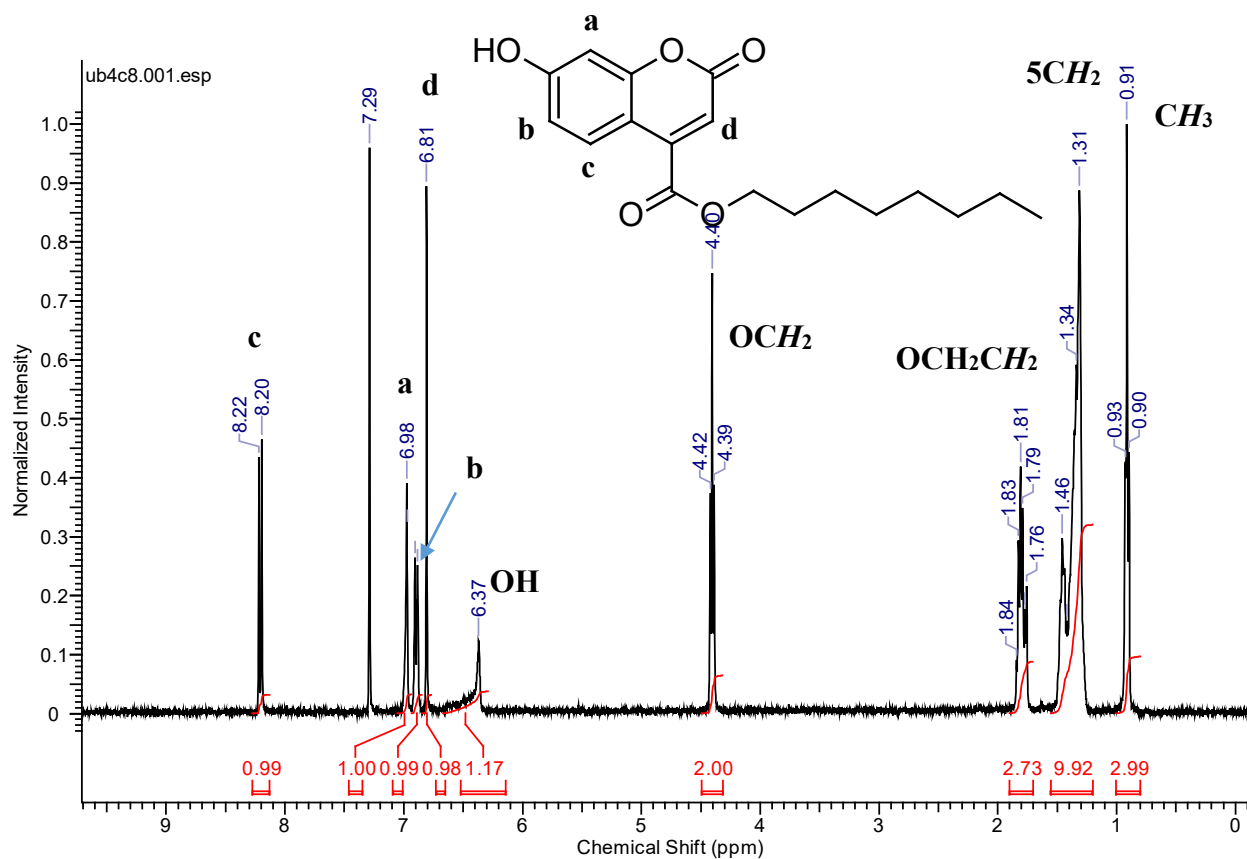
<sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) (5R)-метил-(2S)-(2-изопропил)-(1R)-циклогексил 7-гидроxicумарин-3-карбксилата (UB3-M)



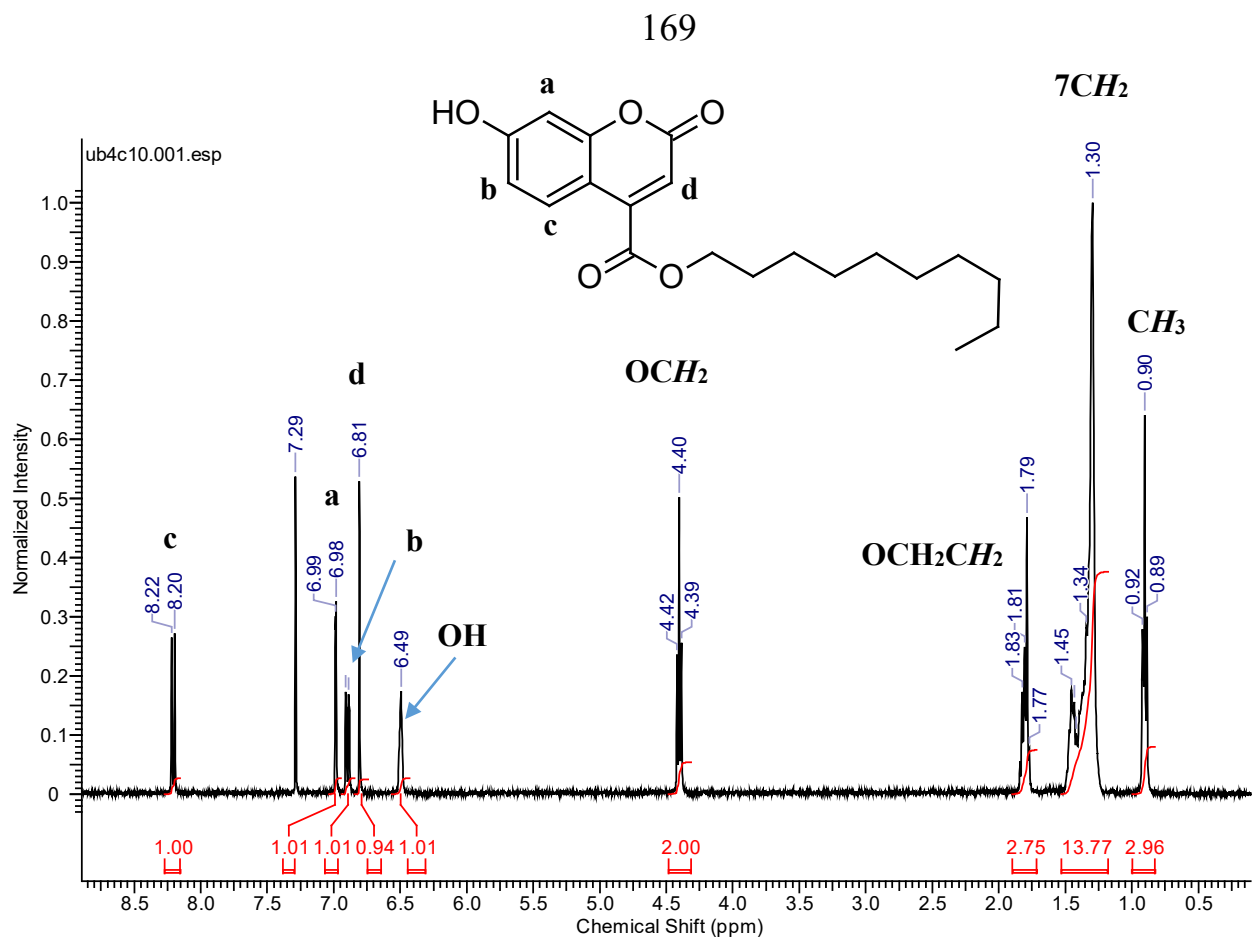
$^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ) 3,7-диметил-1,6-октадиен-3-ил 7-гидроксикумарин-3-карбоксилата (UB3-L)



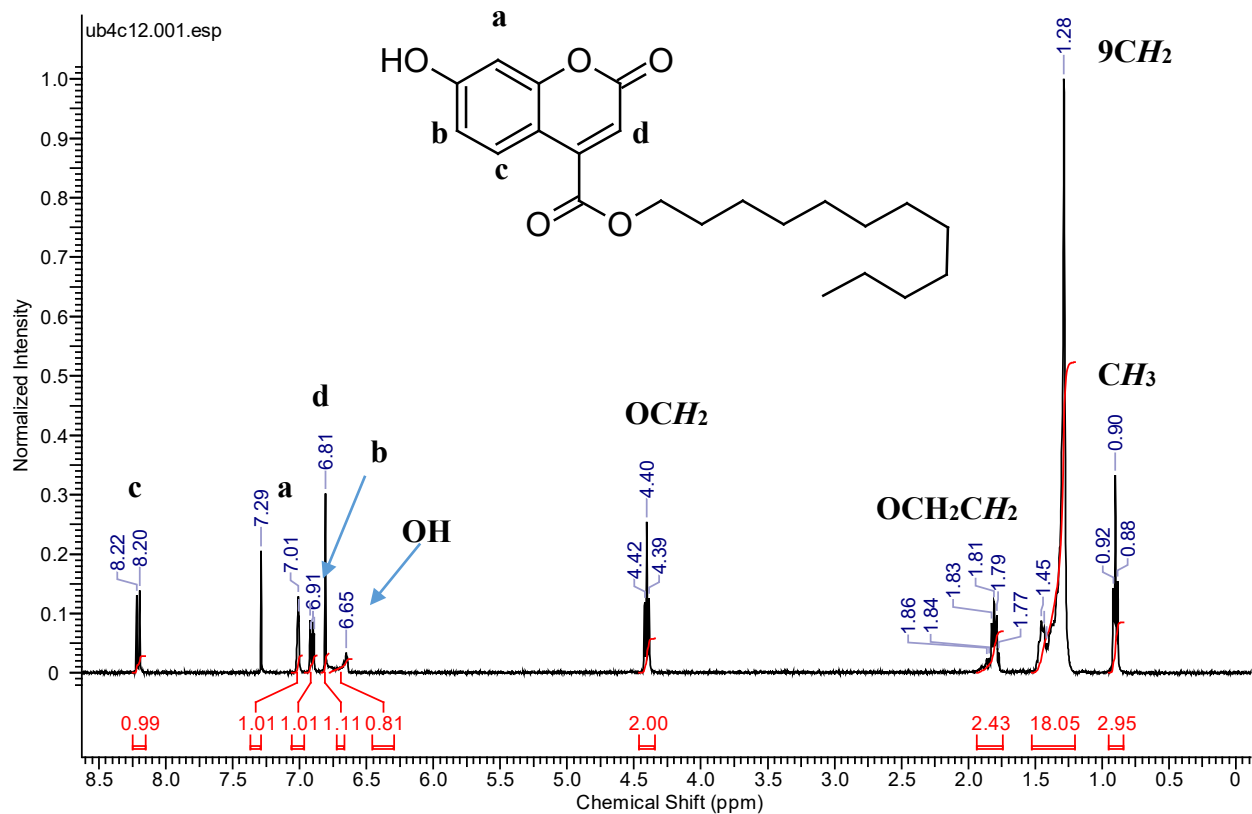
<sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) бутилового эфира 7-гидроxicумарин-4-карбоновой кислоты (UB\*4-C4)



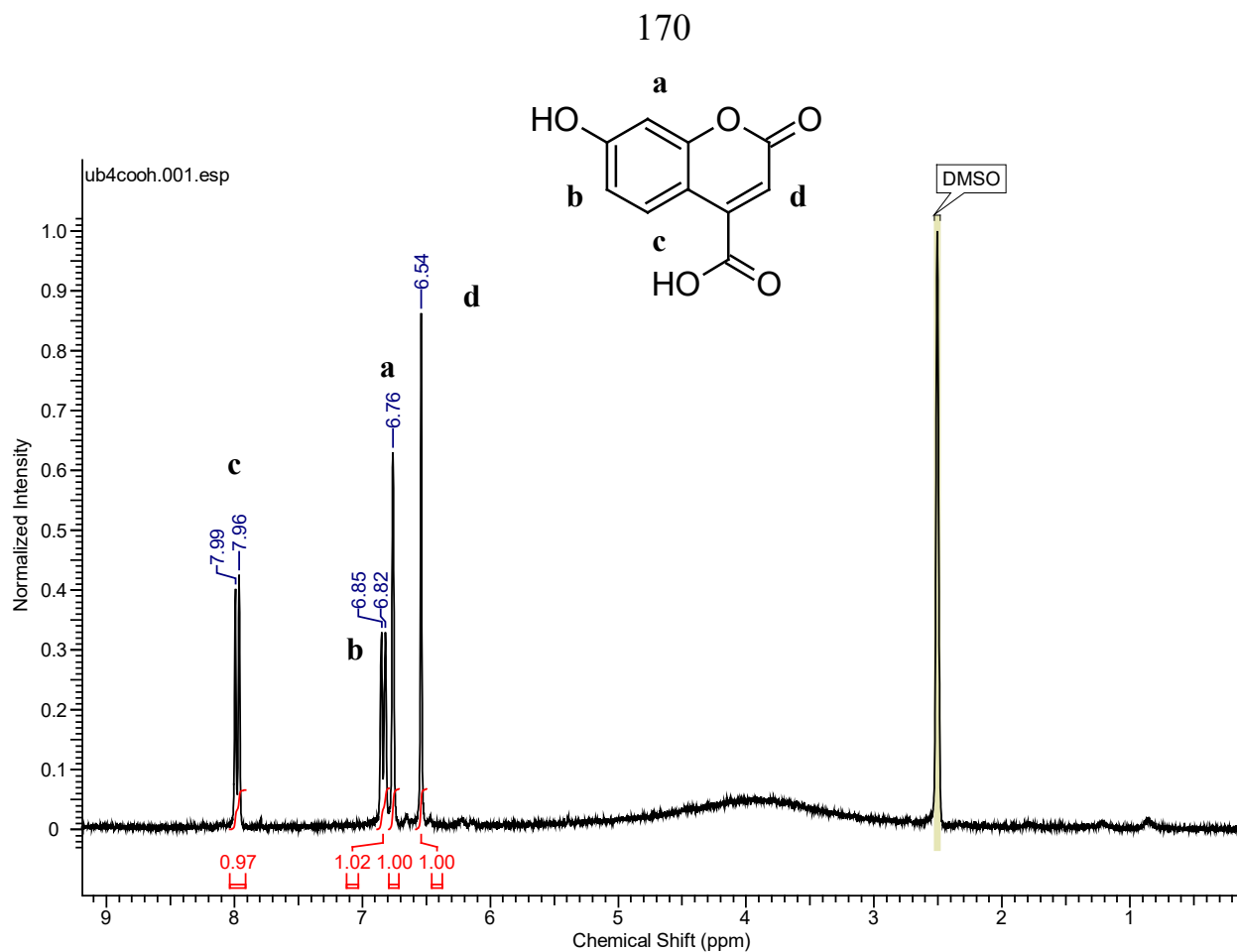
<sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) октилового эфира 7-гидроxicумарин-4-карбоновой кислоты (UB\*4-C8)



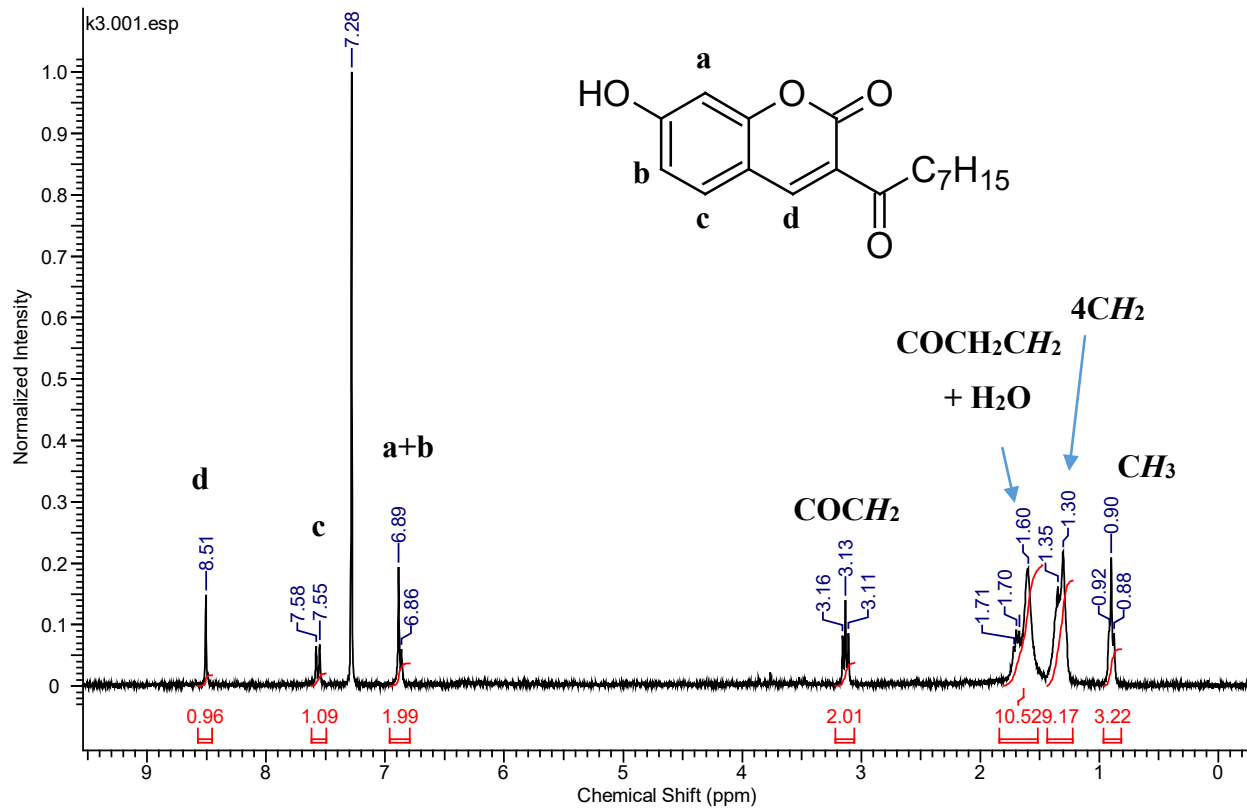
<sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) децилового эфира 7-гидроксикумарин-4-карбоновой кислоты (UB\*4-C10)



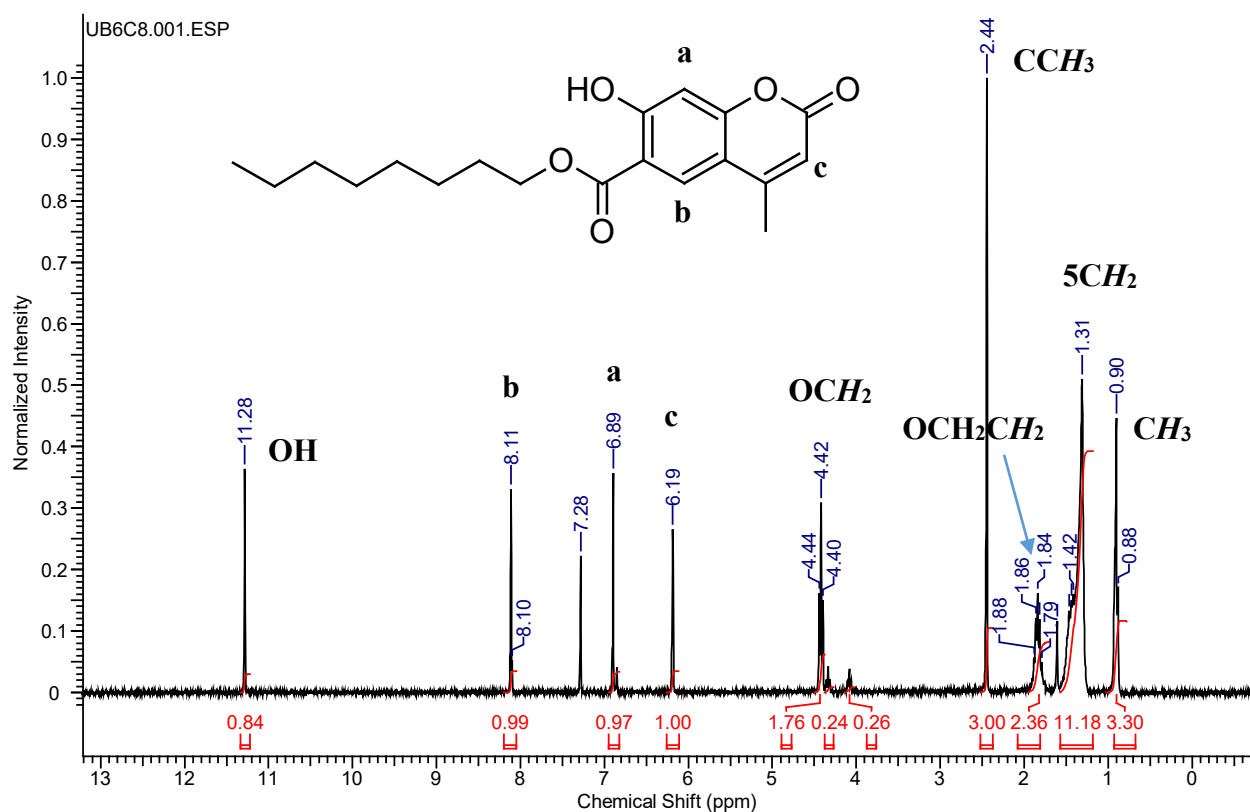
<sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) додецилового эфира 7-гидроксикумарин-4-карбоновой кислоты (UB\*4-C12)



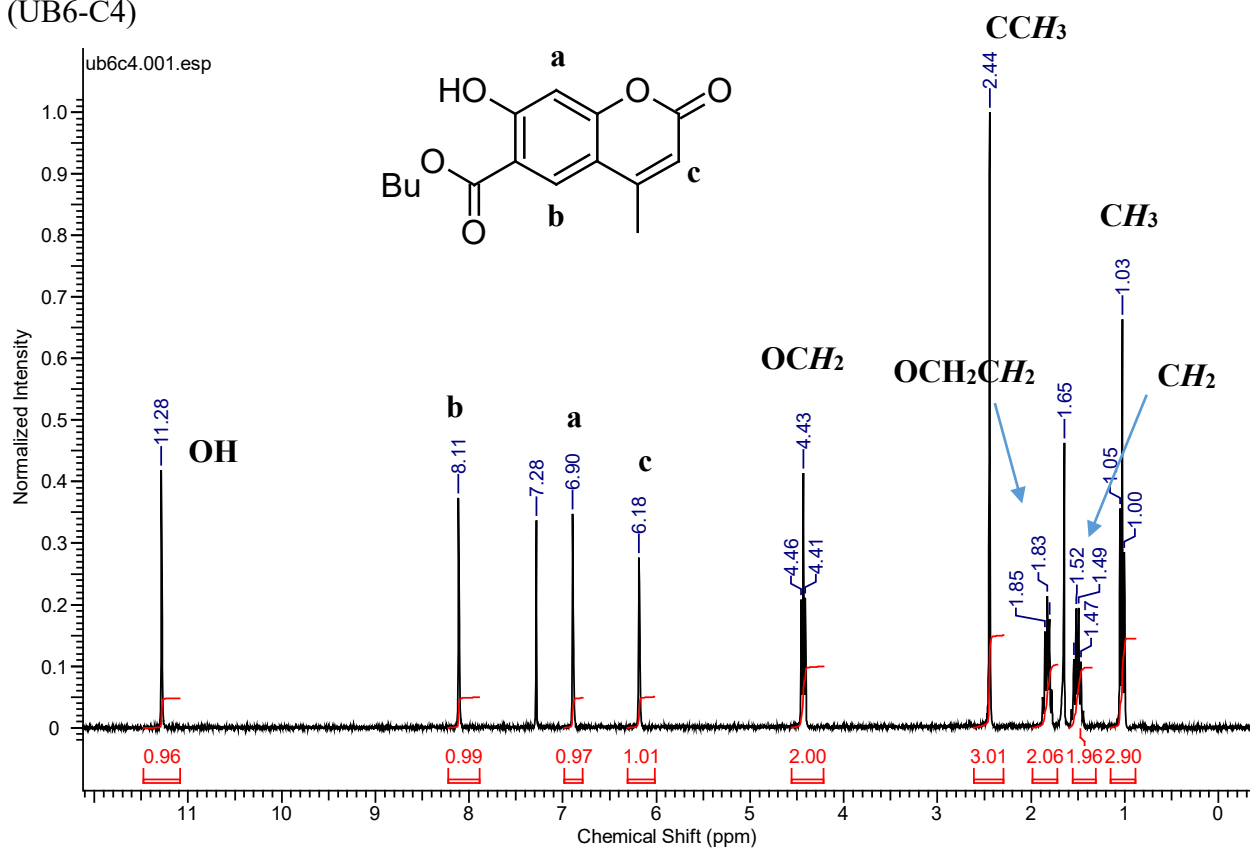
<sup>1</sup>H ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>) 7-гидроксикумарин-4-карбоновой кислоты



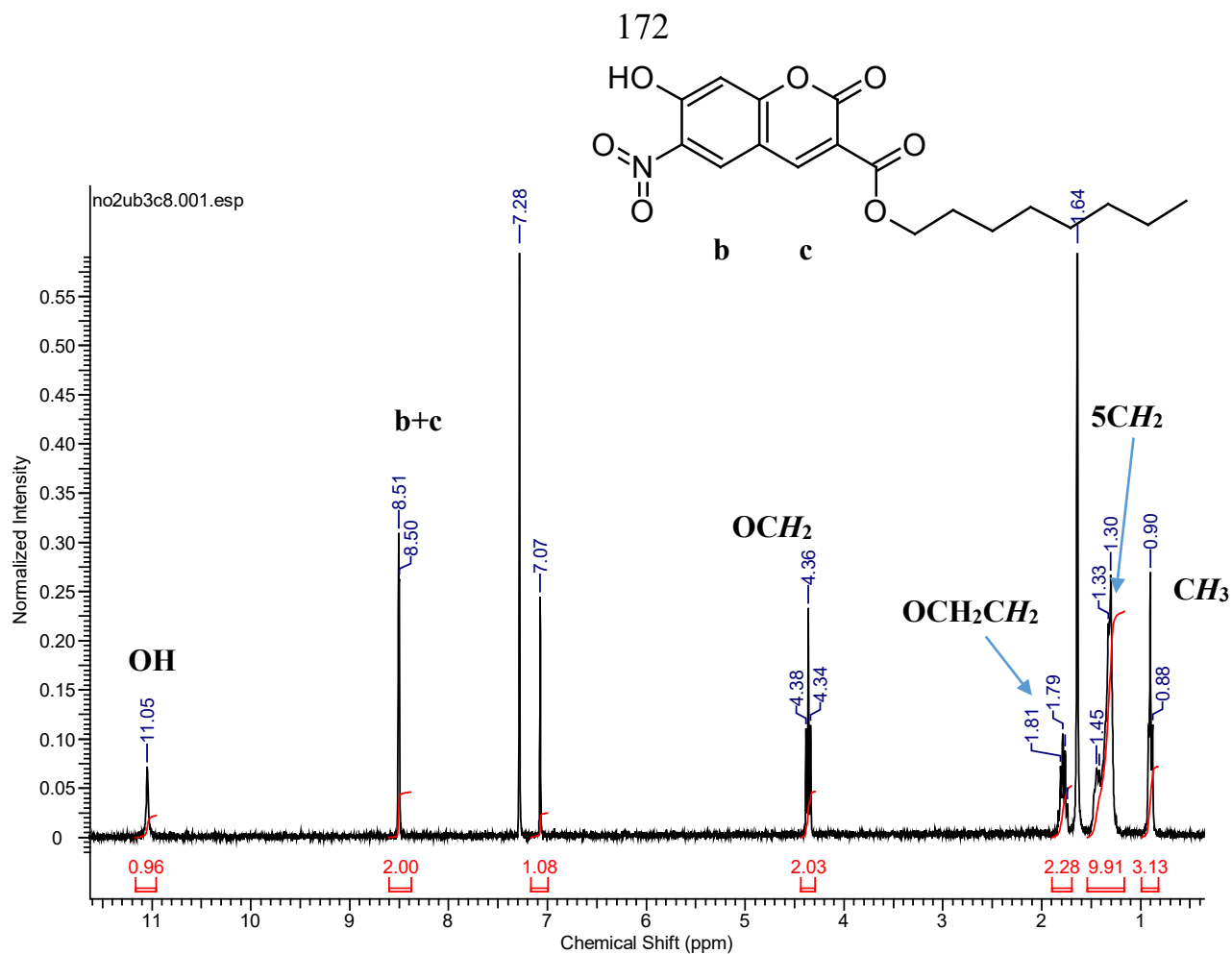
<sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) 3-октаноил-7-гидроксикумарина (UB3-C-C7)



$^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ) октилового эфира 7-гидрокси-4-метилкумарин-6-карбоновой кислоты (UB6-C4)

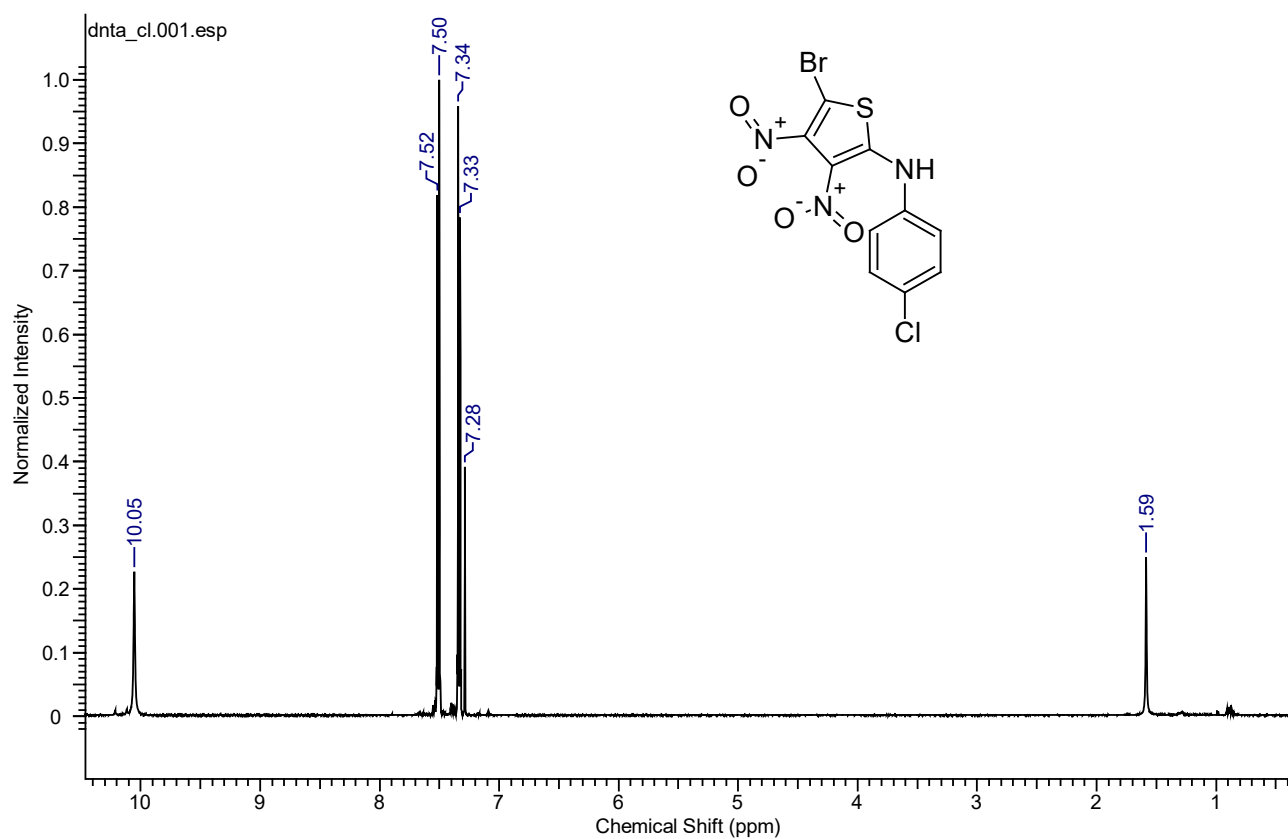


$^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ) бутилового эфира 7-гидрокси-4-метилкумарин-6-карбоновой кислоты (UB6-C4)

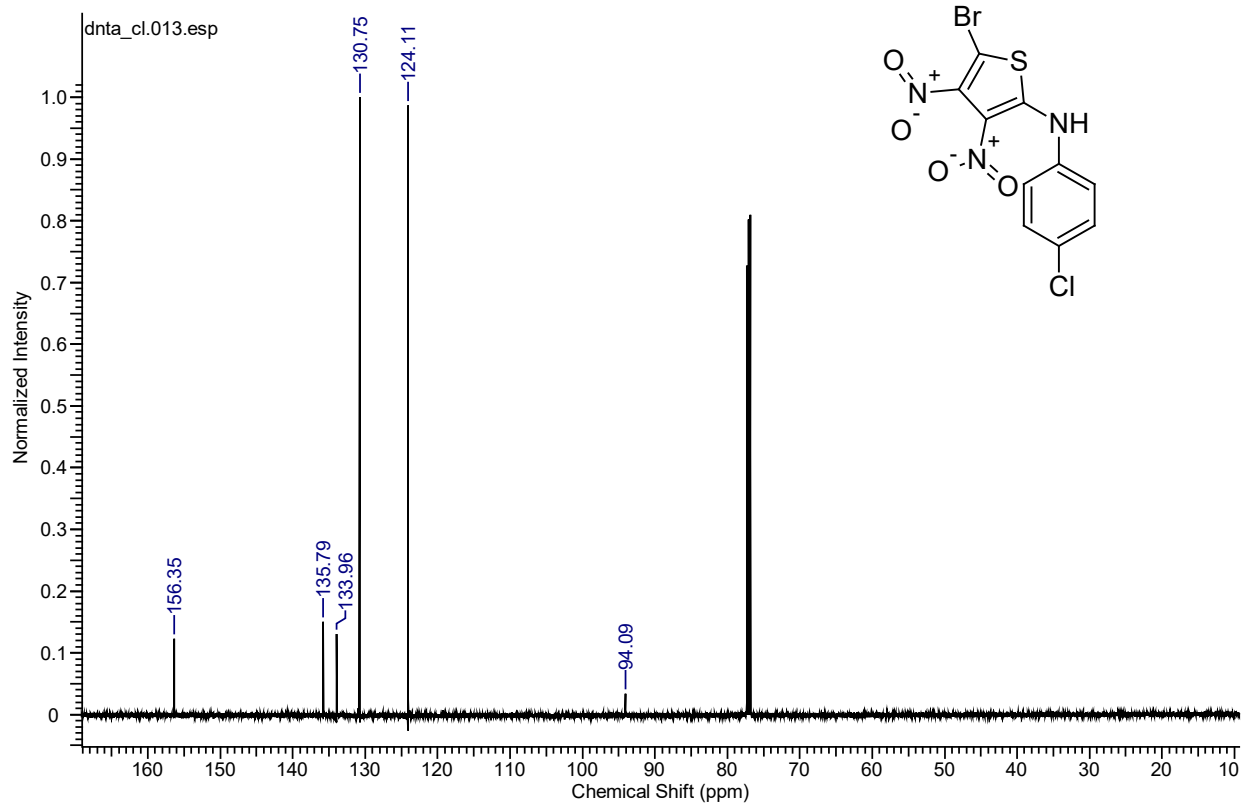


<sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) октилового эфира 7-гидрокси-6-нитрокумарин-3-карбоновой кислоты (NO<sub>2</sub>-UB3-C8)

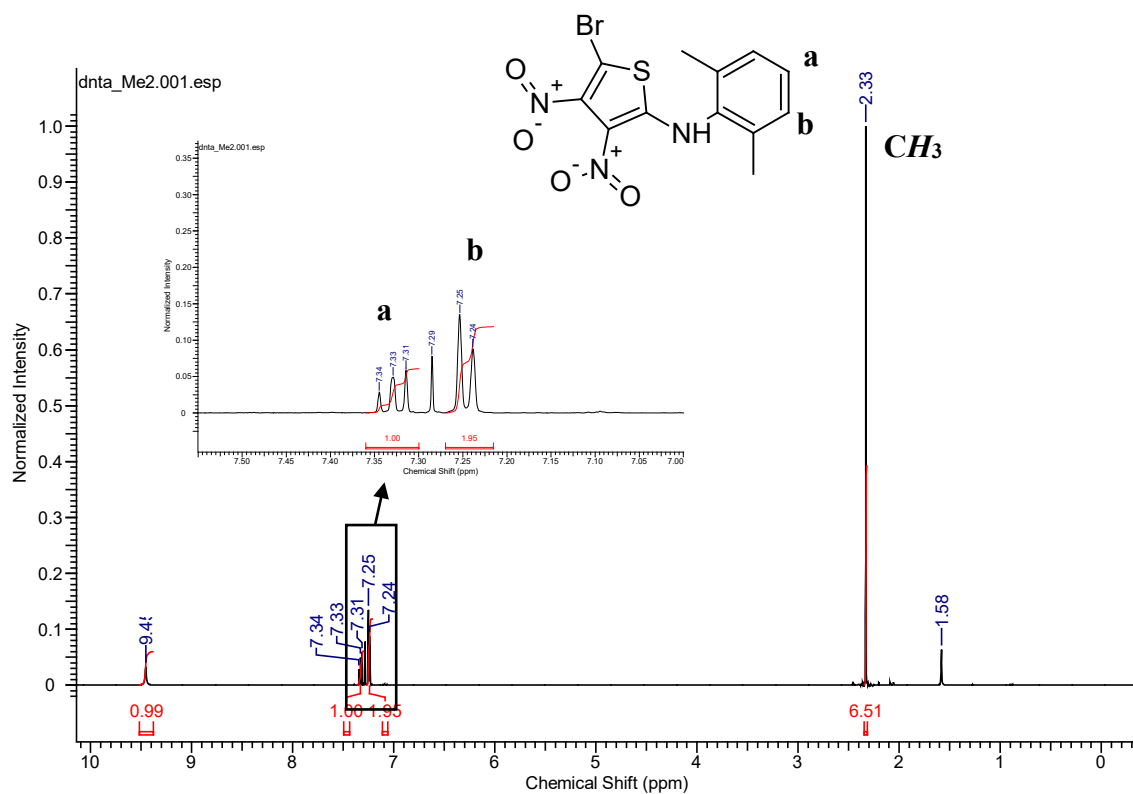




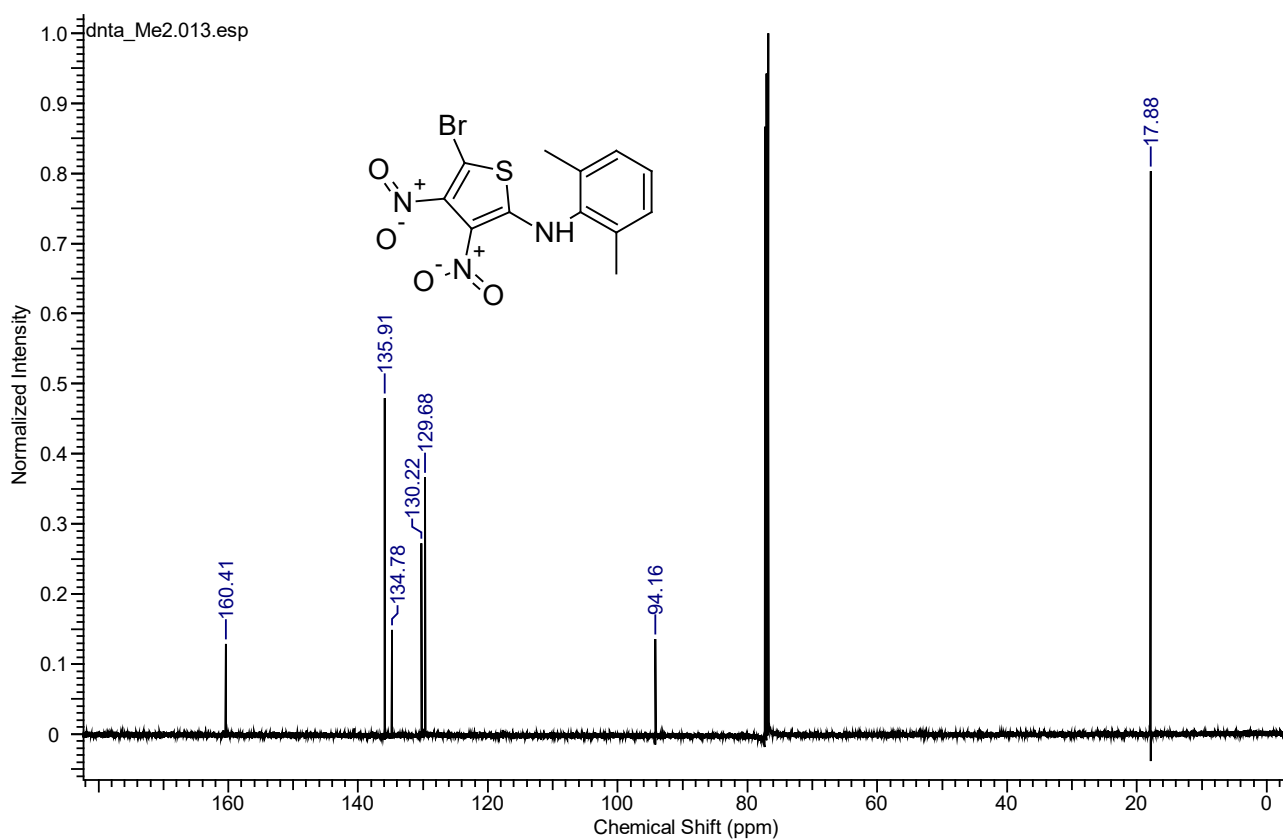
<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 5-бром-N-(4-хлорфенил)-3,4-динитро-2-тиофенамина (BDCT).



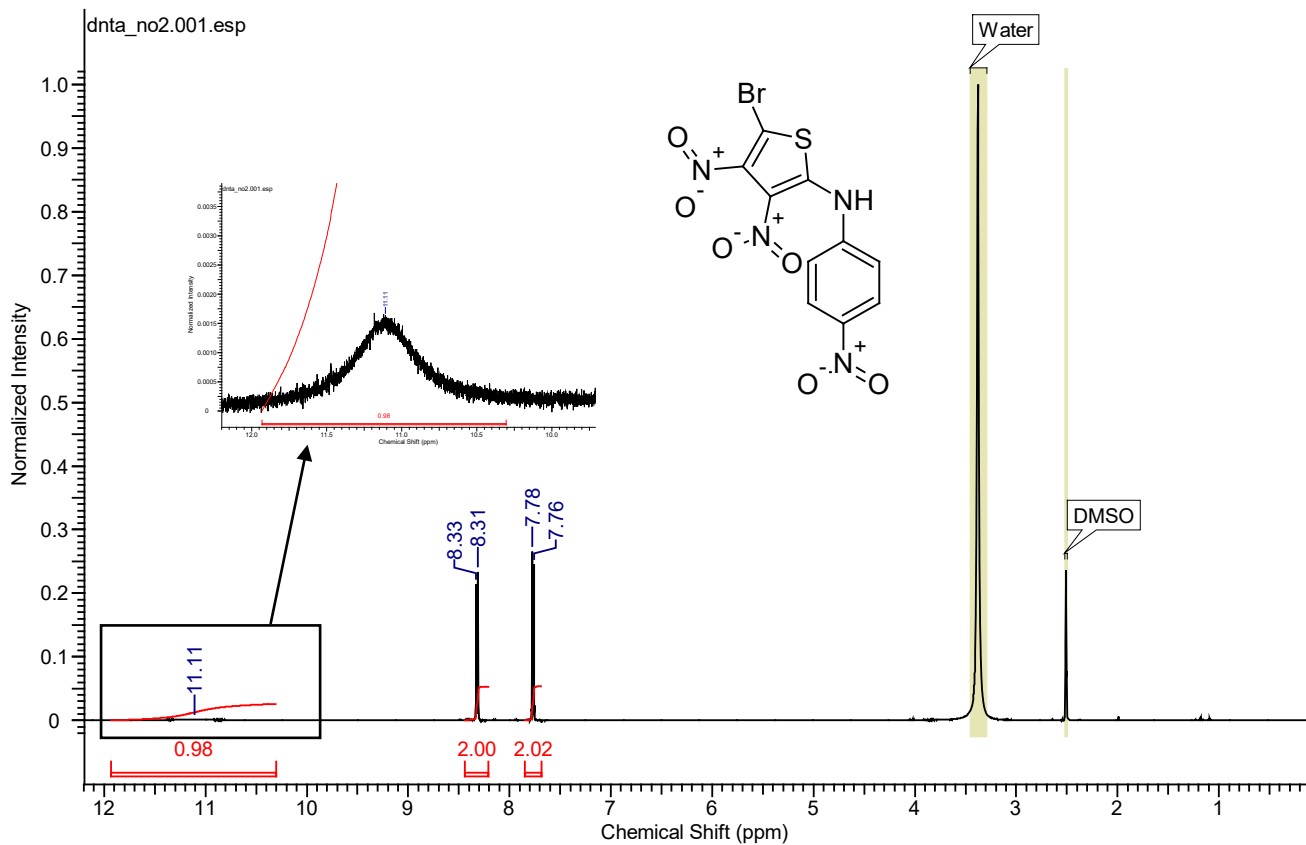
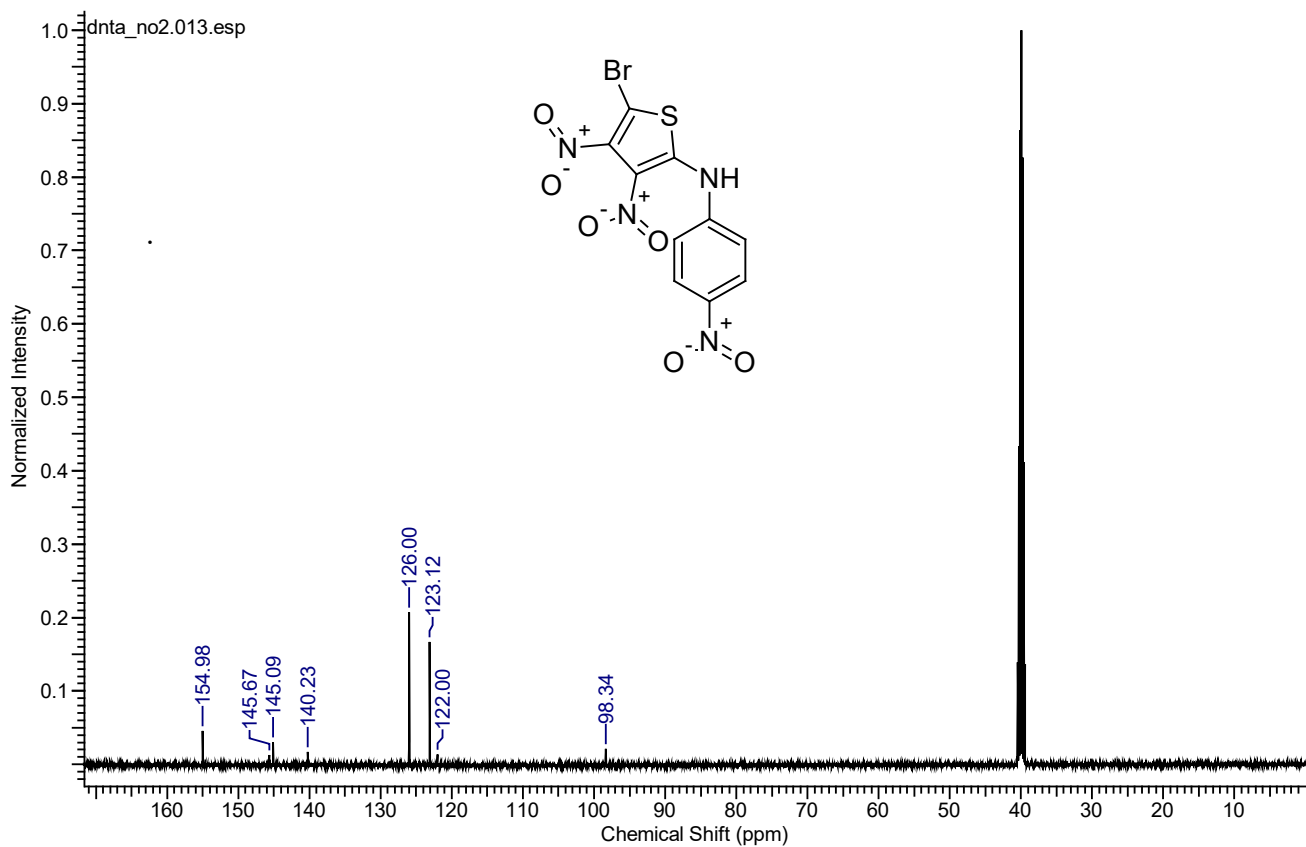
<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) 5-бром-N-(4-хлорфенил)-3,4-динитро-2-тиофенамина (BDCT).



<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 5-бром-N-(2,6-диметилфенил)-3,4-динитро-2-тиофенамина (BDDT)



<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) 5-бром-N-(2,6-диметилфенил)-3,4-динитро-2-тиофенамина (BDDT)

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) 5-бром-3,4-динитро-N-(4-нитрофенил)-2-тиофенамина (BDNT)<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) 5-бром-3,4-динитро-N-(4-нитрофенил)-2-тиофенамина (BDNT)